

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CHRISTIANNE EMMANUELLE ANDRADE PIRES BRILHANTE

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E  
EXTRATO BRUTO DA CASCA DE LARANJA-PERA NA CONGELAÇÃO DE  
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS BOVINOS**

JOÃO PESSOA  
2022

CHRISTIANNE EMMANUELLE ANDRADE PIRES BRILHANTE

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E  
EXTRATO BRUTO DA CASCA DE LARANJA PERA NA CONGELAÇÃO DE  
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS BOVINOS**

Projeto de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Biotecnologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva

JOÃO PESSOA  
2022

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

B857e Brilhante, Christianne Emmanuelle Andrade Pires.  
Extração, caracterização e aplicação do óleo  
essencial e extrato bruto da casca de laranja-pera na  
congelamento de espermatozoides epididimários bovinos /  
Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante. - João  
Pessoa, 2022.

122 f. : il.

Orientação: Sildivane Valcácia Silva.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Óleo essencial - Casca de laranja. 2. Óleo  
essencial - Atividade antioxidante. 3. Criopreservação.  
4. Diluidores seminais. 5. Resíduos agrícolas. I.  
Silva, Sildivane Valcácia. II. Título.

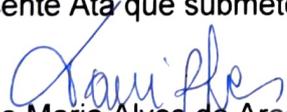
UFPB/BC

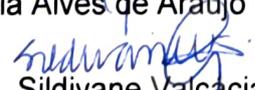
CDU 547.9(043)



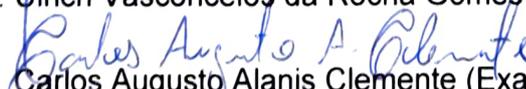
Ata da 37ª (trigésima sétima) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia **CHRISTIANNE EMMANUELLE ANDRADE PIRES BRILHANTE** candidata ao Título de "Mestre" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis.

Às oito horas e trinta minutos (08h30) do dia 30 de setembro do ano de dois mil e vinte e dois (30/09/2022), no auditório gentilmente cedido pelo IPeFarM/UFPB, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante** candidata ao Título de "MESTRE" em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores Sildivane Valcácia Silva (Orientadora) (Universidade Federal da Paraíba); Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador Interno) (Universidade Federal da Paraíba) e Carlos Augusto Alanis Clemente (Examinador Externo) (Universidade Federal da Paraíba). Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca professora Sildivane Valcácia Silva, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Extração, Caracterização e Aplicação do Óleo Essencial e do Extrato da Casca de Laranja Pera na Conservação Seminal". Após discorrer sobre o referido tema, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Ato contínuo passou a Comissão em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face da aprovação, declarou a presidente achar-se a examinada **Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante** legalmente habilitada a receber o Título de "MESTRE" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

  
Tânia Maria Alves de Araújo (Secretária)

  
Prof. Dra. Sildivane Valcácia Silva (Orientadora)

  
Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador Interno)

  
Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente (Examinador Externo)

Dedico este trabalho à  
minha mãe. Sei que a  
saudade nunca passará,  
mas espero que mesmo a  
distância eu possa te dar  
orgulho ao longo dessa  
jornada que é a vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, pois Ele é quem me criou, é quem cuidou de mim em todos os momentos mais difíceis, é quem me permitiu concluir mais essa etapa da minha vida.

À minha orientadora **Sildivane Valcácia**, agradeço pela confiança, paciência, e compreensão durante os altos e baixos deste mestrado, principalmente em todas as vezes que precisei cuidar da minha mãe. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão.

À minha família, meu pai **Edvaldo Brilhante** e irmãos **Jonathan** e **Nadezhda**, por todas as palavras de incentivo e de confiança em mim quando eu mesmo não a tive. Independente de tudo que aconteça, o meu amor por vocês ultrapassa as barreiras desta vida.

À minha mãe, **Severina de Andrade Pires**, pelo dom da vida, pelo amor incondicional que sempre teve por mim, por confiar em mim para cuidar de ti durante estes últimos anos que estivesse na Terra, por me inspirar e me dar forças pra concluir este trabalho e essa etapa em minha vida. Palavras não são suficientes para descrever o meu amor e a saudade que tenho de ti.

À minha grandíssima amiga **Ariane Susan**, que foi um raio de sol em diversas manhãs escuras. Obrigada por tudo, pelas infinitas horas de trabalho juntas, cada risada, cada frase motivacional, cada conselho, cada momento com você foi muito especial e fez toda a diferença no que aprendi e vivi neste mestrado. Serei para sempre grata.

Aos meus amigos pessoais, **Thais**, **Henrique**, **Keegan** e **Scott**. Aqui nomeio apenas quatro, mas que este agradecimento se estenda para todos os colegas e amigos que estiveram presente e me ofereceram qualquer palavra de conforto durante estes últimos anos. Vocês não têm dimensão da influência e importância que vocês exercem em minha vida, me fazendo melhorar a cada dia, ou pelo menos tentar. O meu muito obrigada por todo apoio, por cada palavra de força, e pela confiança em mim e na conclusão deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA) do Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) pelo acolhimento e por todo apoio na realização deste trabalho, e em especial à **Camila**, pela disponibilidade e participação ativa na realização das avaliações espermáticas deste trabalho.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), em especial à **Gabriela**, **Natan**, **Thallison** e **Rodrigo**. Obrigada

por toda ajuda nos momentos de desespero, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por sempre serem tão abertos e generosos na partilha de todos os conhecimentos comigo.

À professora **Dra. Andrea Farias** e aos amigos do LEBP, **Lucas** e **Nathanael**, pela disponibilidade e ajuda, pelas conversas e conselhos, e pela ótima companhia.

Ao professor **Dr. Ulrich Vasconcelos** e aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), **Andrwey** e **Gustavo**, que me ajudaram com prontidão na realização dos testes microbiológicos. Obrigada por toda ajuda e principalmente pelos momentos leves e divertidos que me proporcionaram no caminho.

Ao professor **Dr. Ian Porto**, por seus conhecimentos, paciência, disponibilidade e ajuda imensurável na realização deste trabalho.

À professora **Dra. Elisângela Afonso** e ao Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB) por toda disponibilidade, ajuda e conhecimento compartilhado acerca das nanoemulsões.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA), **Yuri**, **Nonato**, e, em especial ao **Marcelo**, por toda a paciência, disponibilidade e ajuda imensurável. Muitíssimo obrigada, a sua prontidão em ajudar ao próximo é algo que eu tenho imensa admiração e levarei comigo para sempre.

Aos membros da banca avaliadora, **Dr. Ulrich Vasconcelos** e **Dr. Carlos Augusto** pela disponibilidade e contribuição a este trabalho por meio de suas valiosas avaliações.

À **Universidade Federal da Paraíba**, especialmente ao **Centro de Biotecnologia** (CBiotec), pelo espaço e estrutura indispensáveis para realização deste trabalho bem como à **FAPESQ-CAPES** pelo fomento a esta pesquisa.

Ao abatedouro **Honorato & Araújo LTDA**, que cedeu de forma generosa os testículos utilizados neste trabalho, em especial ao funcionário **Fuba** que sempre esteve à frente desta ajuda, sempre com bom ânimo e alegria.

Agradeço por fim à cada pessoa que esteve em meu caminho e que foram anjos em minha vida, que me ajudaram em todo e qualquer aspecto para realização deste trabalho.

"Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão."

São Francisco de Assis

## RESUMO

O Brasil é o país com o maior rebanho bovino comercial, e com isso, surge a necessidade de aprimorar cada vez mais a eficiência dos processos envolvidos neste setor. Para isso são utilizadas biotécnicas aplicadas à reprodução, como a criopreservação. Buscando evitar os danos causados por esta técnica, são utilizados diluidores seminais. Todavia, os diluidores padrão rotineiramente utilizados possuem ingredientes de origem animal, como a gema de ovo e o leite desnatado. Estes são de difícil padronização e apresentam risco de contaminação. Têm-se então um grande interesse no desenvolvimento de diluidores de origem vegetal. A laranja é uma fruta rica em metabólitos secundários, como carboidratos e compostos fenólicos, estes estão relacionados à sua atividade antioxidante. No Brasil, a laranja-pera (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é variedade cítrica mais importante e seu uso pela indústria de sucos gera toneladas de resíduos agrícolas, principalmente provenientes de sua casca. Este trabalho busca utilizar de forma alternativa a casca de laranja pera, como matéria-prima para produção do extrato bruto e do óleo essencial. Estes podem ser benéfico dentro da formulação de um diluidor seminal devido as suas características antioxidantes e antimicrobianas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso do extrato da casca e o óleo essencial de laranja pera na produção de um novo meio diluidor com atividade na conservação seminal. Foi realizada a extração do óleo essencial e sua caracterização da composição química e potencial antioxidante. Foram formuladas diferentes nanoemulsões com este óleo essencial, e estas foram testadas quanto ao seu potencial crioprotetor em células epididimárias bovinas. Também foi obtido o extrato bruto da casca de laranja, este foi caracterizado quanto à sua composição fitoquímica, potencial antioxidante e atividade antimicrobiana. E foram testados diluidores, com e sem a presença da gema de ovo, com adição de 10 e 20% deste extrato. Os resultados demonstraram que o óleo essencial não apresentou potencial antioxidante, assim como não obteve sucesso na proteção dos espermatozoides. Quanto ao extrato, ele apresentou potencial antioxidante pelo método DPPH, contudo, as avaliações espermáticas indicaram que não houve diferença significativa entre o diluidor padrão adicionado do extrato e o diluidor padrão sozinho. Diante destes resultados, conclui-se que o extrato da casca de laranja deve ser melhor avaliado quanto ao seu potencial crioprotetor.

**Palavras-chave:** Óleo essencial; Casca de laranja; Criopreservação; Diluidores Seminais; Atividade antioxidante; Destinação nobre de resíduos.

## ABSTRACT

Brazil has the largest commercial cattle herd, and with that, there is a need to increasingly improve the performance of the processes involved in this area. For this, biotechniques applied to reproduction, such as cryopreservation, are used. Seeking to avoid the damage caused by this technique, seminal extenders are used. However, standard extenders that are commonly used contain ingredients of animal source, such as egg yolk and milk. These ingredients are difficult to maintain a standard production and they increase the risk of contamination. That being said, there is a great interest in the development of extenders with a plant source. Orange is a fruit rich in secondary metabolites, such as carbohydrates and phenolic compounds, and these are related to its antioxidant activity. In Brazil, the sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) is the most important citrus variety and its use by the juice industry generates tons of agricultural waste, mainly from its peel. This work had the intention to give an alternative use for the orange peel, acting as raw material for the production of its extract and essential oil. These can be beneficial within the formulation of a seminal extender as they show antimicrobial antioxidant characteristics. Therefore, this work aimed to evaluate the use of orange peel extract and essential oil for the production of a new extender with activity in the sperm cryopreservation. The essential oil extraction, its chemical composition and antioxidant potential characterization were performed. Different essential oil nanoemulsions were formulated, and these were tested in order to evaluate their protective potential epididymal sperm cells. The extraction of the crude extract of the orange peel was also performed, this was elaborated regarding its phytochemical composition, antioxidant potential and antimicrobial potential. These extenders were tested, with and without the presence of egg yolk, with the addition of 10 and 20% extract. The results showed that the essential oil did not show an antioxidant potential, as well as it was not successful in protecting the sperm cells. As for the extract, it showed antioxidant potential by the DPPH method, however, sperm parameters evaluated showed that there was no significant difference between the standard extender with the added extract and the standard extender alone. Based on these results, it can be concluded that the orange peel extract should be better evaluated for its cryoprotective potential.

Keywords: Essential oil; Orange peel; Cryopreservation; Seminal Extenders; Antioxidant activity, Residues noble destination.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1 Aparelho Reprodutor do Macho Bovino.....	23
2.2 Espermatogênese.....	24
2.3 A Célula Espermática.....	25
2.4 Capacitação e Reação Acrossômica.....	27
2.5 Criopreservação.....	28
2.6 Diluidores seminais.....	31
2.7 Crioprotetores.....	32
2.8 A Laranja e a Produção Brasileira.....	35
2.9 Extrato da Casca de Laranja.....	37
2.10 Óleo Essencial da Casca de Laranja.....	37
2.10.1 Terpenos.....	40
2.10.1.1 Limoneno.....	41
2.11 Nanoemulsões.....	42
2.11.1 Polisorbato 80.....	45
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
4.1 Experimento I - Óleo essencial da casca de laranja.....	48
4.1.1 Obtenção e preparação da casca para extração do óleo essencial.....	48
4.1.2 Extração do óleo essencial.....	48
4.1.3 Caracterização do óleo essencial.....	50
<i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)</i> .....	50
<i>Determinação do potencial hidrogeniônico</i> .....	51
<i>Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH</i> .....	52
4.1.4 Preparação das nanoemulsões.....	53
4.1.5 Caracterização das nanoemulsões.....	55
4.1.6 Delineamento experimental dos testes com o óleo essencial.....	56
4.1.7 Obtenção dos espermatozoides epididimários.....	57

4.1.8 Análises espermáticas.....	59
<i>Avaliação da motilidade espermática.....</i>	<i>59</i>
<i>Teste de integridade da membrana plasmática.....</i>	<i>59</i>
<i>Teste de funcionalidade da membrana plasmática.....</i>	<i>60</i>
<i>Congelamento e descongelamento dos espermatozoides.....</i>	<i>61</i>
4.2 Experimento II - Extrato bruto da casca de laranja .....	62
4.2.1 Obtenção e preparação da casca para formulação do extrato bruto.....	62
4.2.2 Obtenção do extrato bruto.....	63
4.2.3 Caracterização do extrato bruto e diluidores.....	64
<i>Screening fitoquímico.....</i>	<i>64</i>
<i>Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio <sup>1</sup>H e carbono <sup>13</sup>C.....</i>	<i>65</i>
<i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) .....</i>	<i>65</i>
<i>Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS.....</i>	<i>66</i>
4.2.4 Delineamento experimental dos testes com o extrato bruto.....	67
4.2.5 Análises espermáticas.....	67
4.2.6 Análises espermáticas pós-descongelamento.....	67
<i>Avaliação dos parâmetros cinéticos.....</i>	<i>68</i>
<i>Integridade de membrana plasmática (iMP) .....</i>	<i>69</i>
<i>Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) .....</i>	<i>70</i>
<i>Integridade de membrana acrossomal (iAC) .....</i>	<i>70</i>
4.2.7 Testes microbiológicos.....	71
<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....</i>	<i>71</i>
<i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) .....</i>	<i>72</i>
4.3 Análise estatística.....	72
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
5.1 Experimento I - Óleo essencial da casca de laranja.....	73
5.1.1 Obtenção e preparação da casca para extração do óleo essencial.....	73
5.1.2 Extração do óleo essencial.....	73
5.1.3 Caracterização do óleo essencial.....	74
<i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....</i>	<i>74</i>
<i>Determinação do potencial hidrogeniônico.....</i>	<i>75</i>
<i>Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH.....</i>	<i>76</i>
5.1.4 Preparação das nanoemulsões.....	77
5.1.5 Caracterização das nanoemulsões.....	79

5.1.6 Delineamento experimental dos testes com o óleo essencial.....	80
5.1.7 Obtenção dos espermatozoides epididimários.....	80
5.1.8 Análises espermáticas.....	80
<i>Piloto I</i> .....	80
<i>Piloto II</i> .....	82
<i>Piloto III</i> .....	83
5.2 Experimento II - Extrato bruto da casca de laranja .....	84
5.2.1 Obtenção e preparação da casca para formulação do extrato bruto.....	84
5.2.2 Obtenção do extrato bruto.....	84
5.2.3 Caracterização do extrato bruto e diluidores.....	84
<i>Determinação do potencial hidrogeniônico</i> .....	84
<i>Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH</i> .....	85
<i>Screening fitoquímico</i> .....	87
<i>Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio <sup>1</sup>H e carbono <sup>13</sup>C</i> .....	87
<i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)</i> .....	89
<i>Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS</i> .....	90
5.2.4 Delineamento experimental dos testes com o extrato bruto.....	91
5.2.5 Análises espermáticas.....	91
5.2.6 Análises espermáticas pós-descongelação.....	94
<i>Avaliação dos parâmetros cinéticos</i> .....	94
<i>Integridade de membrana plasmática (iMP)</i> .....	95
<i>Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)</i> .....	95
<i>Integridade de membrana acrossomal (iAC)</i> .....	96
5.2.7 Testes microbiológicos.....	97
<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)</i> .....	97
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	100
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101
<b>ANEXO I</b> .....	119
<b>ANEXO II</b> .....	120
<b>APÊNDICE A</b> .....	121
<b>APÊNDICE B</b> .....	123

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial de laranja.	39
<b>Figura 2</b> - Aspecto visual das laranjas e cascas utilizadas para obtenção do óleo essencial e extrato bruto.....	48
<b>Figura 3</b> - Extração do óleo essencial da casca de laranja.....	49
<b>Figura 4</b> - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas utilizado para caracterização dos óleos essenciais.....	51
<b>Figura 5</b> - Equipamento utilizado para leitura da absorvância das placas de 96 poços.....	53
<b>Figura 6</b> - Etapas de obtenção dos epidídimos bovinos.....	58
<b>Figura 7</b> - Técnica de flutuação para obtenção dos espermatozoides epididimários bovinos.....	58
<b>Figura 8</b> - Coloração eosina-nigrosina em espermatozoides epididimários bovinos.....	60
<b>Figura 9</b> - Teste hiposmótico em espermatozoides epididimários bovinos.....	61
<b>Figura 10</b> – Etapas da congelação das amostras.....	62
<b>Figura 11</b> - Cascas da laranja antes e após secagem na estufa.....	63
<b>Figura 12</b> – Etapas da obtenção do extrato bruto da casca de laranja.....	63
<b>Figura 13</b> - Equipamento de rotaevaporador utilizado para secagem do extrato.....	64
<b>Figura 14</b> - Materiais e equipamentos utilizados na técnica de RMN.....	65
<b>Figura 15</b> – Mudança de coloração no método DNS.....	67
<b>Figura 16</b> - Computador e microscópio utilizados para análise da cinética espermática..	69
<b>Figura 17</b> – Coloração dupla de iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína..	69
<b>Figura 18</b> – Teste do potencial de membrana mitocondrial.....	70
<b>Figura 19</b> – Avaliação da integridade acrossomal.....	71
<b>Figura 20</b> - Espectro de hidrogênio $^1\text{H}$ do extrato bruto da casca de laranja pera.....	85
<b>Figura 21</b> - Espectro de carbono $^{13}\text{C}$ do extrato bruto da casca de laranja pera.....	88
<b>Figura 22</b> - Curva da concentração de açúcares redutores nas diferentes diluições do extrato da casca de laranja.....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Rendimento das extrações do óleo essencial da casca de laranja pera.....	73
<b>Tabela 2</b> - Compostos majoritários dos óleos essenciais da casca de laranja pera .....	74
<b>Tabela 3</b> - Valores de pH dos óleos essenciais da casca de laranja pera .....	75
<b>Tabela 4</b> - Valores de pH das nanoemulsões formadas .....	76
<b>Tabela 5</b> - Resumo das avaliações feitas para as nanoemulsões formuladas em cada piloto .....	77
<b>Tabela 6</b> - Caracterização das nanoemulsões .....	79
<b>Tabela 7</b> – Avaliação da motilidade espermática do Piloto 1.....	80
<b>Tabela 8</b> - Teste de integridade da membrana plasmática do Piloto 1.....	81
<b>Tabela 9</b> - Teste de funcionalidade da membrana plasmática do Piloto 1.....	81
<b>Tabela 10</b> - Avaliação da motilidade espermática do Piloto 2.....	82
<b>Tabela 11</b> - Teste de integridade da membrana plasmática do Piloto 2.....	82
<b>Tabela 12</b> - Teste de funcionalidade da membrana plasmática do Piloto 2.....	82
<b>Tabela 13</b> – Avaliações espermáticas do Piloto 3.....	83
<b>Tabela 14</b> - Valores de pH dos diluidores com o extrato bruto da casca de laranja pera...85	
<b>Tabela 15</b> -Potencial antioxidante pelo método DPPH para o extrato bruto.....	86
<b>Tabela 16</b> - Potencial antioxidante pelo método DPPH para os diluidores utilizados nas avaliações espermáticas.....	86
<b>Tabela 17</b> - Concentração de açúcares redutores no extrato da casca de laranja.....	90
<b>Tabela 18</b> – Motilidade espermática em 0h e pós-descongelção.....	92
<b>Tabela 19</b> – Teste de integridade da membrana plasmática em 0h e pós-descongelção .....	93
<b>Tabela 20</b> - Teste de funcionalidade da membrana plasmática em 0h e pós-descongelção .....	94

<b>Tabela 21</b> - Motilidade progressiva (%) pós-descongelamento e após 1h.....	95
<b>Tabela 22</b> - Motilidade total (%) pós-descongelamento e após 1h.....	95
<b>Tabela 23</b> – Integridade da membrana plasmática (iMP) pós-descongelamento e após 1h..	96
<b>Tabela 24</b> – Potencial de membrana mitocondrial (PPM) pós-descongelamento e após 1h..	96
<b>Tabela 25</b> - Integridade de membrana acrossomal (iAC) pós-descongelamento e após 1h..	97
<b>Tabela 26</b> - Concentração inibitória mínima dos diluidores com extrato bruto.....	98
<b>Tabela 27</b> - Concentração bactericida mínima dos diluidores com extrato bruto.....	98

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Descrição dos óleos essenciais obtidos após cada extração.....	50
<b>Quadro 2</b> - Resumo dos pilotos testados na formulação das nanoemulsões.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CASA	Análise computadorizada de motilidade espermática
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-FID	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama
DMAPP	dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrito salicílico
DP	Desvio padrão
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DXP	1-desoxilulose 5-fosfato
EG	Etilenoglicol
EPI	Emulsão por inversão de fase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fase aquosa
FO	Fase oleosa
FPP	Farnesil difosfato
GPP	Geranil difosfato
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
HOST	Teste hiposmótico
HLB	Balanco hidrofílico-lipofílico
IA	Inseminação artificial
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IMP	Integridade de membrana plasmática
IPP	Isopentenil difosfato
IC50	Concentração Inibitória 50
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta

IL-6	Interleucina 6
ISO	Organização Internacional para Padronização
MDA	Malondialdeído
MEP	Fosfato de metileritritol
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
MVA	Mavelonato
NE	Nanoemulsão
OE	Óleo essencial
pH	Potencial hidrogeniônico
PIVE	Produção in vitro de embriões
PKA	Fosfoquinase A
P80	Polisorbato 80
RPM	Número de rotações por minuto
RMN	Ressonância magnética nuclear
SOD	Superóxido desmutase
TE	Transferência de embriões
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
USD	Dólares americanos

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor que
±	Mais ou menos
h	Hora
min	Minuto
kg	Quilograma
g	Gramma
mg	Miligramma
mOsmol/Kg	Miliosmoles por quilo
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
μm/s	Micrômetro por segundo
α	Alfa
β	Beta

## 1 Introdução

O Brasil apresenta o maior rebanho bovino comercial do planeta, com isso, surge a necessidade de aprimorar cada vez mais a eficiência dos processos envolvidos neste setor (FRENEAU, 2011). Para isso são comumente utilizadas biotécnicas aplicadas à reprodução, como a inseminação artificial, transferência de embriões e a criopreservação de oócitos, espermatozoides e embriões (VIEIRA, 2012).

A criopreservação do sêmen é uma técnica importante dentro da pecuária, pois permite o armazenamento de amostras provenientes de animais com alto valor genético e comercial, possibilitando seu uso por um longo período de tempo (WATSON, 2000). Além disto, ela também contribui para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores e minimiza a possibilidade de introdução de doenças transmissíveis via sêmen numa região e/ou país e a transmissão e propagação de doenças sexualmente transmissíveis nos rebanhos (TRALDI, 1994).

Mesmo com as melhores técnicas de preservação, as taxas de sobrevivência pós-descongelamento ainda são baixas, com valor aproximado de 50% para a população de espermatozoides inicial. A fim de minimizar os danos causados pelo processo de criopreservação, é adicionado às células um diluidor seminal. Este é resultado da adição de diversos compostos que proporcionam um ambiente favorável para estas células, protegendo-as. Estes diluidores devem apresentar valores de pH e osmolaridade adequados e devem ter a capacidade de proteger a estrutura morfológica do espermatozoide, mantendo-o viável mesmo em frente às injúrias causadas pelo processo de criopreservação (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Contudo, os diluidores padrão utilizados nestas técnicas atualmente utilizam componentes de origem animal, como a gema de ovo e o leite desnatado. Estes são de difícil padronização e apresentam risco de contaminação microbiana. Sendo assim, é de grande interesse desenvolver um diluidor completamente livre de substâncias de origem animal e, preferencialmente, com composição química definida (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et al.*, 2000).

A laranja é o fruto produzido pela laranjeira (*Citrus sinensis*), uma árvore da família *Rutaceae*, do gênero *Citrus* e espécie *Citrus sinensis*. É uma fruta rica em metabólitos secundários, como carboidratos, compostos fenólicos, flavonoides, entre outros (BERNARDI *et al.*, 2010). No Brasil, a laranja-pera (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

é variedade cítrica mais importante, sendo amplamente utilizada pela indústria, assim como pelos mercados internos e externos de fruta fresca.

Como consequência da atividade industrial do processamento de alimentos, como a extração de suco, é gerado um grande volume de resíduos, cuja destinação pode ser problemática, por ocupar grandes espaços, e quando mal gerenciada pode representar riscos ambientais, como a poluição da água e do solo, além dos riscos à saúde da população (FARHAT *et al.*, 2011).

De acordo com a Lei nº 12.305 de agosto de 2010 da Política Nacional de Resíduos e Sólidos (BRASIL, 2020), é preciso que todas as alternativas de aproveitamento tenham sido esgotadas para que um resíduo seja considerado um rejeito. Portanto, se mostra cada vez mais importante o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias que levem ao aproveitamento e transformem estes resíduos em coprodutos.

Diante desse contexto, surge a alternativa do uso da casca de laranja-pera, representando os resíduos da fabricação de sucos, como matéria-prima para produção de coprodutos, como o extrato etanólico bruto e o óleo essencial (FERRONATO; ROSSI, 2018).

Considerando assim, o impacto econômico e a importância ambiental do aproveitamento da casca de laranja, tendo em vista o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato da casca de laranja e do óleo essencial de laranja, este trabalho tem como objetivo avaliar o uso do extrato e do óleo essencial, ambos extraídos da casca de laranja pera na produção de um novo meio diluidor com atividade na conservação seminal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aparelho Reprodutor do Macho Bovino

O aparelho reprodutor do macho bovino é composto por diversos órgãos que atuam em conjunto na produção e liberação de espermatozoides no aparelho reprodutor da fêmea bovina. Esse sistema é composto por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias (próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais) e o pênis (MARQUES FILHO, 2006).

O testículo é um órgão de dupla função, responsável pelo processo de espermatogênese, ou seja, a produção dos espermatozoides e também atua na síntese e secreção de hormônios como a testosterona, progesterona, estrógeno e colesterol (SALES, 2017).

O epidídimo é localizado adjacente ao testículo e apresenta três partes distintas: cabeça, corpo e cauda (MARTINS JUNIOR; FEITOSA, 2008). Ele apresenta diversas funções, como o transporte dos espermatozoides, maturação e armazenamento dos mesmos, e a reabsorção de fluidos nos túbulos seminíferos, controlando a concentração do sêmen (MURADÁS *et al.*, 2006). Nos bovinos, a passagem do espermatozoide pelo epidídimo dura cerca de 10 dias (MARQUES FILHO, 2006).

A cabeça e corpo do epidídimo são os locais em que é feito o transporte e o processo de maturação e capacitação dos espermatozoides. A cabeça do epidídimo também absorve o líquido proveniente dos túbulos seminíferos, resultando no aumento da concentração de espermatozoides por volume. A cauda atua armazenando os espermatozoides maturados até o momento da ejaculação, logo, o volume desta cauda reflete a capacidade de armazenamento do macho (MARQUES FILHO, 2006).

A partir da cauda do epidídimo forma-se a estrutura do ducto deferente ou vaso deferente. Ele atua no transporte dos espermatozoides e fluidos seminais da cauda do epidídimo até a uretra, seja no momento da ejaculação, ou caso não haja este estímulo, têm-se a descarga espontânea dos espermatozoides na uretra, culminando em sua eliminação na urina ((MARTINS JUNIOR; FEITOSA, 2008). Muitas vezes, a colheita e criopreservação dos espermatozoides da cauda do epidídimo se apresenta como a última chance de preservar as células germinativas de animais de alto valor genético, reprodutores de idade avançada ou após a morte do animal (BARBOSA *et al.*, 2012).

O sêmen é composto pelos espermatozoides e pelas secreções das glândulas sexuais acessórias. Estas secreções são chamadas de plasma ou líquido seminal e atuam fornecendo nutrientes, tampões, outras substâncias e aumentando o volume do ejaculado (MARTINS JUNIOR; FEITOSA, 2014).

Por fim, o pênis é o órgão copulador, formado pelo corpo, músculo retrator e pela glândula. O pênis bovino apresenta uma flexura sigmoide ou “S” peniano em situação pós-escrotal (CBRA, 2013).

## 2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo de multiplicação e diferenciação de células germinativas, levando à produção dos gametas masculinos, os espermatozoides. Ela se inicia com as células germinativas primordiais, chamadas de gonócitos, que no interior dos túbulos seminíferos, se multiplicam e se diferenciam em espermatogônias ( $2n$ ) (STAUB; JOHNSON, 2018).

O processo da espermatogênese pode ser dividido em três etapas: 1) a espermatocitogênese ou fase mitótica; 2) a meiose ou fase meiótica; e 3) a espermiogênese. A primeira etapa envolve a proliferação das espermatogônias ( $2n$ ) por mitoses sucessivas e a diferenciação de uma parte delas em espermatócitos primários ( $2n$ ). Na segunda etapa, os espermatócitos primários ( $2n$ ) passam pela primeira meiose (reducional) formando os espermatócitos secundários ( $n$ ) e depois por uma segunda meiose (equacional) formando as espermatídes ( $n$ ). Estas células passam, então, pela terceira etapa, a espermiogênese, na qual ocorre um processo de diferenciação da célula até chegar na estrutura final que é o espermatozoide (MARQUES FILHO, 2006).

Os espermatozoides recém-formados ainda não possuem capacidade fecundante. Eles são liberados dos túbulos seminíferos para os túbulos retos, chegando ao epidídimo, onde passarão por um processo de maturação, adquirindo assim mobilidade e capacidade de fecundação. Os espermatozoides maduros são transportados e armazenados na cauda do epidídimo. Em bovinos, o processo completo dura 61 dias, desde a célula primordial até a maturação (ARRUDA *et al.*, 2015).

### 2.3 A Célula Espermática

Os espermatozoides são células haploides, altamente especializadas que durante a fase final da espermatogênese perderam a habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular, tornando-se aptas, pelo processo de maturação, à fecundação do oócito e formação do zigoto (SILVA *et al.*, 2020). São produzidos no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, por meio da divisão e transformação das células-tronco germinativas. São divididos morfologicamente em cabeça, peça intermediária (ou colo) e cauda (ou flagelo) (ARAÚJO, 2010).

Na cabeça do espermatozoide estão o núcleo e o acrossoma. No núcleo, o ácido desoxirribonucleico (DNA) se encontra altamente condensado, impossibilitando a expressão dos genes e o mecanismo de autorreparo, em caso de dano (CANDEIAS, 2010). O acrossoma é uma vesícula de dupla camada que armazena enzimas hidrolíticas, como a acrosina e hialuronidase. Essas enzimas são fundamentais no processo de penetração do espermatozoide no oócito (PENITENTE FILHO, 2010).

A cauda é a estrutura responsável pelo movimento do espermatozoide e pode ser subdividida em peça intermediária, principal e final. Sua estrutura é composta por nove centríolos, nove pares de microtúbulos periféricos conectados por dineínas e um par central de microtúbulos. As dineínas utilizam a energia gerada pela hidrólise do ATP (adenosina trifosfato) para deslocar os microtúbulos e gerar o movimento da cauda (SILVA *et al.*, 2020).

A membrana plasmática da célula espermática é composta pela bicamada lipídica, onde se encontram fosfolípidios, colesterol, glicolípidios e proteínas. Seguindo o modelo do mosaico fluido, os fosfolípidios da membrana plasmática estão dispostos de forma que as regiões apolares estejam voltadas para o interior da bicamada e as regiões polares estão voltadas para a face externa da membrana, interagindo com a fase aquosa do meio extracelular. Essa estrutura é a mais susceptível a sofrer com as crioinjúrias e sofrer alterações durante o processo de criopreservação (SILVA, 2017).

Diante disto, é de extrema importância que a integridade e funcionalidade da membrana dessas células sejam mantidas, para que estas estejam aptas e sejam capazes de fecundar o oócito. Além disso, lesões nessa estrutura podem levar a distúrbios do equilíbrio osmótico, perda da homeostase e resultar em morte celular (SILVA *et al.*, 2020).

No processo de redução de temperatura, os fosfolipídios da membrana se agrupam e assumem uma forma cônica, com suas extremidades hidrofóbicas (ou apolares) voltadas para o meio extracelular e as extremidades hidrofílicas ficam voltadas para o meio intracelular. Essa estrutura é denominada como forma hexagonal II ou micela invertida. Essa estrutura deve ser transitória apenas durante a mudança da fase fluida (líquida) para a fase cristalina (sólida), mas certos fosfolipídios permanecem com essa alteração (SILVA, 2017). A presença dessas modificações pode afetar a estabilidade da membrana pois pode causar uma permeabilidade excessiva ou até a sua ruptura, levando a morte celular (ARAUJO, 2010).

A proporção entre colesterol e fosfolipídios, o tipo de fosfolipídios presentes e a temperatura do meio determinam o nível de fluidez da membrana. Sabe-se que em espécies que apresentam uma proporção colesterol:fosfolipídio mais alta, encontra-se também uma resistência ao choque frio maior. O colesterol age estabilizando a membrana, pois preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios. Enquanto isso, os glicolipídios presentes na superfície da membrana são responsáveis pela transição da fase de congelamento e descongelamento (COLLODEL *et al.*, 2020).

As mitocôndrias ficam localizadas na peça intermediária, na parte anterior do flagelo, estando posicionadas num arranjo helicoidal (CANDEIAS, 2010). Em mamíferos, um espermatozoide apresenta entre 50 a 75 mitocôndrias. A atividade desta organela envolve a produção de energia para a célula, e para isso, a via metabólica mais utilizada é a fosforilação oxidativa (MORAES, MEYERS, 2018). Pelo que é produzido por esta via, a mitocôndria é considerada a organela mais produtora de espécies reativas de oxigênio (EROs). Nela, os maiores produtores de EROs são os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, contudo, as EROs também podem ser formadas por outras vias dentro desta mesma organela, assim como podem ter origens não-mitochondriais (HAN; WILLIAMS; CADENAS, 2001./AITKEN *et al.*, 2014).

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é a espécie reativa de oxigênio mais produzida pela mitocôndria (TURRENS, 2003). Esse superóxido vai, de forma espontânea, passar pelo processo de desmutagem e formar oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Todavia, esse processo é acelerado na presença de enzimas do tipo superóxido desmutase (SOD). Elas agem como a primeira linha de defesa celular contra o dano oxidativo e, no espermatozoide, estão presentes na peça intermediária para ajudar contra o dano causado pelas ROS (MORAES, MEYERS, 2018).

A mitocôndria é uma das organelas do espermatozoide que sofrem mais danos durante o processo de criopreservação, e acredita estar diretamente relacionada à perda de motilidade e fertilidade após o processo de congelação-descongelação (GONZALES-FERNANDEZ *et al.*, 2012). Essa organela vêm sendo foco de pesquisa, tanto a sua função fisiológica, como o seu potencial biomarcador para saúde e potencial fertilizante do espermatozoide (HU *et al.*, 2017; DARR *et al.*, 2016).

Uma maneira de estudar o estado mitocondrial é pelo uso de diferentes sondas fluorescentes, que detectam mudanças no potencial de membrana da organela. Esse método utiliza da microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo para sua análise e têm-se que a intensidade da fluorescência está relacionada com o potencial de membrana, este, por sua vez, está relacionado à parâmetros de avaliação espermática, como a motilidade (PERRY *et al.*, 2011/ESPINOZA *et al.*, 2009). A sonda majoritariamente utilizada para células espermáticas é a JC-1, ela entra de forma seletiva na mitocôndria se apresentando como um monômero de cor verde, e ao se agregar e formar dímeros, em condições de aumento do potencial de membrana, muda sua fluorescência para cor laranja (MORAES, MEYERS, 2018).

## **2.4 Capacitação e Reação Acrossômica**

A capacitação espermática consiste numa série de eventos em que o espermatozoide obtém a capacidade de fecundar o oócito durante a fecundação (VADNAIS; ALTHOUSE, 2011).

Esse processo acontece de forma gradual durante a passagem do espermatozoide pelo trato genital feminino. Um número de mudanças metabólicas vem sendo associadas à capacitação, entre elas, mudanças na composição da membrana plasmática. Um exemplo é a ação da albumina, que atua na remoção do colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides, dando-a uma maior fluidez (BORGES, 2008).

A capacitação termina com a reação acrossomal, um processo de exocitose onde há liberação das enzimas hidrolíticas, permitindo a penetração dos espermatozoides na zona pelúcida. Essa reação ocorre pela fusão da membrana do acrossoma com a membrana plasmática espermática, resultando na liberação do seu conteúdo (PENITENTE FILHO, 2010).

## 2.5 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica em que células e tecidos biológicos são preservados através da congelação a temperaturas muito baixas (-196 °C). O objetivo principal deste processo é suspender o metabolismo celular, mantendo suas características biológicas e viabilidade por um longo período de tempo (LEON, 2011).

A criopreservação de gametas e embriões têm sido uma etapa importante no progresso e avanço de técnicas como a inseminação artificial (IA), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a superovulação e transferência de embriões (TE) (ALMEIDA, 2020). Além disso, permite o armazenamento de material genético, o melhor aproveitamento de animais de alto potencial genético, transporte do material para várias localidades, assim como a comercialização nacional e internacional de espermatozoides, oócitos e embriões. Atua como técnica coadjuvante no tratamento da infertilidade e permite a formação de bancos de germoplasma, tanto para a preservação de espécies em risco de extinção quanto para animais que são impossibilitados de se reproduzir de forma natural (SILVA *et al.*, 2020).

Apesar de ser um procedimento de rotina em diversos setores, diversas variáveis devem ser levadas em consideração na hora de se desenvolver um protocolo de sucesso. Alguns fatores importantes são a sensibilidade específica de cada célula, baseado em seu tamanho, permeabilidade de membrana, conteúdo lipídico, entre outros (SWAIN; SMITH, 2010).

A criopreservação de sêmen é uma técnica que visa a interrupção artificial do progresso do espermatozoide para a maturação pós-ejaculação, mantendo assim a viabilidade e funcionalidade destas células. Para que exista a suspensão do metabolismo espermático de forma adequada, as amostras de espermatozoides devem ser submetidas a adequados protocolos de refrigeração e congelação, principalmente quanto à velocidade ou taxa de refrigeração e congelação (GROTTER *et al.*, 2018).

De acordo com Watson (2000), o processo de criopreservação resulta em uma fertilidade reduzida quando comparada ao sêmen fresco e este fenômeno ocorre devido à combinação da perda de viabilidade espermática e o comprometimento da função nas populações de espermatozoides sobreviventes ao processo. Conseqüentemente, num protocolo de criopreservação é necessário considerar não apenas o número de espermatozoides sobreviventes, mas também a capacidade funcional desta população.

Dos métodos de criopreservação, os mais comuns são a refrigeração e a congelação. A refrigeração é um método simples, onde as células são mantidas numa temperatura entre 4 a 15 °C durante 24 a 72 horas antes do seu uso. A congelação é um método de conservação na temperatura de -196 °C, por um período indeterminado. Dentro desse método, temos a classificação de acordo com a velocidade ou taxa de refrigeração: congelação lenta, com taxa de refrigeração entre 0,5-1,6 °C/min; congelação rápida, com taxa de refrigeração entre 17-30 °C/min e a congelação ultrarrápido ou vitrificação (LEON, 2011).

A vitrificação envolve rápidas taxas de refrigeração e descongelação na presença de concentrações muito altas de crioprotetores. O protocolo é baseado na breve exposição a soluções com altas concentrações do crioprotetor e em seguida é realizada a imersão direta em nitrogênio líquido. A altíssima velocidade de refrigeração e descongelação resulta numa rápida passagem pela temperatura perigosa (em torno de 0° C), minimizando assim a chance das crioinjúrias. Outras vantagens desse processo são a rapidez na execução, baixo custo e procedimento simples, não requer o uso de aparelhagem de congelação e suas altas taxas de sobrevivência, principalmente na criopreservação de oócitos e embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento (LEON, 2011).

As etapas da criopreservação podem ser resumidas em: 1) adição dos agentes crioprotetores antes da congelação; 2) refrigeração e congelação dos espermatozoides até temperaturas abaixo de zero que permitam o seu armazenamento; 3) estocagem em nitrogênio líquido (-196 °C); 4) descongelação; e 5) remoção dos crioprotetores e restauração do volume e condições isotônicas (GROTTER *et al.*, 2018).

Na primeira etapa, para adição dos agentes crioprotetores, é necessário avaliar e escolher qual será o tempo de exposição a estes, uma vez que o tempo escolhido deve ser suficiente para que haja a desidratação celular, mas que não cause a toxicidade à célula. Na segunda etapa ocorre a distinção entre o método de congelação lenta e rápida. Na terceira etapa, se mantida a temperatura constante, não são observados efeitos deletérios para as células. Na quarta etapa, é quando ocorre a reidratação celular, em que a água extracelular descongela e penetra pela membrana celular. Assim como na congelação, a velocidade desse processo deve ser controlada e específica para cada espécie animal. Na quinta e última etapa, o crioprotetor deve ser removido através de sucessivas lavagens após a descongelação da amostra (LENZ *et al.*, 2018).

Em todas as etapas deste processo as células espermáticas estão sujeitas a danos, como por exemplo: quando há adição dos crioprotetores no início do processo, eles

umentarão a concentração de solutos no meio podendo causar alterações no balanço osmótico. Além disto, os crioprotetores podem apresentar uma toxicidade e causar efeitos deletérios à célula. Durante o processo de congelação, na sua fase inicial, a célula pode sofrer alterações na membrana plasmática e nas estruturas citoplasmáticas, alterando também a permeabilidade da célula. Na fase final da congelação, já em temperaturas bem mais baixas, há formação dos cristais extracelulares, induzindo desidratação e contração da célula, e pode haver formação de cristais intracelulares, também causando danos estruturais à célula. Por último, na fase de descongelação e restauração, pode ocorrer o processo de recristalização no meio intracelular causando dano estrutural, assim como a diminuição da concentração de solutos no meio extracelular pode causar um choque osmótico (PEGG, 2015).

Quanto à taxa de refrigeração durante a congelação, uma vez que esta se apresenta muito rápida, a célula espermática pode ter como consequência a formação de cristais intracelulares. Se esta estiver muito lenta, a célula sofrerá desidratação intensa e apresentará deformações mecânicas, lesões na membrana plasmática, alterações em sua permeabilidade, perda de lipídeos, entre outras alterações. Todas essas alterações podem afetar a capacidade do espermatozoide de se expandir e voltar a sua forma e funções normais quando for recolocado em condições isotônicas (GROTTER *et al.*, 2018).

Logo, a taxa de refrigeração ideal deve ser relativamente rápida, que permita a retirada de água suficiente da célula e com o que leve à formação do mínimo possível de cristais de gelo intracelulares, proporcionando assim boas condições de sobrevivência pós descongelação e reaquecimento (SILVA *et al.*, 2020).

Outros fatores influenciam o sucesso dessa técnica e a sobrevivência celular, como o tipo de diluente, o tipo e concentração dos agentes crioprotetores, a manutenção da temperatura de estocagem, o método de congelação e de descongelação, o método de remoção dos crioprotetores pós-descongelação, entre outros (LENZ *et al.*, 2018).

Durante o processo de criopreservação de sêmen, há uma produção contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), que induzem os processos como a peroxidação lipídica, apoptose, danos ao DNA, entre outros. Estes processos são responsáveis pela redução da qualidade espermática destas amostras, uma vez que a membrana plasmática dos espermatozoides é altamente susceptível ao dano pelas EROS. Por outro lado, em condições fisiológicas, as EROS, em baixas concentrações, são responsáveis pela regulação de diversos eventos fisiológicos nas células (SILVA *et al.*, 2020).

A fim de minimizar os efeitos deletérios da criopreservação e maximizar a taxa de sobrevivência pós-descongelamento, sabe-se que é de extrema importância o desenvolvimento de adequados protocolos de refrigeração e congelamento do sêmen, destacando-se o uso de diluentes, crioprotetores e aditivos que possam atuar na proteção das células espermáticas durante e após o processo de criopreservação (SILVA, 2017).

## 2.6 Diluidores

Apenas o plasma seminal não é capaz de prover uma proteção adequada para os espermatozoides contra a mudança de temperatura durante a criopreservação. Além disso, para a maioria dos animais, os ejaculados contêm um valor bem maior de espermatozoides do que o necessário para fecundação. Por estes motivos, as células espermáticas são acrescidas de diluidores apropriados que fornecerão proteção a estas células contra os danos provocados pelo choque térmico durante este processo, além de fornecerem fontes de energia e atuar com efeito tamponante (SILVA *et al.*, 2020; CÂMARA *et al.*, 2018).

Apesar dos diversos estudos na busca de novos diluidores, os componentes básicos de um diluidor continuam os mesmos, sendo eles: 1) um meio tamponante, uma vez que os espermatozoides apresentam baixa resistência a alterações de pH é necessário neutralizar os íons hidrogênio produzidos pelo seu metabolismo e manter o pH próximo à neutralidade (6,8 a 7,1), sendo os mais utilizados o citrato e o tris-hidroximetilaminometano (Tris), estes também atuam na manutenção da pressão osmótica, mantendo o diluente em um valor próximo ao da pressão do plasma seminal (285 mOsm); 2) fontes ou substratos energéticos como a glicose e frutose; 3) crioprotetores como os açúcares, glicerol, etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO), entre outros, este grupo de moléculas que serão mais discutidos abaixo; 4) antibióticos, a fim de reduzir a transmissão de bactérias patogênicas e não-patogênicas que podem estar presentes no sêmen, sendo os mais utilizados a penicilina, estreptomicina e gentamicina (CASTELO *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2011).

Os diluentes mais utilizados são feitos à base de gema do ovo ou de leite desnatado. Dentre as formulações, a gema de ovo em combinação com o TRIS e o citrato é a mais utilizada. Diluentes utilizados na criopreservação de espermatozoides bovinos apresentam aproximadamente 20% de gema de ovo em sua formulação (SNOECK;

HENRY; MELO, 2007). Têm-se que a função crioprotetora da gema de ovo está relacionada a minimização dos efeitos deletérios do choque térmico (LEITE *et al.*, 2011).

Apesar de ser amplamente utilizado, o uso da gema de ovo ou leite apresentam diversas desvantagens, algumas destas são: a dificuldade em padronizar o diluidor e a falta de padrões de qualidade; riscos higiênicos ao utilizar produtos animais; presença de hormônios esteroides, que podem reduzir a capacidade fertilizante do espermatozoide; risco de contaminação por micro-organismos associados a produtos de origem animal, que podem produzir endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade fertilizante do espermatozoide (SIEME *et al.*, 2016). Além de todas estas questões, o uso de compostos de origem animal é restringido em alguns países, tanto por razões imunológicas quanto por riscos microbiológicos, atuando como possíveis transmissores de doenças (SILVA *et al.*, 2020).

Em decorrência disso, é descrita a busca no desenvolvimento de diluidores que apresentem uma composição livre de produtos de origem animal, utilizando, em sua substituição, produtos de origem vegetal, como a lecitina de soja, água de coco, óleos vegetais, entre outros (CÂMARA *et al.*, 2018).

## 2.7 Crioprotetores

Agentes crioprotetores são substâncias utilizadas na composição dos diluidores com o objetivo de proteger as células contra os danos e injúrias causados pela desidratação, formação de cristais de gelo e choque osmótico durante o processo de criopreservação (SILVA *et al.*, 2020/ SWAIN; SMITH, 2010).

Eles atuam evitando a formação de gelo intracelular e pela redução do estresse osmótico do meio por meio da regulação da dinâmica da água entre o meio intracelular e o meio extracelular durante a congelação. Sendo assim, a maneira como a água interage no interior e fora da célula, e o seu comportamento durante a refrigeração e congelação é o processo mais importante para determinar a viabilidade durante a criopreservação. É necessário entender o funcionamento deste processo pois é por meio dele que grande parte dos crioprotetores atuam (SWAIN; SMITH, 2010).

Os crioprotetores podem ser classificados em dois tipos: penetrantes ou intracelulares e não penetrantes ou extracelulares. Os crioprotetores penetrantes são moléculas de baixo peso molecular, permitindo que transitem com facilidade pela membrana plasmática, e atuam dentro da célula auxiliando-a no processo de desidratação

principalmente em baixas taxas de refrigeração. Neste grupo estão incluídos o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (1-2 propanodiol, propilenodiol), etilenoglicol (1,2 etanodiol), entre outros. (LEITE *et al.*, 2011).

Dentre estes, o mais utilizado e estudado é o glicerol. É um álcool poli hídrico com seis sítios de ligação à água. Foi o primeiro crioprotetor penetrante utilizado com sucesso na criopreservação de espermatozoides de diversas espécies, incluindo os mamíferos (SILVA *et al.*, 2020). Também foi o primeiro a congelar com sucesso oócitos de camundongos. A sua entrada na célula de espermatozoides e oócitos é um processo de difusão onde a aquaporina 3 apresenta importante papel. Sua atuação intracelular inclui a substituição da água intracelular, alteração das propriedades coligativas da solução, com redução do ponto de congelação da água, e pela redução da concentração de sais durante a congelação (LEITE *et al.*, 2011/ SWAIN; SMITH, 2010).

O DMSO é uma molécula anfifílica, solúvel em água e meio orgânico, é comumente utilizado como solvente e apresenta uma elevada capacidade higroscópica por conta da sua afinidade pelo hidrogênio. Foi o crioprotetor usado para congelar os primeiros oócitos humanos que após a descongelação resultaram em nascimentos vivos. E atua pela capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio (SWAIN; SMITH, 2010).

O propilenoglicol foi um dos primeiros crioprotetores penetrantes usados na criopreservação de espermatozoides de mamíferos e de embriões pronucleares humanos. É utilizado em protocolos de criopreservação com refrigeração lento e na vitrificação (CASTRO *et al.*, 2011).

O etilenoglicol (EG) é utilizado em diversos protocolos na literatura na criopreservação de espermatozoides, oócitos e embriões de diversas espécies, como em camundongos e bovinos. Ele possui a vantagem de ser menos tóxico do que outros crioprotetores (CASTRO *et al.*, 2011).

Os crioprotetores não penetrantes apresentam alto peso molecular e por isso são incapazes de entrar na célula por difusão. São mais eficazes quando a taxa de refrigeração é alta. Sua atividade crioprotetora é exercida fora ou na superfície da célula espermática, quando aumentam a osmolaridade do meio extracelular, e por essa diferença de pressão osmótica gerada, induzem a saída de água intracelular, e conseqüentemente há uma diminuição na chance de formação de cristais de gelo no meio intracelular (GROTTER *et al.*, 2018).

Os mais comuns são os açúcares (mono, oligo e polissacarídeos), macromoléculas ou polímeros, e compostos como o leite e a gema de ovo (LEITE *et al.*, 2011). Diferentes açúcares levam a diferentes níveis de proteção durante a criopreservação, pois essa proteção depende tanto composição do diluidor quanto das condições/metodologia de refrigeração. Dentre os monossacarídeos, a glicose, uma hexose, é adicionada em protocolos de criopreservação por ser utilizada pelos gametas e embriões como fonte energética. E apesar de sua atividade crioprotetora não ser amplamente discutida, também é considerada como um agente crioprotetor. Outros monossacarídeos com capacidade crioprotetora são a galactose, frutose e arabinose. Quanto aos dissacarídeos temos a sacarose, trealose, lactose e maltose. E alguns polissacarídeos são a rafinose e o dextrano (SWAIN; SMITH, 2010).

Apesar do propósito dos crioprotetores ser a proteção e prevenção do dano na criopreservação, quando utilizados de forma inadequada e/ou em altas concentrações, eles atuam negativamente no sucesso da técnica, por sua toxicidade (SILVA *et al.*, 2020). Em geral, a maior toxicidade está relacionada aos crioprotetores penetrantes em comparação aos não penetrantes. Contudo, outros fatores afetam o nível de toxicidade de um crioprotetor, por exemplo: o tempo de exposição, concentração, temperatura de exposição, entre outros.

Para aliviar estes danos, uma prática comum é a utilização de mais de um agente crioprotetor, com a combinação de crioprotetores dos dois tipos, penetrantes e não-penetrantes. Além disso, os diferentes protocolos de adição e remoção dos crioprotetores também atuam como ferramentas que permitem reduzir a toxicidade e o dano de modo geral. A adição gradual ou em concentrações gradualmente crescentes dos crioprotetores têm sido úteis neste propósito. Juntamente, a remoção gradual desses compostos após o aquecimento/descongelamento também ajuda a minimizar o estresse osmótico (SWAIN; SMITH, 2010).

Variáveis como tipo de célula, tamanho e permeabilidade da membrana são fatores importantes na hora de escolher os crioprotetores apropriados para cada caso. Essa complexidade de fatores reforça a ideia de que nenhum crioprotetor ou diluidor pode funcionar como procedimento padrão universal. Ainda há muito espaço para melhoramento e para o desenvolvimento de novos diluidores, com formulações que incluam novos agentes crioprotetores, testes de suas diferentes concentrações e também a combinação destes com outros compostos (SWAIN; SMITH, 2010).

## 2.8 A Laranja e a Produção Brasileira

A laranja é o fruto produzido pela laranjeira (*Citrus sinensis*), uma árvore da família *Rutaceae*. É considerado um fruto híbrido, criado na antiguidade a partir do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a tangerina (*Citris reticulata*). Apresenta forma esférica ou oval, casca fina e rugosa, e coloração amarelada a alaranjada. Anatomicamente pode ser dividida em três regiões: o epicarpo, mais conhecido como “casca” ou flavedo; o mesocarpo, também chamado de albedo; e o endocarpo popularmente chamado de “gomo” ou “polpa” (BENELLI, 2010).

É uma fruta rica em metabólitos secundários, como carotenoides, carboidratos, antocianinas e antioxidantes (BERNARDI *et al.*, 2010). Além disto, também apresenta óleos essenciais (compostos por hidrocarbonetos e compostos derivados oxigenados) que estão contidos em glândulas localizadas na camada mais externa da casca (AZAR *et al.* 2011). Estas glândulas consistem de cavidades secretoras revestidas por diversas camadas de células epiteliais especializadas (VOO; GRIMES; LANGE, 2012).

Assim como todas as plantas cítricas, a laranjeira é considerada nativa das regiões tropicais e subtropicais do sudoeste da Ásia, de onde se espalhou para os outros continentes (NICOLOSI *et al.*, 2000). A descrição mais antiga de cítricos aparece na literatura chinesa, por volta do ano 2000 a.C. A laranja foi levada inicialmente da Ásia para o norte da África e, em seguida, para o sul da Europa, chegando por volta da Idade Média. A partir da Europa, a laranjeira foi trazida para as Américas por volta do ano 1500 (BENELLI, 2010).

Ao se espalhar pelo mundo, a fruta sofreu mutações e deu origem a novas variedades, com modificações no sabor, aroma, cor, tamanho dos frutos, composição química, entre outros aspectos (LEÃO, 2015).

A partir da década de 1930, a laranja foi introduzida como parte das exportações brasileiras e em 1939, ela se tornou um dos dez produtos mais importantes no setor de exportação do país. Na década de 1980, o Brasil se tornou o maior produtor mundial de laranjas, assim como tornou-se líder na produção de suco desta fruta (BENELLI, 2010).

Dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (também conhecida como FAO; Food and Agriculture Organization of the United Nations) referentes aos anos de 2000 a 2018, mostram um crescimento tanto na área mundial colhida de laranjas, quanto na produção mundial das mesmas. Os dados também apontam a prevalência do continente americano na produção mundial de laranjas por

região, com 50,9% do total. Ainda referente a este período, o Brasil ocupou o primeiro lugar na lista dos 10 maiores países produtores de laranja do mundo. Ao analisar apenas os dados do ano de 2018, sendo estes os dados disponíveis mais recentes, têm-se que a área mundial de laranjas colhidas foi de 4,46 milhões de hectares e a produção mundial de laranjas foi de 75,41 milhões de toneladas. O continente americano ficou em primeiro lugar na produção mundial no ano de 2018, com 40,4%. E o Brasil ficou em primeiro lugar na lista dos 10 maiores produtores de laranja mundial, com uma produção de 16,71 milhões de toneladas.

A laranja-pera (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é variedade cítrica mais importante no Brasil, sendo amplamente utilizada pela indústria, como também pelos mercados internos e externos de fruta fresca. Essa importância se dá pelo seu bom rendimento industrial e a qualidade de seu suco, uma vez que o mercado consumidor brasileiro dá preferência para esta variedade, tanto para o consumo direto, quanto para a extração e consumo do suco (MELO, 2013).

Uma das consequências das atividades industriais de processamento de alimentos, como a extração de suco, é a geração de grandes volumes de resíduos, cuja destinação pode ser problemática, por ocupar grandes espaços, e quando mal gerenciada pode representar riscos ambientais, como a poluição da água e do solo, além dos riscos à saúde da população (FARHAT *et al.*, 2011).

De acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos, Lei nº 12.305 de agosto de 2010, para que um resíduo seja considerado rejeito é preciso que tenham se esgotado todas as oportunidades de aproveitamento (BRASIL, 2010). Dessa forma, a minimização e a valorização dos resíduos contribuem para a redução do impacto ambiental relacionado com seu descarte e destinação final, bem como a obtenção de produtos com alto valor agregado, como a pectina e o óleo essencial, gerando benefícios ambientais e econômicos (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012).

Sendo assim, pesquisas que apontem soluções para o aproveitamento integral e transformação destes resíduos em coprodutos são cada vez mais necessárias, indo ao encontro da Lei nº 12.305, minimizando os impactos ambientais e estimulando o desenvolvimento de novos produtos pelo mercado brasileiro (DEITOS *et al.*, 2014).

## 2.9 Extrato da Casca de Laranja

O extrato da casca de laranja vem se mostrando importante pelo seu potencial antioxidante. Provenientes da composição química da laranja, destacam-se moléculas como o ácido ascórbico, compostos fenólicos como flavonoides, carotenoides,  $\beta$ -caroteno e limonoides. A relevância destes compostos é justamente dada às suas propriedades antioxidantes, uma vez que podem inibir a oxidação causada por espécies reativas de oxigênio (CARVALHO *et al.*, 2020).

Esta função antioxidante pode ser confirmada por Abdelghffar *et al.* (2021), que, ao testar o uso do extrato de casca de laranja em ratos induzidos à toxicidade quimioterápica, obtiveram resultados significativos de diminuição dos marcadores de inflamação (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6) e do marcador de peroxidação lipídica (MDA), além do aumento dos níveis antioxidantes.

## 2.10 Óleo Essencial da Laranja

De acordo com a Organização Internacional para Padronização (ISO) 9235:2013, na seção 2.11, o óleo essencial (OE) é definido como o produto obtido a partir da matéria-prima natural de origem vegetal, por meio da destilação a vapor ou por processos mecânicos utilizando o epicarpo de cítricos ou pela destilação a seco para madeiras, sendo feita a devida separação da fase aquosa, se houver, por processos físicos. Ainda neste documento, é descrito que o OE pode passar por tratamentos físicos que não resultam em diferença significativa de sua composição, como processos de filtração, decantação e centrifugação.

Os óleos essenciais são considerados fonte de substâncias naturais que possuem diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antinociceptiva, anti-inflamatória e inseticida. Na planta, o seu papel biológico inclui a atração de insetos polinizadores, atividade como mensageiros internos e atuam também como substâncias protetoras contra herbívoros (JACOB *et al.*, 2017).

São diversos os métodos de extração dos OEs, entre eles temos a hidrodestilação. Após a purificação, os óleos essenciais podem ser detectados e quantificados por diferentes métodos, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), a cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama (CG-FID),

ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida de ultradesempenho acoplado à espectrometria de massa de alta resolução tipo tempo de voo, entre outros (BORA *et al.*, 2020)

A composição dos OEs é basicamente composta por uma mistura de substâncias de baixo peso molecular, em sua maioria, pertencentes ao grupo dos terpenos, incluindo os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, entre outros grupos funcionais. Estes componentes são formados a partir de três vias biossintéticas: a) via do fosfato metileritritol (MEP), que leva aos monoterpenos e diterpenos; b) via do ácido mevalônico, que leva aos sesquiterpenos; e c) via do ácido chiquímico, que leva aos fenilpropanoides. A quantidade relativa destas substâncias no OE é bastante variável, sendo influenciada por vários fatores, como clima, local de cultivo, genótipo da planta, etc (JACOB *et al.*, 2017).

O Brasil se destaca principalmente na produção de OE de cítricos, em especial o da laranja, como um subproduto da indústria de suco. Estima-se que o mercado do óleo essencial de laranja alcance o valor de 6,31 bilhões de dólares americanos (USD) até 2022 e 8,49 bilhões de USD até 2027. Isso significa um aumento recorde aproximado de 6,9% (ZHANG *et al.*, 2022).

O OE de *Citrus*, mais especificamente da laranja, é extraído de sua casca, sendo assim considerado um subproduto da indústria. A atividade industrial tem como consequência a geração de resíduos, cuja destinação, quando mal gerenciada, pode apresentar riscos ao meio ambiente e à saúde da população (FERRONATO; ROSSI, 2018).

O Brasil é destaque na produção de OEs cítricos, se encontrando entre os quatro maiores produtores mundiais. Isto se dá pois o OE é subproduto da indústria de sucos (JACOB *et al.*, 2017). Além disto, a avaliação de aspectos econômicos e sustentáveis feita por Tranchida *et al.* (2011) indicou que a produção de OE no Brasil não apenas é viável, como é atividade rentável, considerando o mercado brasileiro e mundial. Esta previsão pôde ser confirmada por Simas *et al.* (2015), que cita o Brasil como terceiro maior exportador de OEs do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos da América e França, sendo os óleos de frutas cítricas responsáveis por aproximadamente 90% destas importações.

Na natureza, estes óleos são sintetizados pela planta como metabólitos secundários e contribuem para o crescimento e proteção da mesma contra agentes

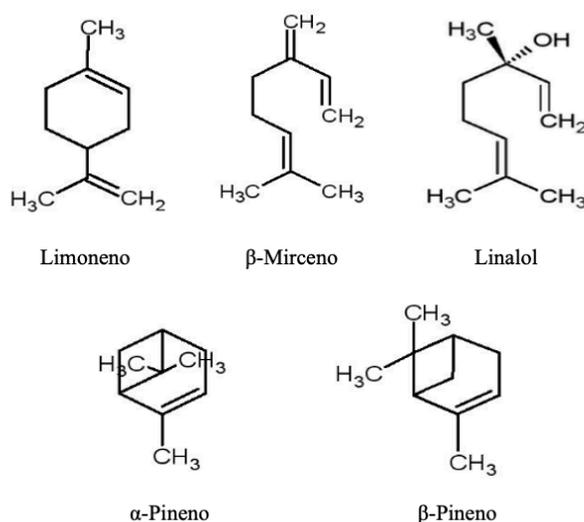
microbianos e/ou insetos. Ficam localizados principalmente na casca e em pequena quantidade nas folhas (RAZOLA-DÍAZ *et al.*, 2021).

Apresenta atividade antioxidante, antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória, anticancerígena, cardioprotetora, neuroprotetora, entre outras (MAGALHÃES *et al.*, 2020). A maior aplicação destes óleos se dá na indústria alimentícia e farmacêutica, além dos campos da perfumaria e cosmética, podendo atuar como conservante alimentício, saborizante, componente aromático, entre outras funções (LU *et al.*, 2019).

A composição química do OE de laranja já vem sendo amplamente explorada na literatura. Sabe-se que essa composição varia de acordo com a variedade da fruta, seu genótipo, estação do ano e localização geográfica do cultivo, estágio de maturação da fruta no momento da extração do óleo, parte da planta utilizada (cascas, folhas, flores, etc), entre outros fatores. Quanto à composição, estudos mostraram que os compostos voláteis são os componentes em maior quantidade nos OEs de laranja, chegando a representar entre 85%-95% do total (BORA *et al.*, 2020).

Em relação à laranja-pera (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) relata-se que o principal componente deste óleo é o limoneno, constituindo cerca de 90,5% da composição do óleo. Os outros componentes, que após o limoneno, se encontram em maior quantidade nesta variedade são o  $\beta$ -mirceno, linalol e o  $\alpha$ - ou  $\beta$ -pineno (Figura 1) (CHUTIA *et al.* 2009; GONZÁLEZ-MAS *et al.* 2019; GUO *et al.* 2018).

**Figura 1** - Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial de laranja



Fonte: CHUTIA *et al.* (2009)

Dentre as diversas aplicações citadas acima, o potencial antioxidante do OE de *Citrus* têm sido alvo de interesse pelos pesquisadores, sendo realizados testes do óleo em sua totalidade, como também a determinação da contribuição individual dos componentes do óleo nesta função antioxidante (MAHATO *et al.*, 2019).

Temos então que este potencial antioxidante do OE de laranja, acompanhado de seu alto poder antimicrobiano, pode indicar que o seu uso como um crioprotetor dentro da formulação de um diluidor seminal seja benéfico no processo de criopreservação (SITEPU *et al.*, 2018; SITEPU; MARISA, 2019; SITEPU *et al.*, 2020).

### 2.10.1 Terpenos

A energia necessária para o crescimento e desenvolvimento da planta vem dos processos de fotossíntese, respiração e transpiração. Essa energia é armazenada em forma de moléculas primárias que a planta pode utilizar posteriormente. Estes metabólitos primários são os carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Contudo, durante os ciclos de crescimento e reprodução, a planta passa por diferentes estresses, incluindo as condições climáticas e o aparecimento de pestes e animais herbívoros. A planta então produz diferentes grupos de compostos, chamados metabólitos secundários, que são utilizados para defesa da planta nestas situações (SOMMANO *et al.*, 2020).

Os terpenos e seus derivados são os maiores constituintes dos OEs, estes são metabólitos secundários produzidos por diversas espécies de plantas e algumas de suas funções nestas são a aclimação, o mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos, o processo de desenvolvimento fisiológico por meio da transdução de sinal, reprodução e comunicação celular (VIEIRA *et al.*, 2018; TETALI, 2019) Além das plantas, os terpenos também podem ser produzidos por fungos e bactérias (WANG *et al.*, 2018). Possuem baixa massa molecular e são compostos altamente lipofílicos (GREEN; CLUNAS; NARANJO, 2021).

A estrutura química básica de um terpeno consiste em uma unidade de isopreno (2-metil 1,3-butadieno). A classificação dos terpenos é feita a partir do seu número de carbonos (C), temos então: hemiterpenos (5 carbonos ou 5C), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (nC) que possuem um número de carbonos maior que 45 (SRIVASTAVA; SINGH, 2020/PEREIRA *et al.*, 2018).

Esses compostos fitoquímicos são produzidos por duas vias biossintéticas dentro da célula vegetal, sendo a via do mavelonato (MVA) e a via alternativa ao mavelonato,

também conhecida como via do 2-metil-eritritol-4-fosfato (MEP) ou também por via do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP). A via do MVA ocorre no citosol enquanto que a via do MEP é feita nos plastídeos ou cloroplastos (SOMMANO *et al.*, 2020).

A via do MVA ocorre no citosol da célula vegetal e começa com a conversão do acetoacetil-CoA nos intermediários de 5 carbono, o isopentenil difosfato (IPP) e o seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). O IPP e o DMAPP são condensados em cadeias mais longas que serão substrato para formação das diferentes classes de terpenos. Alguns produtos desta etapa são o geranyl difosfato (GPP) e o farnesil difosfato (FPP). Neste processo, um conjunto de enzimas especializadas conhecidas como terpeno sintases catalisam a formação dos terpenos. No caso da via do MVA, o FPP formado na condensação do IPP e DMAPP levará à formação de sesquiterpenos e triterpenos (SOMMANO *et al.*, 2020).

A via do MEP ocorre nos plastídeos da célula vegetal e se inicia com a conversão do piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em IPP e DMAPP. Após a etapa de condensação, o GPP resultante será o precursor dos monoterpenos, diterpenos e carotenoides (GREEN; CLUNAS; NARANJO, 2021).

Os monoterpenos constituem uma classe de terpenos onde há presença de duas unidades de isopreno, totalizando 10 carbonos e com fórmula química de  $C_{10}H_{16}$ . Sua estrutura química pode ser acíclica (linear) ou cíclica. Podem apresentar duplas ligações, grupos hidroxil, carbonil, acetóxi, entre outros. Eles representam mais de 80% da composição dos óleos essenciais de diversas plantas e são amplamente utilizados como saborizantes e aromatizantes nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e produtos de limpeza. Além disto, estão presentes em produtos farmacêuticos por suas diversas atividades biológicas (PEREIRA *et al.*, 2018).

### **2.10.1.1 Limoneno**

O limoneno (1-metil-4-(prop-1-en-2-il) ciclohex-1-eno) é um dos tipos mais comuns de terpenos encontrados na natureza. Sua fórmula química é  $C_{10}H_{16}$ , se apresenta por um líquido incolor a temperatura ambiente e possui um centro quiral. Pela presença deste centro, apresenta isomeria óptica, existindo então dois isômeros ópticos, chamados de D-limoneno e L-limoneno em uma mistura racêmica dipenteno. A nomenclatura correta de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) é R-limoneno e S-limoneno, contudo são mais frequentemente utilizados os prefixos D e L (ANANDAKUMAR; KAMARAJ; VANITHA, 2020).

O D-limoneno é o componente majoritário dos óleos essenciais das cascas de *Citrus*, como a laranja e o limão, podendo atingir concentrações de 90-95% por peso do óleo essencial. Possui um aroma agradável semelhante ao limão, este cheiro faz com que ele seja amplamente utilizado como saborizante e aromatizante em diversos alimentos, como sucos, doces, refrigerantes, entre outros. Além disto, é bastante utilizado na indústria cosmética, sendo encontrado em produtos como sabonetes, perfumes, xampus, condicionadores e géis de banho. É utilizado também na confecção de materiais de limpeza, produção de pesticidas, repelentes, como solvente para extração de produtos naturais e para síntese de outros compostos químicos (VIEIRA *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2013).

O limoneno apresenta efeitos anti-inflamatórios, antidiabéticos, antioxidantes, anticâncer, antialérgico, antinociceptivo, além de ter efeitos positivos no tratamento de úlceras gástricas, colites, asma e outras inflamações das vias aéreas, entre outras atividades (VIEIRA *et al.*, 2018). O D-limoneno possui atividade antioxidante e esta propriedade está diretamente relacionada com a captação dos radicais livres que induziriam o dano celular e pela inibição da peroxidação lipídica (MAHMOUD *et al.*, 2020).

A biossíntese do limoneno ocorre nos plastídeos pela via do 2-metil-eritritol-4-fosfato (MEP). A última reação desta via biossintética envolve a ciclização do GPP para formar o limoneno, este processo é catalisado pela enzima limoneno sintase (ANANDAKUMAR; KAMARAJ; VANITHA, 2020). Após formado, este limoneno atua como substrato para formação de diversos outros monoterpenos monocíclicos., como a carvona e o carveol (pela hidroxilação da posição 6), o álcool perílico, o aldeído perílico e o ácido perílico (pela hidroxilação da posição 7), entre outros (MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007).

## 2.11 Nanoemulsões

Uma nanoemulsão (NE) pode ser definida como a dispersão nanométrica de uma fase líquida em outra a qual ela não é solúvel. Ela é normalmente composta por uma fase oleosa, uma fase aquosa e um surfactante (SAKAMOTO *et al.*, 2017).

A fase oleosa pode ser composta por um óleo carreador, no qual o composto bioativo estará dissolvido, ou pode ser o próprio ativo, como é o caso dos óleos essenciais

(PAVONI *et al.*, 2020). As propriedades da NE formada, assim como a sua estabilidade, são fortemente influenciadas pelas propriedades físico-químicas do óleo utilizado, como por exemplo: a viscosidade, a tensão interfacial, a polaridade, a densidade e o índice de refração (MC CLEMENTS; RAO, 2011).

Quanto à estas propriedades, sabe-se que óleos com baixa viscosidade e baixa tensão interfacial requerem um menor tempo e menos energia externa para formar uma NE (WALSTRA, 1993). Em relação à polaridade, óleos altamente hidrofóbicos têm maiores dificuldades para formarem uma NE pelo método de inversão de fase (WITTHAYAPANYANON *et al.*, 2006).

De modo geral, deve-se atentar para a inclinação do óleo para fenômenos de instabilidade, como a cremagem, floculação, coalescência e amadurecimento de Ostwald. Todos estes citados são mecanismos comuns de desestabilização das NEs (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

Os surfactantes fazem parte da composição básica de uma NE. Estes são compostos anfífilicos, ou seja, possuem na mesma estrutura molecular domínios hidrofílicos e lipofílicos, e como resultado, estas moléculas se organizam na interface entre a fase aquosa e a fase oleosa, diminuindo a tensão superficial entre elas. Assim, permitindo a dispersão de uma fase na outra, resultando em uma emulsão estável entre estas fases (MORENO-TREJO *et al.*, 2019).

A nanoemulsão é um tipo de emulsão, em que é utilizado o prefixo “nano-“ pra indicar que as partículas dispersas na solução apresentam tamanho dentro da escala nanométrica. Esta escala, por sua vez, não é apresentada como sendo um consenso entre os autores, tendo que alguns consideram o valor máximo como sendo 100 nanômetros (nm), 200 nm ou 500 nm (PAVONI *et al.*, 2020).

A estrutura das partículas formadas numa NE é composta por um centro (óleo) envolvido por uma monocamada ou por multicamadas do surfactante. Este apresenta sua cauda apolar voltada para o núcleo lipofílico e a cabeça polar voltada para o meio aquoso. Seu formato resultante é geralmente esférico (BONACUCINA *et al.*, 2009).

Uma NE é considerada como sendo um sistema energeticamente desvantajoso, pois as fases separadas possuem pouca energia livre necessária para formação do sistema coloidal. Com isso, é necessária a adição de energia externa ao sistema, permitindo ultrapassar essa diferença de energia entre as fases e o sistema coloidal. Assim, quanto à forma em que a energia externa vai ser provida ao sistema, os métodos de preparação das

NEs podem ser divididos em: métodos de alta energia e métodos de baixa energia (PAVONI *et al.*, 2020).

Os métodos de baixa energia consistem basicamente de duas etapas: inicialmente uma diluição por agitação da fase oleosa (óleo + surfactante) e depois, a adição da fase aquosa no sistema. Ocorre, neste caso, uma transformação de uma emulsão inicialmente de água em óleo, para uma nanoemulsão de óleo em água. Por esse motivo, os métodos de baixa energia também podem ser chamados de métodos de inversão de fase. Esse método é efetivo quanto à produção de nanoemulsões com pequeno tamanho de partículas, mas é limitado quanto aos tipos de óleos e surfactantes que podem ser utilizados. Além disso, normalmente exige uma quantidade um pouco maior de surfactante na formulação (PAVONI *et al.*, 2019).

Os métodos de alta energia também atuam em dois passos: primeiramente a formação de uma emulsão por agitação mecânica e depois, a conversão da emulsão à nanoemulsão, com a quebra das partículas em tamanhos menores. Essa quebra é feita com o auxílio de equipamentos de alta energia, como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e sonicadores (GUPTA *et al.*, 2016). Os métodos de alta energia permitem o uso de uma variedade maior de óleos e surfactantes, conferindo maior versatilidade no uso. Para estes, o tamanho das partículas da NE depende da intensidade e duração da fonte de energia, juntamente do tipo de surfactante utilizado e das propriedades do óleo (MC CLEMENTS; RAO, 2011).

A técnica de alta energia por sonicação utiliza ondas ultrassônicas de alta intensidade para transformar a emulsão em uma nanoemulsão (PAVONI *et al.*, 2020).

Dentre os outros tipos de emulsões, a NE é a mais utilizada por necessitar de baixas quantidades de surfactantes, garantindo mais segurança e menos toxicidade em seu uso. Além disso, ela é capaz de ser formulada com uma ampla variedade de surfactantes, enquanto que outras emulsões só permitem o uso de algumas moléculas para essa função (KALE; DEORE, 2016).

É de extrema importância avaliar a NE formada, pois cada formulação utiliza uma combinação específica de fase oleosa, fase aquosa e agentes surfactantes, e é descrito que a natureza e a quantidade destes compostos exercem grande influência no resultado final, tanto para estabilidade quanto para as funções biológicas (KAUR e MEHTA, 2017).

### **2.11.1 Polissorbato 80**

O polissorbato 80 (P80), também conhecido como Tween 80, é um tipo de surfactante pertencente a família dos polissorbatos. Sua fórmula molecular é  $C_{58}H_{124}O_{26}$  e quimicamente, os polissorbatos são derivados do éster de sorbitano etoxilado (derivado da desidratação do sorbitol) esterificado com ácidos graxos. O número apresentado após o nome “polissorbato” está relacionado ao tipo de ácido graxo associado a parte de polietilenoglicol da molécula. Neste caso, para o P80, o número 80 está representando o ácido oleico (MORENO-TREJO *et al.*, 2019).

A afinidade para grupos polares (água) ou não-polares (óleo) é diferente para os diferentes tipos de surfactantes. Essa medida é feita utilizando um valor na escala de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB, do inglês *hydrophilic-lipophilic balance*) (SALAGER *et al.*, 1982), este é um número empírico com valores que variam entre 0 a 20. Esta escala leva em consideração a contribuição das partes polares e apolares da molécula. Para um surfactante não-iônico, um valor de HLB de 0 corresponde a uma molécula completamente lipofílica, enquanto um valor de 20 corresponde a uma molécula completamente hidrofílica (GRIFFIN, 1954). O valor do HLB do P80 é de 15, e por se tratar de um valor mais próximo do 20, conclui-se que esse composto possui características mais hidrofílicas do que lipofílicas (PAVONI *et al.*, 2020).

O P80 é frequentemente utilizado como emulsificante na indústria farmacêutica (KAUR; MEHTA, 2017), alimentícia e de cosméticos (ANANDHI *et al.*, 2020), apresentando-se biocompatível e não-tóxico (MORADI; BARATI, 2019). Além disso, o P80 é comumente utilizado para a formulação de nanoemulsões. A razão está na comum utilização de surfactantes, para tal função, com valores de HLB intermediários e altos, geralmente entre 11 e 16, faixa em que se encontra o P80 (PAVONI *et al.*, 2020).

Quanto à toxicidade dos polissorbatos, o trabalho de NOUDEH *et al.* (2008) avaliou o efeito dos polissorbatos 20, 40, 60 e 80 na membrana de eritrócitos e demonstrou que o P80 apresentou baixos níveis de toxicidade e baixa porcentagem de hemólise quando em comparação aos outros surfactantes testados. Os autores indicaram que os baixos níveis de toxicidade do P80 estavam correlacionados com seu baixo valor de HLB.

Quanto à atividade antimicrobiana dos polissorbatos, KAUR e MEHTA (2017) discorrem que estes compostos não apresentam esta atividade quando se apresentam sozinhos, contudo, eles são capazes de formar emulsões e nanoemulsões que podem agir aumentando a permeabilidade e fluidez membranar da célula, resultando em uma possível atividade microbiana.

Sabe-se que quanto mais próximo for o valor de HLB do surfactante e o valor do óleo, será formada uma nanoemulsão mais estável e com menores tamanhos de partícula (FERNANDES *et al.*, 2013). Baseado nisso, VAN DAT *et al.* (2020) descrevem o Polisorbato 80 como sendo o melhor estabilizador de superfície para emulsões que utilizem os óleos essenciais de laranja.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito dos diluidores a base de óleo essencial e do extrato bruto da casca de laranja-pera na conservação de espermatozoides epididimários bovinos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Extrair o óleo essencial e o extrato bruto da casca de laranja-pera;
- Produzir um diluidor a base do óleo essencial da casca de laranja-pera;
- Elaborar um diluidor a base do extrato bruto da casca de laranja-pera;
- Verificar a eficácia do diluidor a base de óleo essencial e do extrato bruto da casca de laranja como crioprotetores, em diferentes concentrações;
- Identificar a eficácia da adição do óleo essencial e do extrato bruto da casca de laranja-pera ao diluidor Tris-gema na criopreservação de espermatozoides epididimários de bovinos;
- Examinar a motilidade espermática, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade acrossomal de espermatozoides epididimários bovinos antes e após a criopreservação espermática em diluidores com diferentes concentrações do óleo essencial e do extrato bruto da casca de laranja-pera.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do diluidor a base do extrato bruto da casca de laranja-pera.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Experimento I - Óleo essencial da casca de laranja

#### 4.1.1 Obtenção e preparação da casca para extração do óleo essencial

Foram utilizadas laranjas do tipo pera (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) compradas em um supermercado local na cidade de João Pessoa-PB nas coordenadas 7°06'35.5"S 34°49'55.3"W. Todas as frutas escolhidas se encontravam no estágio maduro, prontas para consumo e sem grandes manchas, deformidades ou danos em sua estrutura (Figura 2A).

Inicialmente, as frutas foram lavadas em água corrente e então tiveram suas cascas retiradas utilizando uma faca inox. Estas foram colocadas em um recipiente e foram reservadas para análises posteriores (Figura 2B). As frutas foram pesadas logo após sua lavagem, assim como foram pesadas as suas respectivas cascas.

As cascas foram cortadas em pedaços uniformes no primeiro conjunto de extrações. Mas buscando um maior volume de óleo essencial e um maior rendimento, no segundo conjunto de extrações, as cascas foram trituradas em um liquidificador com água destilada. Esta mistura foi feita logo antes de iniciar a extração do óleo essencial.

**Figura 2** - Aspecto visual das laranjas e cascas utilizadas para obtenção do óleo essencial e extrato bruto



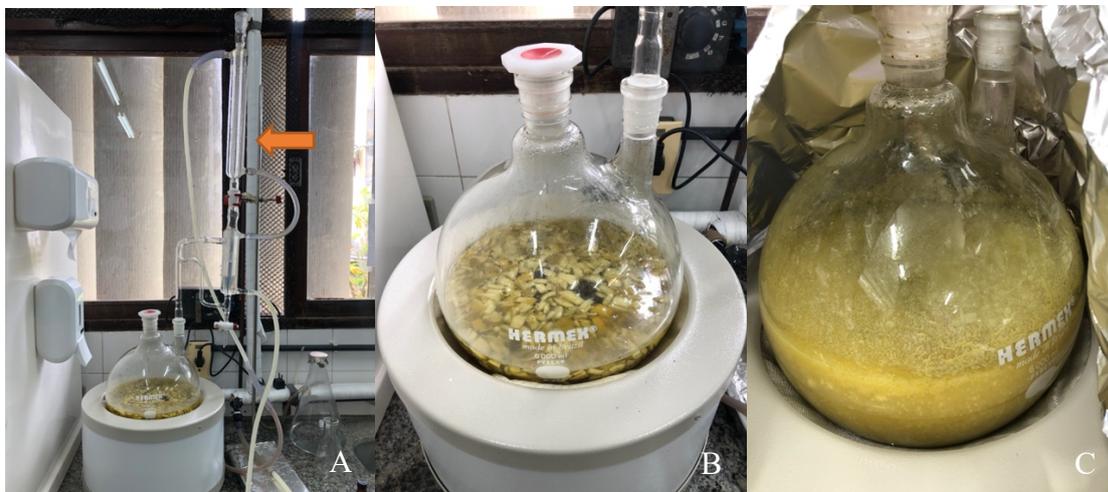
Fonte: Autora, 2022.

#### 4.1.2 Extração do óleo essencial

A extração foi feita pelo método de hidrodestilação, em aproximadamente três horas de duração e utilizando o aparelho de Clevenger (Figura 3A). A mistura de casca de laranja e água destilada foi colocada dentro de um balão de destilação para a extração. A extração foi feita inicialmente com a casca de laranja cortada em pedaços pequenos

(Figura 3B), mas foi repetida com a casca triturada em liquidificador com a água destilada (Figura 3C). Seguiu-se os mesmos parâmetros da técnica para ambas as repetições.

**Figura 3** – Extração do óleo essencial da casca de laranja



Fonte: Autora, 2022.

Nas três primeiras extrações, com a casca cortada em pedaços, utilizou-se 300 g de casca e 3 litros de água destilada por extração. Nas três últimas extrações, com a casca triturada, utilizou-se 1,0 kg de casca e 3,0 litros de água destilada por extração. O balão de destilação contendo a mistura foi aquecido por uma manta elétrica até o líquido entrar em ebulição, um tempo de aproximadamente 30 minutos. Neste processo, a água e o óleo essencial foram evaporados e passaram pelo condensador presente no equipamento, onde voltaram novamente à fase líquida. Pela diferença de densidade, o óleo essencial se formou acima da fase aquosa, também chamada de hidrolato, na porção final do condensador. Ao final da extração, esta mistura foi coletada em um Erlenmeyer e foi transferida para um frasco âmbar hermeticamente fechado, que foi mantido em baixas temperaturas até a separação do óleo essencial com o hidrolato remanescente da coleta.

Após ter sido recolhido e colocado no frasco âmbar, para obtenção do óleo essencial puro foi necessário separá-lo do hidrolato ainda presente. O frasco foi retirado do congelador, e uma vez que a fase aquosa (inferior) estava congelada em sua totalidade, mas não a fase oleosa (superior), foi feita a retirada da fase superior por meio de pipetagem. Aferiu-se o volume e pH do óleo e este foi recolocado no frasco âmbar, devidamente identificado (Quadro 1) e hermeticamente fechado, e recolocado na geladeira.

**Quadro 1** - Descrição dos óleos essenciais obtidos após cada extração

<b>Grupos</b>	<b>Origem do óleo essencial</b>
<b>EA1</b>	1ª Extração casca cortada
<b>EA2</b>	2ª Extração casca cortada
<b>EA3</b>	3ª Extração casca cortada
<b>EN1</b>	1ª Extração casca triturada
<b>EN2</b>	2ª Extração casca triturada
<b>EN3</b>	3ª Extração casca triturada

Para que não houvesse alteração na composição química do óleo essencial utilizado para as análises realizou-se uma mistura na proporção de 1:1:1 com 20 mL de cada óleo essencial obtido das três últimas extrações (EN1, EN2 e EN3). Esta mistura foi agitada e mantida uma pequena quantidade em um frasco âmbar menor, fechado (este óleo foi intitulado de MTA) e que não foi manuseado durante os experimentos, e a maior parte foi mantida em um frasco âmbar de 100 mL, o qual esteve em constante uso, sendo exposto à variação de temperatura, abertura do frasco e manuseio, com maior risco de variação da sua formulação por se tratar de compostos voláteis (este óleo foi intitulado de MTN). Além destas amostras, a fim de comparar os resultados do óleo extraído, a maior parte dos experimentos foi realizado também com o óleo essencial de laranja-pera LFC GT Brasil da marca Laszlo (OLZ).

O cálculo do rendimento (%) de cada extração foi feito pela divisão do volume (L) do óleo essencial obtido pelo peso (Kg) de casca utilizado naquela extração, este valor multiplicado por 100 (SUNDARARAJAN *et al.*, 2018).

#### **4.1.3 Caracterização do óleo essencial**

##### ***Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)***

Os compostos presentes no óleo essencial foram identificados por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foi realizada a injeção das amostras (EA1, EA2, EA3, EN1, EN2, EN3, MTA, MTN e OLZ) no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (modelo GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu), com a coluna da marca RTX-5MS capilar (5% Difetil/95% Dimetil polissiloxano) com tamanho de 30,0 m (comprimento), 0,25 mm (diâmetro interno)

(Figura 4). Os índices de retenção foram calculados através da equação de Van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963) e comparadas à literatura juntamente aos seus respectivos espectros e massas (Equação 1).

Equação 1 - Equação de Van Den Dool e Kratz

$$IR = 100 \times i \times \left[ \frac{Tr_{(\alpha)} - Tr_{(n)}}{Tr_{(n+1)} - Tr_{(n)}} \right] + 100 N$$

Na equação de Van Den Dool e Kratz temos que:  $Tr_{(\alpha)}$  é o tempo de retenção do composto  $\alpha$  em questão;  $Tr_{(n)}$  é o tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes de  $\alpha$ ;  $Tr_{(n+1)}$  é o tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois de  $\alpha$ ;  $i$  é diferença do número de carbonos entre os hidrocarbonetos que eluem depois e antes do composto de  $\alpha$  e  $N$  é número de carbonos presente no hidrocarboneto que elui antes de  $\alpha$  (SILVA, 2018).

**Figura 4** - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas utilizado para caracterização dos óleos essenciais



Fonte: Autora, 2022.

### ***Determinação do potencial hidrogeniônico***

O potencial hidrogeniônico (pH) do óleo essencial, assim como o do extrato e dos diluidores, foi medido com o auxílio do papel indicador de pH 0-14 da marca Kasvi. A amostra foi colocada em contato com a fita e o valor do pH foi determinado por uma avaliação da coloração resultante, seguindo como referência o painel indicativo ofertado

pelo fabricante em sua caixa. Esta metodologia também foi utilizada na mensuração do extrato bruto e dos diluidores formados.

### ***Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH***

O potencial antioxidante do óleo essencial foi determinado através do método de sequestro de radicais livres do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Esta técnica foi inicialmente descrita por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) e baseia-se na capacidade dos compostos com potencial antioxidante presente nas amostras em sequestrar o radical livre do DPPH, deixando-o mais estável. Quando em solução, o DPPH forma uma solução de coloração roxa, mas quando é reduzido forma um composto com coloração amarela.

De maneira geral, as amostras foram diluídas em diferentes concentrações para que fosse possível encontrar o valor da atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). Para isso, foi preparada uma curva de calibração ou curva padrão (Apêndice A), utilizando diferentes concentrações do controle positivo (Trolox).

Para realização do teste, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, em que cada poço teve 100 µL das amostras (incluindo o controle positivo) adicionado. Após isso, sobre abrigo de luz, foi adicionado em cada poço 100 µL da solução de DPPH (Sigma-Aldrich) 0,3 mM. Para a preparação do branco foi utilizado 100 µL da amostra e 100 µL de metanol e para o controle negativo foi utilizado 100 µL da solução DPPH 0,3 mM e 100 µL de metanol.

A placa foi mantida no escuro por 30 minutos sem agitação. Após este tempo foi medida a absorbância em um leitor de microplacas multidetector da marca Biotek modelo Synergy HT no comprimento de onda de 517 nm. A partir dos valores obtidos do equipamento foram calculados o valor da porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL) ou também conhecida por porcentagem de inibição (% I) para cada amostra (Equação 2).

Equação 2 - Equação da porcentagem de sequestro de radicais livres

$$\%SRL \text{ ou } \%I = \left[ \frac{(\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra})}{\text{Absorbância do controle}} \right] \times 100$$

Também foram calculados os valores da concentração necessária para atingir a IC 50, referente a concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do

radical DPPH em solução. Este valor foi encontrado a partir da plotagem em gráfico, em que o eixo X foi referente a concentração da amostra, e o eixo Y foi a média da porcentagem de inibição (% I) (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Para o óleo essencial, foram feitas diferentes soluções-padrão em metanol de forma crescente até o teste do óleo essencial puro. Esta metodologia também foi utilizada para o extrato bruto e os diluidores produzidos. Para o extrato bruto, foram feitos testes com soluções-mãe de 1, 2 e 3 mg/mL em metanol. Por último, para os diluidores, foram utilizados como soluções-padrão os mesmos já prontos em sua diluição final, a qual foi utilizada para as avaliações espermáticas.

**Figura 5** - Equipamento utilizado para leitura da absorbância das placas de 96 poços



Fonte: Autora, 2022.

#### 4.1.4 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pela mistura do óleo essencial da casca da laranja para juntamente ao surfactante não-iônico polisorbato 80 e uma solução de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Foram utilizadas duas metodologias diferentes para preparação das nanoemulsões, são elas: a metodologia de alta energia por sonicação e a metodologia de baixa energia por inversão de fase.

Cada piloto realizado foi preparado com pequenas alterações em sua metodologia. A descrição detalhada de cada metodologia realizada, assim como suas formulações resultantes estão descritas no Quadro 2. Os grupos citados abaixo foram testados tanto para o óleo essencial de laranja extraído (MTN), quanto para o óleo essencial comercial (OLZ).

**Quadro 2** - Resumo dos pilotos testados na formulação das nanoemulsões

<b>Piloto</b>	<b>Método utilizado para formação da nanoemulsão e grupos resultantes</b>	<b>Descrição da metodologia</b>
<b>1</b>	Inversão de fase  Grupo: Tris + 5% P80 + 5% OE	Fase oleosa: 5 mL do óleo essencial (MTN ou OLZ) e 5 mL de P80. Fase aquosa: 90 mL de Tris. A fase oleosa foi agitada em um agitador magnético por 10 minutos. Após este tempo, ainda sob agitação adicionou-se manualmente 90 mL da fase aquosa com o auxílio de uma seringa de 10 mL. Este sistema ficou sob agitação por 30 minutos.
<b>2</b>	Inversão de fase  Grupo: Tris + 5% P80 + 5% OE	Fase oleosa: 0,5 mL do óleo essencial (MTN ou OLZ) e 0,5 mL de P80. Fase aquosa: 9 mL de Tris. A fase oleosa foi agitada em um vórtex por 1 minuto. Após isto, foi adicionada a fase aquosa na fase oleosa, este processo foi realizado com o auxílio de uma seringa de 10 mL. Esta adição se deu em fluxo contínuo e em 35 segundos. A solução foi mantida em agitação no vórtex por 2 minutos.
<b>3</b>	Inversão de fase  Grupo: Tris-glicerol + 2% P80 + 2% OE	Fase oleosa: 0,2 mL do óleo essencial (MTN ou OLZ) e 0,2 mL de P80. Fase aquosa: 9,6 mL de Tris-glicerol 5%. Mesma metodologia do piloto 2.
<b>4</b>	Inversão de fase  Grupos: Tris + 2,5% P80 + 2,5% OE e	Fase oleosa: 50 µL do óleo (MTN apenas) e 50 µL de P80. Fase aquosa: 1,9 mL de Tris, com e sem adição de 5% de glicerol. A fase oleosa foi

	Tris-glicerol + 2,5% P80 + 2,5% OE	agitada em vórtex por 1 minuto, depois foi adicionada a fase aquosa, e a solução foi mantida em agitação no vórtex por 2 minutos.
<b>5</b>	Sonicação  Grupos: Tris + 5% P80 + 5% OE e Tris-glicerol + 5% P80 + 5% OE	Fase oleosa: 1,5 mL do óleo (MTN ou OLZ), e 1,5 mL de P80. Fase aquosa: 27 mL de Tris com e sem adição de glicerol 5%. Inicialmente a fase oleosa foi agitada em um agitador magnético por 10 minutos e depois a fase aquosa foi adicionada, o sistema foi mantido em agitação por mais 30 minutos. Após este tempo, a solução foi levada ao sonicador na amplitude de 72 e por 15 minutos. A sonda do equipamento foi mantida centralizada no meio da solução, e não foi utilizada nenhuma fonte externa de controle de temperatura do sistema.
<b>6</b>	Sonicação  Grupos: Tris + 2% P80 + 2% OE e Tris-glicerol + 2% P80 + 2% OE	Fase oleosa: 0,3 mL do óleo (MTN ou OLZ) e 0,3 mL de P80. Fase aquosa: 14,4 mL de Tris com e sem adição de glicerol 5%. Mesma metodologia do piloto 5.

#### 4.1.5 Caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões foram avaliadas quanto ao valor de diâmetro médio ( $\bar{\phi}$ ) e índice de polidispersão (PDI) pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Estes fatores estão ligados diretamente ao nível de estabilidade da emulsão. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Materiais e Biosistemas – LAMAB da Universidade Federal da Paraíba.

Para os parâmetros morfológicos das NEs, as amostras foram submetidas à técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*), também utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido) com ângulo de dispersão fixo em 90° e sob temperatura de 25 °C. Os resultados foram analisados através do programa Zetasizer 7.13 (Malvern Panalytical, Reino Unido).

Os resultados foram obtidos através da média da leitura das triplicatas.

Além destes parâmetros, as NEs foram avaliadas quanto aos aspectos visuais (cor e aspectos de desestabilização). Estas análises físicas foram realizadas nos dias 0, 1 e 7 após a preparação.

#### **4.1.6 Delineamento experimental dos testes com o óleo essencial**

Para os testes com o óleo essencial, foram realizados três pilotos juntamente às células espermáticas, a fim de testar seu potencial crioprotetor. O primeiro piloto utilizou nanoemulsões produzidas, e os outros dois pilotos apenas o óleo essencial adicionado ao diluidor Tris-gema. Os grupos experimentais que foram utilizados em cada piloto foram:

##### *Piloto 1*

- Grupo Controle: Tris + 20% de gema de ovo (Tris-gema);
- Grupo Tris-gema + 5%P80;
- Grupo Nanoemulsão de Tris-glicerol + 5% P80 + 5% OE extraído produzido pelo método com energia;
- Grupo Nanoemulsão de Tris-glicerol + 5% P80 + 5% OE comercial produzido pelo método com energia;
- Grupo Nanoemulsão de Tris-glicerol + 5% P80 + 5% OE extraído produzido pelo método sem energia;
- Grupo Nanoemulsão de Tris-glicerol + 5% P80 + 5% OE comercial produzido pelo método sem energia;

##### *Piloto 2*

- Grupo Controle: Tris + 20% de gema de ovo (Tris-gema);
- Grupo Tris-gema +2% OE extraído;
- Grupo Tris-gema +2% OE comercial;

### *Piloto 3*

- Grupo Controle: Tris + 20% de gema de ovo (Tris-gema);
- Grupo Tris-gema + 1% OE extraído;
- Grupo Tris-gema + 1,25% OE extraído;
- Grupo Tris-gema + 1,5% OE extraído;
- Grupo Tris-gema + 1,75% OE extraído;

#### **4.1.7 Obtenção dos espermatozoides epididimários**

Foram utilizados complexos testículos/epidídimos de bovinos sem raça definida que foram obtidos em um abatedouro localizados na cidade de Santa Rita/Paraíba nas coordenadas 7°07'10.7"S 34°59'33.7"W (Figura 6A). Estes foram transportados em caixa térmica até o Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da Universidade Federal da Paraíba (Campus I).

No laboratório, o epidídimo e o ducto deferente foram separados do testículo (Figura 6B), amarrados com um barbante para que não houvesse extravasamento do seu conteúdo interno (Figuras 6C e 6D), cortados (Figuras 6E e 6F) e foram higienizados com solução fisiológica (NaCl 0,9%) à temperatura ambiente (FARIAS, 2017).

Os espermatozoides foram isolados pela técnica de flutuação. Inicialmente foi feito um fatiamento da cauda do epidídimo (Figura 7A), evitando o corte de vasos sanguíneos aparentes, e em seguida feita a imersão desta região fatiada em 2 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril a 37 °C contida em placas de Petri levemente inclinadas (Figura 7B) (SALES, 2017).

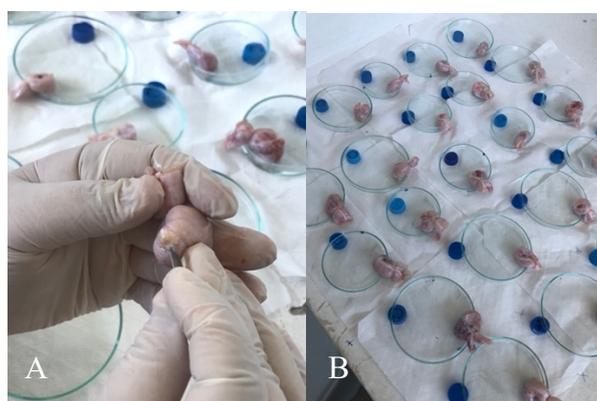
Após aproximadamente 15 minutos, os espermatozoides de todas as placas de Petri foram avaliados em sua motilidade (expressa em porcentagem) e vigor. Aqueles que apresentaram valor de motilidade abaixo de 50% foram dispensados, e aqueles com valores acima de 50%, foram homogeneizados em um tubo tipo falcon de 15 mL para a formação do *pool* (espermatozoides diluídos em soro fisiológico) a fim de evitar alterações ou variabilidade entre indivíduos no experimento.

**Figura 6** - Etapas de obtenção dos epidídimos bovinos



Fonte: Autora, 2022.

**Figura 7** - Técnica de flutuação para obtenção dos espermatozoides epididimários bovinos



Fonte: Autora, 2022.

Foi feita a distribuição de 1 mL do *pool* obtido em tubos do tipo eppendorf, estes foram levados à centrífuga (Centrífuga de Bancada Refrigerada da marca Solab, modelo SL-706) por 10 minutos a 3000 rpm (rotações por minuto), com aceleração e desaceleração de 120 segundos e em temperatura ambiente.

Em seguida, por pipetagem, retirou-se o maior volume possível da solução fisiológica sobrenadante, mantendo-se o *pellet* das células espermáticas. Em todas as repetições, as células foram ressuspensas em um volume de 2 mL do diluidor/grupo a ser testado.

#### **4.1.8 Análises espermáticas**

##### ***Avaliação da motilidade espermática***

A motilidade espermática foi realizada por avaliação subjetiva expressa em porcentagem, com variação de 0-100%, sendo feita a média de dois avaliadores. Esta análise foi realizada utilizando um microscópio óptico com objetiva de 40x. Foi colocada uma alíquota de 10  $\mu$ L da amostra entre a lâmina e a lamínula, a qual foi avaliada.

##### ***Teste de integridade da membrana plasmática***

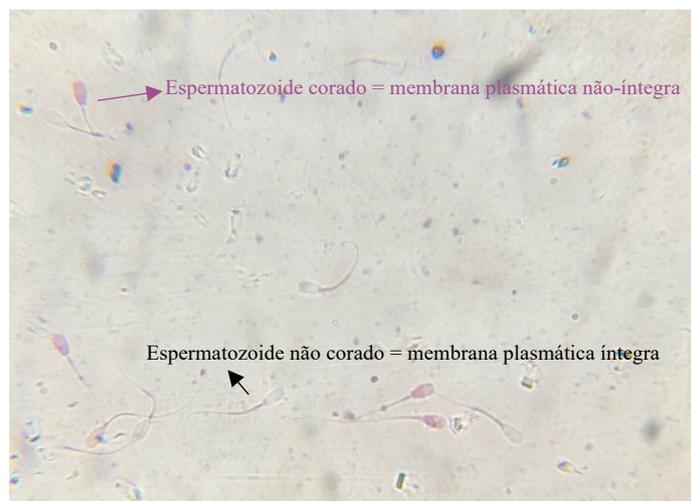
O teste de integridade da membrana plasmática foi feito utilizando a dupla coloração com os corantes eosina e nigrosina (CBRA, 2013).

A eosina é um corante supravital incapaz de penetrar em células com sua membrana plasmática intacta. Por outro lado, em células mortas ou lesadas, onde não há mais uma integridade da membrana plasmática, a eosina pode penetrar na célula, e estas foram coradas em rosa. A nigrosina é responsável por dar o contraste mais escuro do fundo da lâmina, permitindo uma melhor visualização dos espermatozoides não corados (SWANSON e BEARDEN, 1951).

As células não coradas indicaram as células vivas, onde não houve entrada do corante, e as células rosadas representaram células com membrana plasmática não íntegras (Figura 8) (ARRUDA *et al.*, 2015).

Foram adicionados em um microtubo 25  $\mu$ L de cada grupo experimental, 25  $\mu$ L da solução de corante eosina-nigrosina (Anexo II) e 50  $\mu$ L de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Após a diluição destes componentes, foi realizado o estiramento a partir de 10  $\mu$ L de cada amostra, este estiramento foi feito igualmente em duas lâminas de vidro. Em seguida foram contadas 200 células com o auxílio de um microscópio de campo claro com objetiva de 40x. Foi anotado o valor de células coradas e células não coradas para cada grupo experimental tanto no momento de 0 h, antes da congelação, quanto pós-descongelação.

**Figura 8** - Coloração eosina-nigrosina em espermatozoides epididimários bovinos



Fonte: Autora, 2022.

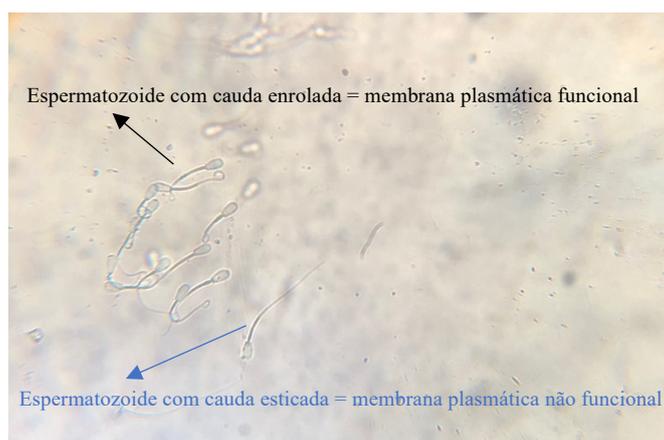
### ***Teste de funcionalidade da membrana plasmática***

Foi utilizado o teste hiposmótico (HOST) para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática. Este baseia-se nas propriedades de manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular (CBRA, 2013).

Nesta técnica o espermatozoide é incubado em solução hiposmótica, na qual ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Consequentemente à entrada e expansão da membrana, há o enrolamento da cauda num processo fisiológico. Caso a membrana não esteja intacta, seja por danos ou morte do espermatozoide, esta reação não ocorrerá, resultando em uma cauda esticada (JEYENDRAN *et al.*, 1984). Temos então que, para o experimento, foram consideradas células espermáticas com membranas plasmáticas funcionais aquelas que tiveram sua cauda enrolada e células com membranas plasmáticas não funcionais aquelas que apresentaram cauda esticada (Figura 9).

Para o teste, foi diluído em um microtubo 10 $\mu$ L de cada grupo experimental juntamente à 100  $\mu$ L da solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) (Anexo II). Esta solução foi incubada em banho maria à 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, foi adicionado 50  $\mu$ L de uma solução formol salina a fim de parar a reação osmótica. A avaliação foi feita colocando-se 10  $\mu$ L de cada solução em uma lâmina, coberta por uma lamínula, e esta foi analisada em um microscópio óptico com objetiva de 40x. Foram contadas 100 células e anotou-se a quantidade de células com cauda enrolada e com cauda esticada para cada grupo experimental.

**Figura 9** - Teste hiposmótico em espermatozoides epididimários bovinos



Fonte: Autora, 2022.

### ***Congelamento e descongelamento dos espermatozoides***

Para congelamento, as amostras foram inicialmente envasadas em palhetas de 0,25 mL e vedadas com álcool polivinílico (Figura 10A). Estas palhetas foram então colocadas em sacos plásticos e foram submersas em um béquer com água à temperatura ambiente (Figura 10B). Este foi levado para geladeira à 5°C e mantido por 4 horas, para que pudesse completar a curva de refrigeração.

Após este período, as palhetas foram retiradas e imediatamente colocadas em cima de uma raque metálica, contida em uma caixa térmica adaptada com nitrogênio líquido em seu interior (Figura 10C). A raque proporcionou a distância do nitrogênio líquido, permitindo que as palhetas estivessem apenas em contato com o seu vapor. Este nitrogênio foi adicionado até atingir uma altura de 4 cm dentro da caixa. Este sistema foi mantido fechado por 15 minutos. Após isto, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido presente na caixa (Figura 10D), e foram transferidas para o botijão, em que ficaram armazenadas até a próxima avaliação.

Para a descongelamento, as palhetas foram retiradas do botijão e foram rapidamente mergulhadas em banho-maria à 37°C por aproximadamente 30 segundos. Esta técnica foi realizada tanto neste primeiro experimento quanto no segundo, que será descrito na sequência.

**Figura 10** – Etapas da congelação das amostras

Fonte: Autora, 2022.

## 4.2 Experimento II - Extrato bruto da casca de laranja

### 4.2.1 Obtenção e preparação da casca para formulação do extrato bruto

As laranjas utilizadas seguem os mesmos parâmetros descritos anteriormente quanto ao seu local de obtenção, aspecto e método de obtenção das cascas. Estas últimas foram colocadas em uma estufa por 3 dias (Figura 11A e 11B). Após este período, estas foram retiradas e trituradas em um *mixer*. Em seguida foram novamente trituradas em um liquidificador até a formação de um pó fino, o qual foi pesado, armazenado e envolvido em papel-alumínio, mantido em temperatura ambiente até seu uso na próxima etapa.

**Figura 11** - Cascas da laranja antes e após secagem na estufa



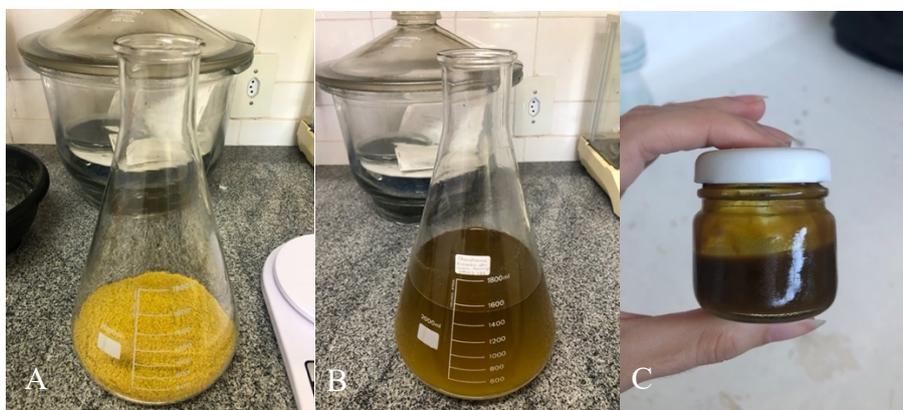
Fonte: Autora, 2022.

#### 4.2.2 Obtenção do extrato bruto

Foram utilizados 127 gramas da casca seca em pó obtido na etapa anterior, este pó foi colocado em um Erlenmeyer (Figura 12A) e foram adicionados 1,2 litro de etanol 95% (v/v) (Figura 12B), seguindo a proporção aproximada de 1:10, referente à casca e solvente, respectivamente.

Esta mistura foi filtrada a cada três dias. A cada filtração a fração líquida era separada em outro Erlenmeyer e o material sólido era mantido, junto a ele era adicionado de mais 1,2 litro de etanol. Este processo se repetiu por três vezes e toda fração líquida obtida foi levada ao rotaevaporador para secagem (Figura 13) e obtenção do extrato bruto (Figura 12C).

**Figura 12** – Etapas da obtenção do extrato bruto da casca de laranja



Fonte: Autora, 2022.

**Figura 13** - Equipamento de rotaevaporador utilizado para secagem do extrato



Fonte: Autora, 2022.

#### 4.2.3 Caracterização do extrato bruto e diluidores

##### *Screening fitoquímico*

O *screening* fitoquímico foi realizado para identificar qualitativamente a presença ou ausência de cinco grupos de compostos químicos no extrato bruto, sendo eles: alcaloides, esteroides, taninos, flavonoides e saponinas.

Para todos os grupos analisados, o teste foi realizado utilizando uma pequena quantidade do extrato bruto, de aproximadamente 20 mg, em tubos de ensaio de vidro.

Para alcaloides, esteroides e taninos foram utilizados reagentes específicos que reagem com o extrato, formando ou não um precipitado na parte inferior do tubo. A presença deste precipitado indicou que há compostos da classe que está sendo avaliada, assim como a ausência do precipitado demonstrou a falta deste composto no extrato bruto.

Foram utilizados os seguintes reagentes: para alcaloides – 1,0 mL de ácido clorídrico (HCl) 1% e reagente Bouchardat (3 a 5 gotas); para esteroides – 2,0 mL de clofofórmio ou triclorometano ( $\text{CHCl}_3$ ), 1mL de anidrido acético ( $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ) e 2,0 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); e para taninos - cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) 2%.

Quanto aos flavonoides, a metodologia consistiu em avaliar a mudança de coloração do líquido, sendo que considerado positivo para este composto quando se apresentava na coloração rósea. Para esta avaliação foram utilizados como reagentes o ácido clorídrico (HCl) 10% e uma fita de magnésio.

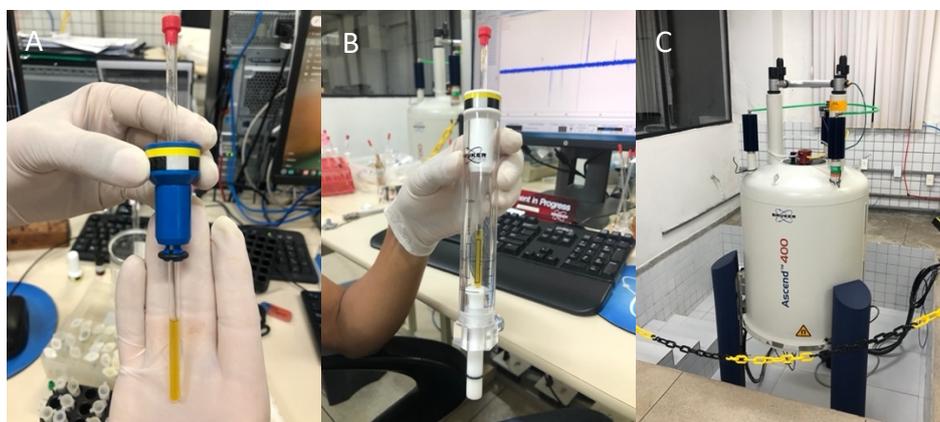
Para saponinas, foi adicionado 2,0 mL de água destilada ao tubo com o extrato bruto, este então foi agitado por 1 minuto e deixado em repouso. O teste baseia-se na

formação ou não de espuma no líquido, sendo positivo para saponinas quando há formação de espuma, e negativo para ausência.

### ***Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio $^1\text{H}$ e carbono $^{13}\text{C}$***

Os espectros de RMN de hidrogênio  $^1\text{H}$  e carbono  $^{13}\text{C}$  em técnica APT foram registrados em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear da marca Bruker modelo Ascend, operando a 400 MHz para o  $^1\text{H}$  e 100 MHz para o  $^{13}\text{C}$ . Para a análise, a amostra foi preparada dissolvendo aproximadamente 20 mg do extrato bruto em metanol (Cambridge Isotope Laboratories). A amostra foi colocada no tubo próprio para o equipamento de RMN com o diâmetro interno de 5 mm (Figura 14A e 14B), logo em seguida este foi inserido no equipamento para obtenção dos espectros (Figura 14C).

**Figura 14** - Materiais e equipamentos utilizados na técnica de RMN



Fonte: Autora, 2022.

### ***Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)***

O teor de compostos fenólicos totais pode ser determinado por estimativa utilizando métodos espectrofotométricos. O método mais tradicional e que foi utilizado neste trabalho foi o método Folin-Ciocalteu, que leva o nome do reagente principal utilizado na técnica. Este reagente apresenta coloração amarela, mas quando em contato com agentes redutores (compostos fenólicos) em pH alcalino, ocorre uma mudança de coloração para o azul. Esta mudança permite obter uma estimativa da concentração destes compostos. Para isso, utilizou-se uma curva de calibração do padrão, que neste caso foi utilizado o ácido gálico, em diferentes concentrações (Apêndice A). A leitura das amostras e da curva de calibração foi feita em um espectrofotômetro no comprimento de

onda de 765 nm. Os resultados foram então expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g amostra).

Antes de iniciar o teste foram preparados os reagentes utilizados nas análises (Anexo II) e foi preparada a solução-amostra de 1mg/mL do extrato bruto em metanol.

Para o teste, foi adicionado em um microtubo uma alíquota de 120  $\mu$ L da solução amostra e 500  $\mu$ L do reagente Folin-Ciocalteu a 10%, esta reação foi mantida por 8 minutos. Após este período adicionou-se 400  $\mu$ L da solução de carbonato de sódio a 7,5%, esta reação foi realizada e mantida sobre o abrigo da luz e em temperatura ambiente por 2 horas. Ao final, 200  $\mu$ L das amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços, a qual foi lida em um espectrofotômetro no comprimento de onda 765nm. O branco foi preparado com 120  $\mu$ L da solução amostra do extrato bruto adicionado de 900  $\mu$ L de água destilada.

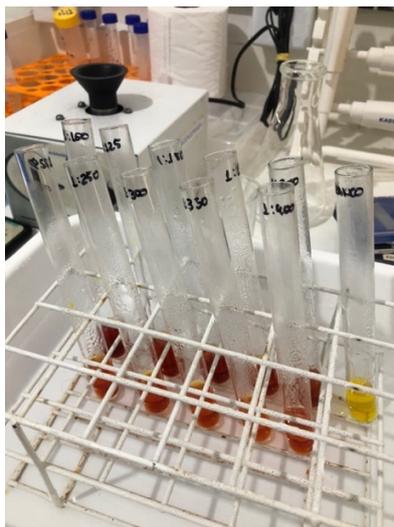
### ***Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS***

O método DNS baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento da coloração avermelhada, lida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959).

Foram utilizadas diferentes diluições feitas com o extrato bruto previamente obtido e água destilada. Em tubos de ensaio de vidro foram adicionados 0,5 mL da amostra e 0,5 mL do reagente DNS, esta mistura foi agitada em vórtex e incubada em banho termoestabilizado à 90 °C por 5 minutos. Após esse período, a amostra foi resfriada em água gelada até a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de água destilada (Figura 15) e foi verificada a absorvância a 540 nm em um espectrofotômetro de duplo feixe UV-visível modelo IL-0082-Y-BI. O branco da análise foi preparado com 0,5 mL de água destilada ao invés da amostra, seguindo o mesmo procedimento.

Os valores de absorvância das amostras nas diferentes diluições foram comparados com uma curva padrão de açúcares redutores (glicose + frutose) previamente preparada seguindo o mesmo método (Apêndice A), possibilitando a conversão da absorvância lida em concentração de glicose em gramas por litro ou miligramas por mililitro (SANTOS *et al.*, 2017).

**Figura 15** – Mudança de coloração no método DNS



Fonte: Autora, 2022.

#### **4.2.4 Delineamento experimental dos testes com o extrato bruto**

Para os testes com o extrato bruto (n=6), este foi diluído em água na proporção de 1:100. Esta solução aquosa foi a utilizada para formulação dos diluidores testados. Assim sendo, os grupos experimentais utilizados para os testes do extrato bruto foram:

- Grupo Controle: Tris + 20% de gema de ovo (Tris-gema);
- Grupo Extrato Bruto 1 (EB1): Tris-gema + 10% da solução aquosa do extrato;
- Grupo Extrato Bruto 2 (EB2): Tris-gema + 20% da solução aquosa do extrato;
- Grupo Extrato Bruto 3 (EB3): Tris + 10 % da solução aquosa do extrato;
- Grupo Extrato Bruto 4 (EB4): Tris + 20% da solução aquosa do extrato;

#### **4.2.5 Análises espermáticas**

Foram realizadas as metodologias descritas no tópico 4.1.8 do Experimento I e utilizou-se um n=6.

#### **4.2.6 Análises espermáticas pós-descongelção**

As amostras foram descongeladas a 37 °C, em banho-maria por 30 segundos, e fracionadas em tubos de microdiluição, na quantidade de 10 µL. As amostras foram diluídas em solução fisiológica (NaCl 0,9%), na proporção de 1:3 e foram adicionadas as sondas fluorescentes (exceto as amostras submetidas à avaliação cinética), que serão descritas abaixo. Todas as sondas foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções-estoque de fluoróforos foram preparadas como segue: iodeto de

propídio (25 mg/mL), JC-1 (5 mg/mL) e FITC conjugado com aglutinina de amendoim (FITC-PNA, 1 mg/mL) em solução tampão fosfato salina (PBS); as soluções de trabalho foram JC-1 (153  $\mu$ M) em dimetilsulfóxido (DMSO), FITC-PNA (0,04 mg/mL) e IP (0,5 mg/mL) em PBS e diacetato de carboxifluoresceína (DIC; 0,46 mg/mL em DMSO). Todas as soluções foram mantidas a -20 °C até o uso. As avaliações foram feitas logo após a descongelação e repetidas novamente após 1h.

### *Avaliação dos parâmetros cinéticos*

A cinética espermática foi analisada através do sistema computadorizado de análise espermática (Sperm Class Analyzer - SCATM software, Microptics, v. 5.1, S.L., Barcelona, Espanha). Uma alíquota (5  $\mu$ L) de cada amostra foi depositada sobre lâmina previamente aquecida (37 °C), coberta com lamínula e analisada por microscópio de contraste de fase (aumento de 100x; Nikon<sup>TM</sup> H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie<sup>TM</sup> A312FC, Ahrensburg, Alemanha) (Figura 16). Para cada amostra foram analisados cinco campos não consecutivos, selecionados aleatoriamente, com registro de, no mínimo, 2.000 espermatozoides. Foram avaliadas as seguintes variáveis: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilinear (VCL;  $\mu$ m/s), velocidade em linha reta (VSL;  $\mu$ m/s), velocidade média do percurso (VAP;  $\mu$ m/s), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %), amplitude lateral da cabeça espermática (ALH,  $\mu$ m) e batimento cruzado flagelar (BCF, Hz). Os valores foram mensurados com as seguintes configurações: temperatura de 37 °C; magnificação de 100x; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área de cabeça, 4 a 75  $\mu$ m<sup>2</sup>; VAP: lentos 10  $\mu$ /s < médios 45  $\mu$ /s < rápidos 90  $\mu$ /s; progressividade, 75% STR, 50% LIN (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

**Figura 16** - Computador e microscópio utilizados para análise da cinética espermática

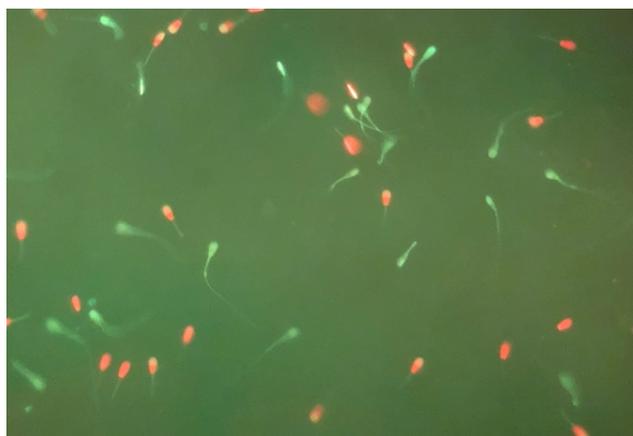


Fonte: Autora, 2022.

### ***Integridade de membrana plasmática (iMP)***

A integridade de membrana plasmática (iMP) foi avaliada segundo Araújo Silva et al. (2019), pelo método de coloração dupla de fluoróforos de iodeto de propídeo (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC), detectado pela inclusão de IP no núcleo da célula. A amostra previamente diluída foi corada com 5,0  $\mu\text{L}$  de DIC e 5,0  $\mu\text{L}$  de IP e incubada por um período de sete minutos a 37 °C. Os espermatozoides foram avaliados utilizando filtros de excitação DBP 485/520 nm e DBP 580–630 nm. Os espermatozoides corados em verde foram considerados intactos e os que estavam corados em vermelho foram considerados como tendo membrana danificada (Figura 17).

**Figura 17** – Coloração dupla de iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína

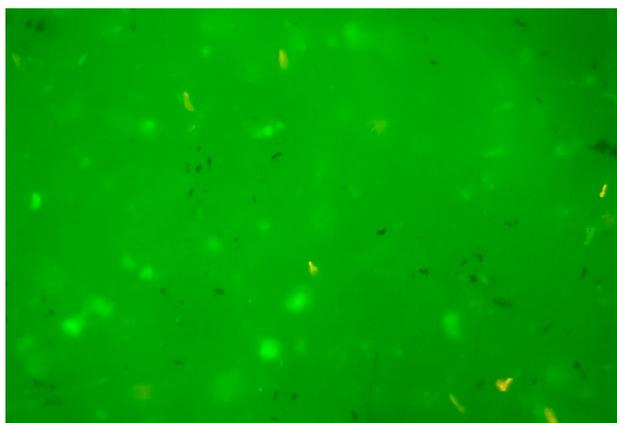


Fonte: Autora, 2022.

### ***Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)***

Para este teste, 5  $\mu\text{L}$  de JC-1 (iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; 153  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado em cada amostra e incubados por 7 minutos, em seguida avaliado no microscópio de fluorescência. A fluorescência verde (530 nm) indica a formação de monômeros J agregados e a laranja (590 nm) indica a formação de dímeros, à medida que a membrana mitocondrial se torna mais polarizada. Com isso, as células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana (Figura 18) (ALMEIDA *et al.*, 2017).

**Figura 18** – Teste do potencial de membrana mitocondrial

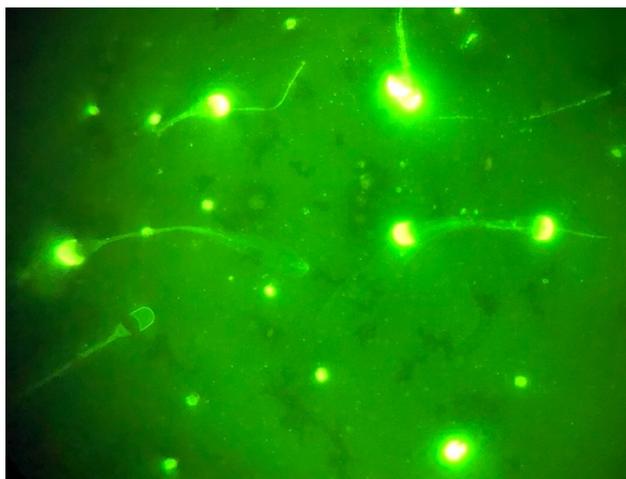


Fonte: Autora, 2022.

### ***Integridade de membrana acrossomal (iAC)***

A avaliação da integridade de acrossoma (iAC), foi feita através de Isotiocianato de Fluoresceína conjugada à aglutinina do amendoim (FITC-PNA). Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da amostra foi usada para fazer um esfregaço, seco ao ar. As lâminas foram coradas com alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de FITC-PNA e incubadas em câmara úmida a 4 °C, por 20 minutos, na ausência de luz. Em seguida, as lâminas foram imersas em PBS (Tampão fosfato salina) duas vezes e secas ao ar. Imediatamente antes da avaliação, 5,0  $\mu\text{L}$  de solução de UCD (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS, 5,0 mg de p-fenilenodiamina e 5,0 mg de azida sódica) foram colocados na lâmina e então cobertos com uma lamínula. Os espermatozoides foram avaliados usando um filtro de excitação BP 450–490 nm e emissão LP 515 nm (Figura 19) (ARAÚJO SILVA *et al.*, 2019).

**Figura 19** – Avaliação da integridade acrossomal



Fonte: Autora, 2022.

#### 4.2.7 Testes microbiológicos

Os testes microbiológicos tiveram como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do extrato da casca de laranja-pera. Para a realização dos testes microbiológicos, foram utilizados os diluidores: Tris-gema + 10% de extrato bruto, Tris-gema + 20% de extrato bruto, Tris + 10% de extrato bruto e Tris + 20% de extrato bruto.

Os diluidores foram preparados da mesma forma que para os outros testes deste trabalho. Utilizou-se o método de microdiluição em placas de 96 poços de fundo chato. Reservou-se uma placa para cada bactéria utilizada, sendo elas: as linhagens padrão *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-13883, e o isolado *Escherichia coli* AV12. As três espécies utilizadas neste trabalho fazem parte da lista de bactérias prioritárias da OMS (ASOKAN *et al.*, 2019).

Os microrganismos foram isolados de uma cultura recente de 3 dias e foram suspensos em solução fisiológica (NaCl 0,9%) até obter a turbidez padronizada de 1.0 da escala de McFarland's. O isolado AV12 apresenta característica de multidrogarresistente, com resistência à amoxicilina, cefalexina e cefalotina, e sensibilidade à ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, norfloxacina e sulfonamida.

#### ***Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)***

Inicialmente foi realizada uma diluição seriada de cada diluidor para obter as seguintes concentrações: 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25% e 0,25% do extrato bruto. Cada concentração foi realizada em triplicada.

Em cada poço da placa de 96 poços foi adicionada uma alíquota de 100  $\mu$ L do caldo Mueller-Hinton esterelizado. Logo após foi adicionado no primeiro poço e de maior concentração da diluição seriada, 100  $\mu$ L do diluidor teste na concentração de 40%, para que a concentração neste poço chegasse à 20%. Foi então retirado um volume de 100  $\mu$ L do poço, sendo levado ao próximo, seguindo as concentrações já citadas acima. Ao final, foi adicionado em cada poço uma alíquota de 10  $\mu$ L da suspensão celular bacteriana a ser analisada. As placas foram envolvidas por plástico filme e foram mantidas por 48 h em uma estufa na temperatura de aproximadamente 37°C.

O valor da concentração inibitória mínima foi determinado como a menor concentração a qual apresentou ausência de turbidez, o que indica ausência de crescimento bacteriano (GENHARTDT *et al.*, 1994).

#### ***Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)***

Para a determinação da concentração bactericida mínima foi utilizado o corante redox resazurina. Esta molécula apresenta uma coloração azul, e ao entrar na célula que está viável e com atividade metabólica normal, este composto passa por reações de redução resultando na resorufina, uma molécula de coloração rosa e que apresenta fluorescência (GENHARTDT *et al.*, 1994). O teste consistiu em aplicar uma alíquota de 10 $\mu$ L da resazurina em cada poço das placas utilizadas no ensaio anterior. Após o tempo de incubação de 2 horas, à temperatura ambiente e em bancada, as placas foram analisadas quanto à sua coloração resultante.

### **4.3 Análise estatística**

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão das repetições para cada experimento. Para análise dos dados obtidos foram utilizados os testes T e análise de variância (ANOVA) para duas amostras e múltiplas amostras, respectivamente. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os testes foram realizados no programa Past4 versão 4.11.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento I – Óleo essencial da casca de laranja

#### 5.1.1 Obtenção e preparação da casca para extração do óleo essencial

Para as três primeiras extrações, com a casca cortada, foi utilizado um total de 35 laranjas. A média do peso das laranjas foi de 223 gramas e a média do peso das cascas foi de 27,6 gramas. Já para as três últimas extrações, com a casca triturada, foram utilizadas 71 laranjas. A média de peso das laranjas foi de 228,9 gramas e a média do peso das cascas foi de 42,6 gramas.

#### 5.1.2 Extração do óleo essencial

Os valores de rendimento das extrações do óleo essencial de casca de laranja pera estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Rendimento das extrações do óleo essencial da casca de laranja pera

Grupos experimentais	Volume de óleo obtido na extração	Rendimento da extração
EA1	1,6 mL	0,53%
EA2	1,4 mL	0,46%
EA3	1,4 mL	0,46%
EN1	32 mL	3,2%
EN2	32 mL	3,2%
EN3	33 mL	3,3%

A partir destes dados é possível perceber que houve um aumento do rendimento na extração do OE pela segunda metodologia utilizada, a qual utilizou as cascas de forma triturada, em comparação à extração com a casca apenas cortada (Tabela 1).

Santos, Serafini e Cassel, (2003) obtiveram rendimento da extração do óleo de 0,4% (v/p), a partir da utilização de cascas inteiras. Fernandes, Cardoso e Hoffmann (2006) obtiveram um rendimento de 2,93% (v/p) de óleo essencial para cascas trituradas e de 0,53% (v/p) para cascas inteiras. Deitos *et al.*, (2014) também apresentou resultados

semelhantes quanto à melhora do rendimento, sendo de 0,38% (v/p) para cascas não trituradas e de 2,5% (v/p) para cascas trituradas. Os resultados encontrados na literatura corroboram com os encontrados neste trabalho.

Este aumento do rendimento está relacionado ao fato de que a eficiência de um processo de extração sólido-líquido é diretamente influenciada pelo modo em o solvente entra em contato com o sólido utilizado (DIAZ *et al.*, 2021). A partir disto, indica-se o processamento prévio da matéria-prima a fim de aumentar o rendimento desse tipo de extração (IBARZ, 2002; GEANKOPLIS, 1998)

Quanto ao aspecto biológico, a parede celular apresenta certa resistência à difusão dos solutos, dificultando a ação dos solventes. Neste caso, o processo de trituração age rompendo a parede celular, facilitando a ação do solvente, pois este entrará em contato com o interior das células vegetais, nas quais está presente o óleo (DEITOS *et al.*, 2014).

### 5.1.3 Caracterização do óleo essencial

#### *Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)*

Na Tabela 2 estão descritos os compostos majoritários encontrados na composição dos óleos essenciais obtidos das diferentes extrações. Estes dados foram obtidos a partir dos cromatogramas (dados não mostrados) gerados pela técnica de CG-EM.

**Tabela 2** - Compostos majoritários dos óleos essenciais da casca de laranja pera

<b>Compostos</b>	<b>EA1</b>	<b>EA2</b>	<b>EA3</b>	<b>EN1</b>	<b>EN2</b>	<b>EN3</b>	<b>MTN</b>	<b>OLZ</b>
Limoneno	95,87	94,61	94,29	97,08	97,33	97,53	97,58	97,77
$\beta$ -mirceno	1,19	1,13	1,12	1,41	1,27	1,38	1,31	0,90
$\alpha$ -pineno	0,29	0,25	0,27	0,46	0,50	0,45	0,44	0,47
Linalol	1,82	2,78	3,05	0,50	0,54	0,36	0,44	0,32
Octanal	0,43	0,48	0,46	0,22	0,15	-	-	-

Para os óleos obtidos da primeira metodologia de extração (EA1, EA2 e EA3), os compostos majoritários foram o limoneno ( $94,92\pm 0,82\%$ ), linalol ( $2,55\pm 0,64\%$ ),  $\beta$ -mirceno ( $1,14\pm 0,03\%$ ) e octanal ( $0,45\pm 0,02\%$ ). Para os da segunda metodologia de extração (EN1, EN2 e EN3), os compostos majoritários foram o limoneno ( $97,31\pm 0,22\%$ ),  $\beta$ -mirceno ( $1,35\pm 0,07\%$ ),  $\alpha$ -pineno ( $0,47\pm 0,09\%$ ) e linalol ( $0,47\pm 0,02\%$ ). Quanto ao óleo utilizado nas formulações (MTN), este manteve a semelhança com os óleos que o compõem (EN1, EN2 e EN3, na proporção 1:1:1), apresentando como compostos majoritários o limoneno (97,58%),  $\beta$ -mirceno (1,31%),  $\alpha$ -pineno (0,44%) e linalol (0,44%). Por fim, o óleo comercial (OLZ) também apresentou o limoneno como composto majoritário (97,77%), seguido do  $\beta$ -mirceno (0,90%),  $\alpha$ -pineno (0,47%) e linalol (0,32%). Em todos os OEs avaliados neste trabalho, o limoneno foi apresentado como sendo o componente majoritário.

De acordo com Berger, Krings e Zorn (2002) os óleos essenciais de *Citrus* apresentam como componente mais expressivo o limoneno, com concentrações que variam de 90 a 96%, estes dados corroboram com os resultados aqui obtidos. Apesar da variabilidade da composição química dos óleos essenciais, é possível encontrar um perfil de compostos majoritários similar em trabalhos recentes (VELÁZQUEZ-NUÑEZ *et al.*, 2013/FERRONATO; ROSSI, 2018).

### ***Determinação do potencial hidrogeniônico***

As Tabelas 3 e 4 mostram os resultados da mensuração do potencial hidrogeniônico (pH) dos óleos essenciais e das nanoemulsões formuladas, respectivamente.

**Tabela 3** - Valores de pH dos óleos essenciais da casca de laranja pera

<b>Óleos essenciais</b>	<b>pH</b>
EA1	5,0
EA2	5,0
EA3	5,0
EN1	5,5
EN2	5,0
EN3	5,5

MTA	5,5
MTN	5,5
OLZ	5,0

**Tabela 4** - Valores de pH das nanoemulsões formadas

Nanoemulsões	pH
Tris + 2%P80 + 2%OE	6,0
Tris-glicerol +2%P80 + 2%OE	6,0
Tris +2,5% P80 + 2,5%OE	6,0
Tris-glicerol + 2,5% P80 + 2,5%OE	6,0
Tris + 5%P80 + 5%OE	6,0
Tris-glicerol + 5%P80 + 5%OE	6,0

Os valores obtidos estão dentro do esperado para óleos cítricos (pH < 7). Valores de pH semelhantes estão descritos em Alves (2020).

#### ***Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH***

O óleo essencial da casca de laranja extraído (MTN) não obteve potencial antioxidante quando diluído em metanol. Apenas com a aplicação do OE puro foi capaz avaliar o seu potencial antioxidante. Este apresentou um valor equivalente ao Trolox (TEAC) de 342,5 µg/mL, equivalente à 24% de inibição. Quanto à performance na técnica, o óleo essencial comercial (OLZ) apresentou resultados similares, também não demonstrando possuir uma ação antioxidante frente ao método DPPH. Para este, o valor de TEAC obtido foi de 85,8 µg/mL, mostrando-se inferior ao obtido pelo óleo extraído. Esta variação deve estar relacionada à diferença na composição química entre os óleos, contudo, não foram realizados testes adicionais para avaliar em detalhes a diferença entre eles.

Sabe-se que a mensuração do poder antioxidante de uma substância depende do método escolhido, da concentração analisada e das propriedades físico-químicas dos componentes, para o caso de uma mistura, como o óleo essencial (KULISIC *et al.*, 2004).

Sendo assim, alguns resultados podem se desencontrar ou serem confirmados conforme alterações de concentrações e parâmetros avaliados. Isto ocorreu no trabalho de FERRONATO e ROSSI (2018), o qual descreve uma ótima atividade de sequestro do radical DPPH para o OE de laranja, indicando-o como fonte natural de atividade antioxidante.

Contudo, em concordância com os resultados obtidos, Choi *et al.* (2000) apontam que a propriedade antioxidante dos óleos essenciais está ligada com a concentração de terpenos presentes, com exceção do limoneno e do mirceno. Esta informação corrobora com os resultados, uma vez que a composição química dos OEs utilizados apresenta estas duas substâncias na lista de seus compostos majoritários. Lu *et al.* (2019) também descreve que, em comparação a outros monoterpenos, o limoneno exibe baixa habilidade em sequestrar os radicais livres do DPPH.

#### 5.1.4 Preparação das nanoemulsões

A Tabela 5 reúne as informações acerca do aspecto visual e tempo máximo de estabilidade das nanoemulsões resultantes de todos os pilotos testados.

**Tabela 5** - Resumo das avaliações feitas para as nanoemulsões formuladas em cada piloto

<b>Piloto</b>	<b>Aspecto visual da NE recém formada</b>	<b>Tempo máximo de estabilidade</b>
<b>1</b>	Solução leitosa branca	7 dias
<b>2</b>	Solução leitosa branca	7 dias
<b>3</b>	Solução leitosa branca	1 dia
<b>4</b>	Solução translúcida levemente esbranquiçada	7 dias
<b>5</b>	Solução translúcida levemente esbranquiçada	1 dia
<b>6</b>	Solução translúcida levemente esbranquiçada	1 dia

Como resultado do Piloto 1, a nanoemulsão formada apresentou-se com aspecto visual de uma solução leitosa branca. Esta teve sua estabilidade avaliada, tanto em

temperatura de geladeira (4°C) quanto em temperatura ambiente (25°C). Em geladeira, a partir do dia 7, a NE apresentou uma espuma densa na parte superior, caracterizando desestabilização de sua formulação. Em temperatura ambiente, a partir do dia 7, a solução apresentou aspecto totalmente transparente, com perda de sua turbidez e coloração esbranquiçada, também indicando instabilidade da formulação e perda das suas características iniciais.

No Piloto 2, o resultado foi uma solução de aspecto leitoso branco, semelhante ao obtido no Piloto 1. O mesmo processo do Piloto 1 foi feito para avaliação da estabilidade. Observou-se que a NE em temperatura ambiente teve a perda de estabilidade a partir do dia 7, quando apresentou aspecto totalmente transparente. E a nanoemulsão mantida em geladeira no dia 7 apresentou formação do halo de espuma na parte superior do líquido, indicando também a perda de estabilidade.

No Piloto 3, foram utilizadas as mesmas condições do Piloto 2, mas com a porcentagem de OE e P80 reduzidas para 2% cada e houve adição do glicerol ao Tris. Estas modificações não resultaram em melhora da estabilidade, mas sim em uma perda da mesma, com redução do tempo de estabilidade de 7 dias no Piloto 2 para apenas 1 dia neste piloto.

No Piloto 4, foi testada a metodologia encontrada em Lima (2020), utilizando a concentração de 2,5% para ambos OE e P80, e com um volume total reduzido, de apenas 2 mL em comparação às outras metodologias testadas, com volumes acima de 10 mL por preparação. Como resultado deste piloto, as NEs resultantes apresentaram aspecto visual diferente dos pilotos anteriores que utilizavam método similar, apresentando-se com aspecto mais próximo das NEs obtidas após uso da sonicação (Pilotos 5 e 6). A estabilidade dessas formulações também foi capaz de resistir por mais tempo do que as NEs 1, 2 e 3, mas não ultrapassou o sétimo dia, apresentando formação do halo como indicador de desestabilização.

No Piloto 5 e 6, foram obtidas nanoemulsões com aspecto visual mais transparente do que as obtidas nos Pilotos 1, 2 e 3, os quais utilizavam as metodologias de baixa energia. Como resultado do teste de estabilidade, observou-se a separação das fases após o período de 24 horas.

Conclui-se destes pilotos que a adição ou não do glicerol, nas formulações com 2 ou 5%, não teve impacto na estabilidade da formulação. Além disto, apesar de inicialmente apresentar aspectos visuais diferentes, o tempo de estabilidade máximo das formulações foi o mesmo, independente da metodologia utilizada para sua produção.

Segundo Karthik, Ezhilarasi, & Anandharamkrishnan (2017), o principal problema das emulsões é a estabilidade. Dentre os principais mecanismos de instabilidade têm-se a floculação, cremagem, sedimentação, coalescência e separação de Ostwald. Baseado nisto, estes mesmos pesquisadores indicaram o uso de um método complementar após a formação da nanoemulsão, como a técnica de secagem por aspersão (também conhecida como *spray drying*) ou liofilização (*freeze drying*).

Outro estudo trouxe o uso de diferentes gomas (arábica e tragacanto) como solução para obtenção de uma nanoemulsão estável. Esta foi preparada com o óleo essencial de laranja e o polisorbato 80 pelo método de sonicação (Hashtjin & Abbasi, 2015). A adição de metodologias complementares e/ou adição de novos ingredientes à formulação se mostram como alternativas viáveis para melhoria da estabilidade das nanoemulsões formuladas com o óleo essencial da casca de laranja e o polisorbato 80.

### 5.1.5 Caracterização das nanoemulsões

Foram caracterizadas as nanoemulsões formuladas com Tris-glicerol +5%P80 +5%OE, tanto para o óleo extraído como para o óleo comercial, e para ambos métodos de preparação. O valor da média do tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) estão indicados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Caracterização das nanoemulsões

<b>Grupo</b>	<b>Método utilizado para formulação da nanoemulsão</b>	<b>Tamanho de partícula (d.nm)</b>	<b>Índice de polidispersão</b>
Tris-glicerol +5%P80+5%OE extraído	Inversão de fase	92,59 ± 2,69	0,42 ± 132,00
Tris-glicerol +5%P80+5%OE comercial	Inversão de fase	118,50 ± 76,50	0,54 ± 6,51
Tris-glicerol +5%P80+5%OE extraído	Sonicação	540,60 ± 47,66	0,72 ± 0,00

Tris-glicerol +5%P80+5%OE comercial	Sonicação	141,70 ± 2,13	0,33 ± 26,12
---	-----------	---------------	--------------

De acordo com PAVONI *et al.* (2020) o valor máximo do tamanho de partícula de uma nanoemulsão é de 200 nm. Sendo assim, têm-se que as formulações testadas, exceto a de Tris-glicerol +5%P80+5%OE extraído, podem ser classificadas como nanoemulsões.

### 5.1.7 Obtenção dos espermatozoides epididimários

Cada dia de experimento realizado, para teste das nanoemulsões e diluidores nas células espermáticas, utilizou entre 25 e 45 epidídimos para técnica de flutuação, a fim de obter os espermatozoides epididimários. Mais de 50% das soluções espermáticas obtidas não alcançou um valor acima de 50% para motilidade espermática. Os *pools* foram formados com a solução de 3 ou 4 amostras que obtiveram motilidade acima de 70%.

### 5.1.8 Análises espermáticas

**Piloto 1 – Teste das nanoemulsões com Tris+glicerol +5%OE + 5%P80 para o OE extraído (C) e OE comercial (OLZ), produzidos pelos métodos de alta energia (AE) e baixa energia (BE)**

Os resultados deste piloto (n=1) estão presentes nas Tabelas 7, 8 e 9.

**Tabela 7 – Avaliação da motilidade espermática do Piloto 1**

	Tris- gema	TG+P80	5%C AE	5%OLZ AE	5%C BE	5%OLZ BE
<b>Pós-diluição (%)</b>	80	75	60	45	55	60
<b>Pós-descongelamento (%)</b>	40	0	0	0	0	0

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à motilidade espermática pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à motilidade espermática pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células móveis.

**Tabela 8** - Teste de integridade da membrana plasmática do Piloto 1

	<b>Tris- gema</b>	<b>TG+P80</b>	<b>5%C AE</b>	<b>5%OLZ AE</b>	<b>5%C BE</b>	<b>5%OLZ BE</b>
<b>Pós-diluição (%)</b>	41	36	0	0	0	0
<b>Pós-descongelamento (%)</b>	35	1	0	0	0	0

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células íntegras.

**Tabela 9** - Teste de funcionalidade da membrana plasmática do Piloto 1

	<b>Tris- gema</b>	<b>TG+P80</b>	<b>5%C AE</b>	<b>5%OLZ AE</b>	<b>5%C BE</b>	<b>5%OLZ BE</b>
<b>Pós-diluição (%)</b>	91	56	78	11	81	9
<b>Pós-descongelamento (%)</b>	41	6	4	3	2	4

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à funcionalidade da MP no pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à funcionalidade da MP no pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células com membrana funcional.

Estes resultados indicam que os grupos com apenas o polisorbato 80 (TG+P80) e as nanoemulsões, independente do óleo utilizado (OE e OC) e do método de preparação da amostra (AE e BE), já após a diluição (0h) apresentaram influência negativa aos parâmetros analisados.

Quanto aos resultados pós-descongelamento, todos os grupos apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, apresentaram uma piora de todos os parâmetros avaliados quando em comparação ao grupo Tris-gema, demonstrando não haver proteção à célula espermática. Também pode-se verificar que o grupo TG+P80, mesmo sem a presença do OE já apresentou alteração e levou a perda total da motilidade pós-descongelamento, indicando que o seu uso foi danoso para as células espermáticas nestas condições utilizadas.

Quanto à morte celular causada pelo P80 apresentada nestes resultados, têm-se que os surfactantes podem levar a lise celular por pelo menos dois mecanismos. O primeiro deles é pela solubilização e o segundo é pela lise osmótica. Estes mecanismos dependem de fatores como a concentração do surfactante, temperatura e duração de contato com a célula. Quando em baixas concentrações, as moléculas do surfactante se intercalam na membrana plasmática, induzindo mudanças na permeabilidade da mesma.

Já em altas concentrações, o mecanismo principal responsável pela lise é a solubilização (KAUR e MEHTA, 2017).

### **Piloto 2 – Teste das nanoemulsões com Tris-gema +2%OE para o OE extraído (E) e OE comercial (OLZ) produzido pelo método de alta energia**

Os resultados deste piloto (n=4) estão presentes nas Tabelas 10, 11 e 12.

**Tabela 10 - Avaliação da motilidade espermática do Piloto 2**

	<b>Tris-gema</b>	<b>2%E</b>	<b>2%OLZ</b>
<b>Pós-diluição (%)</b>	75,0±15,8 <sup>aA</sup>	17,5±18,4 <sup>bA</sup>	15,0±10,8 <sup>bA</sup>
<b>Pós-descongelamento (%)</b>	25,0±14,7 <sup>aB</sup>	1,75±2,2 <sup>bB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à motilidade espermática pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à motilidade espermática pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células móveis; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

**Tabela 11 - Teste de integridade da membrana plasmática do Piloto 2**

	<b>Tris-gema</b>	<b>2%E</b>	<b>2%OLZ</b>
<b>Pós-diluição (%)</b>	67,1±10,1 <sup>aA</sup>	28,1±24,8 <sup>bA</sup>	10,7±6,5 <sup>bA</sup>
<b>Pós-descongelamento (%)</b>	66,6±18,8 <sup>aA</sup>	16,1±14,1 <sup>aA</sup>	12,5±14,2 <sup>bcA</sup>

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células íntegras; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

**Tabela 12 - Teste de funcionalidade da membrana plasmática do Piloto 2**

	<b>Tris-gema</b>	<b>2%E</b>	<b>2%OLZ</b>
<b>Pós-diluição (%)</b>	80,5±4,2 <sup>aA</sup>	62,2±26,9 <sup>aA</sup>	53,5±22,4 <sup>aA</sup>
<b>Pós-descongelamento (%)</b>	38,7±18,2 <sup>aB</sup>	18,5±11,7 <sup>aB</sup>	6,25±4,0 <sup>bB</sup>

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à funcionalidade da MP no pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à funcionalidade da MP no pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células com membrana funcional; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

Este segundo piloto teve como objetivo avaliar o impacto da presença do OE nas análises espermáticas quando adicionado diretamente ao diluidor padrão Tris-gema, sem se apresentar em uma nanoemulsão. Para este piloto, o OE foi utilizado numa concentração de 2%.

A presença do OE (2%OE extraído e 2%OE comercial) diminuiu a motilidade espermática em comparação ao grupo controle (Tris-gema) em ambos os tempos avaliados (0h e pós descongelação) (Tabela 10).

Quanto à integridade da membrana plasmática, no tempo de 0h, os grupos com adição do OE apresentaram uma diminuição significativa do número de células com a membrana plasmática íntegra em comparação com o grupo controle (Tris-gema). Na avaliação pós-descongelação, o grupo com 2%OE extraído não apresentou diferença estatística com o grupo controle. Apenas o grupo com 2%OE comercial apresentou esta diferença.

A diminuição no número de células com MP íntegra caracteriza um dano à MP do espermatozoide (MORAES; MEYERS, 2018). Dano este característico do processo de congelação (CHIRNEA, 2004), mas que é em parte evitado pela presença de agentes crioprotetores nos diluidores seminais, como por exemplo, o que acontece no diluidor padrão Tris-gema (NEVE; HENRY, 2012). A falta de proteção à célula espermática indica que as nanoemulsões testadas, tanto no piloto anterior quanto neste, não apresentam potencial crioprotetor.

### **Piloto 3 – Teste de diferentes concentrações do óleo essencial puro (OE extraído) adicionado ao grupo Tris-gema**

Os resultados deste piloto (n=1) está descrito na Tabela 13.

**Tabela 13 – Avaliações espermáticas do Piloto 3**

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+1%OE</b>	<b>TG+1,25%OE</b>	<b>TG+1,5%OE</b>	<b>TG+1,75%OE</b>
<b>Motilidade (%)</b>	30	7	3	2	1
<b>Integridade MP (%)</b>	63	56	59	39	21
<b>Funcionalidade MP (%)</b>	62	36	31	27	29

Motilidade = Média dos avaliadores quanto à motilidade espermática pós-diluição (0h); Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células móveis; Integridade MP = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-diluição

(0h); Dados apresentados quanto ao porcentual (%) de células íntegras; Funcionalidade MP = Média dos avaliadores quanto à funcionalidade da MP no pós-diluição (0h); Dados apresentados quanto ao porcentual (%) de células com membrana funcional;

Neste piloto, apesar do grupo controle (Tris-gema) não ter alcançado o valor mínimo de 40% de motilidade, necessário para que estas amostras pudessem ser congeladas, pôde-se demonstrar que a presença do óleo essencial da casca de laranja, a partir da primeira concentração testada, de 1%, já demonstrou afetar negativamente os parâmetros espermáticos avaliados. Houve uma diminuição da motilidade, aumento do número de células com MP não-íntegras e diminuição do número de células com membrana plasmática funcional.

A partir destes valores preliminares, podemos inferir também que aumento da concentração do óleo essencial adicionado ao diluidor gera um maior dano espermático, podendo ser mensurado já na primeira avaliação às 0h após o contato com os espermatozoides.

É necessário que sejam feitas mais repetições deste experimento para poder confirmar esta correlação. Mas, pôde-se concluir deste piloto, que o óleo essencial de laranja não se apresenta como um ativo interessante para ser adicionado ao diluidor padrão Tris-gema, pois houve, principalmente, perda da motilidade mesmo na menor concentração testada.

## **5.2 Experimento II – Extrato bruto da casca de laranja**

### **5.2.1 Obtenção e preparação da casca para formulação do extrato bruto**

Foram utilizadas 20 laranjas, a média do peso das laranjas foi de 195,45 gramas e a média do peso das cascas foi de 30,7 gramas.

### **5.2.2 Obtenção do extrato bruto**

Foi obtido um extrato bruto de coloração marrom, alta viscosidade e cheiro similar ao do óleo essencial da casca de laranja.

### **5.2.3 Caracterização do extrato bruto e diluidores**

#### ***Determinação do potencial hidrogeniônico***

O valor do pH obtido para o extrato bruto foi inicialmente de 5, mas após ajuste e antes de ser adicionado aos diluidores, foi de 7. A Tabela 14 traz o resultado da mensuração do pH do diluidor padrão à base de Tris e gema de ovo (Tris-gema) e dos diluidores formulados com o extrato bruto (EB), respectivamente.

**Tabela 14** - Valores de pH dos diluidores com o extrato bruto da casca de laranja pera

<b>Grupos</b>	<b>pH</b>
Tris-gema	7,0
Tris-gema + 10% EB (EB1)	7,0
Tris-gema + 20% EB (EB2)	7,0
Tris + 10% EB (EB3)	6,5
Tris + 20% EB (EB4)	6,5

Os diluidores formados com as diferentes nanoemulsões mantiveram seu pH em 6. Já os diluidores adicionados de extrato, tiveram valores de pH maiores, sendo 7 para os grupos adicionados ao Tris-gema, e 6,5 para os grupos adicionados ao Tris.

A congelação dos espermatozoides deve ocorrer na presença de diluidores seminais, com objetivo de minimizar os danos causados pelo choque térmico, manter o pH e a osmolaridade adequada para estas células (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Um sistema tampão deve ser um dos constituintes destes diluidores, possibilitando que os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozoides sejam neutralizados, e assim, fazendo com que o pH da solução seja mantido próximo à neutralidade (6,8 a 7,1), pH ótimo para os espermatozoides (BORGES, 2008).

Uma vez que os diluidores acrescidos do extrato da casca de laranja apresentam valores de pH aceitável para criopreservação, mantendo-se na média do pH do diluidor padrão comumente utilizado, pode-se afirmar que eles apresentam uma alternativa promissora para esse processo.

### ***Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH***

Baseado na curva padrão do Trolox (Apêndice A), as Tabelas 15 e 16 apresentam os valores de equivalente de Trolox para cada concentração do extrato testada pelo método DPPH e dos diluidores T+10%EB e T+20%EB. Os dados obtidos para os diluidores TG+10% e TG+20% não estão descritos pois não foi possível realizar esta análise, devido à presença da gema de ovo que impossibilitou a medição da absorbância. A composição da gema de ovo, rica em proteínas, quando em contato com a solução de DPPH diluída em metanol, desencadeou uma desnaturação proteica, impossibilitando a avaliação espectrofotométrica das amostras.

**Tabela 15** - Potencial antioxidante pelo método DPPH para o extrato bruto

<b>Concentração do extrato bruto</b>	<b>TEAC (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1mg/mL	400,3
2mg/mL	597,1
3mg/mL	768,6

**Tabela 16** - Potencial antioxidante pelo método DPPH para os diluidores utilizados nas avaliações espermáticas

<b>Diluidores</b>	<b>TEAC (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Tris	0,0
T+10%EB	409,0
T+20%EB	771,1

O resultado obtido na concentração de 1mg/mL já demonstra que o extrato bruto da casca de laranja utilizado neste trabalho possui atividade antioxidante, sendo esta equivalente à 400  $\mu\text{g/mL}$  de Trolox. Quanto aos diluidores que foram de possível avaliação, temos que a solução de Tris de forma isolada não apresentou potencial antioxidante. Por outro lado, a adição da solução do extrato bruto, nas concentrações de 10 e 20%, ofereceram uma atividade antioxidante frente à esta metodologia. Sendo assim, conclui-se que a atividade antioxidante obtida nos diluidores T+10%EB e T+20%EB é decorrente da ação do extrato bruto e não da solução de Tris.

O potencial antioxidante das frutas é o resultado da ação sinérgica de diversos compostos, entre eles destacam-se os polifenóis ou compostos fenólicos. Contudo, a eficácia desta ação antioxidante depende da estrutura química e da concentração destes ativos no extrato (KAUR; KAPOOR, 2002). A laranja pera é descrita como sendo uma fruta com forte propriedade antioxidante, chegando a apresentar um percentual de sequestro do radical DPPH superior a 70% (MELO *et al.*, 2018). Estes dados vão de acordo com os resultados aqui obtidos, uma vez que o extrato da casca de laranja utilizado apresenta em sua composição uma alta concentração de compostos fenólicos.

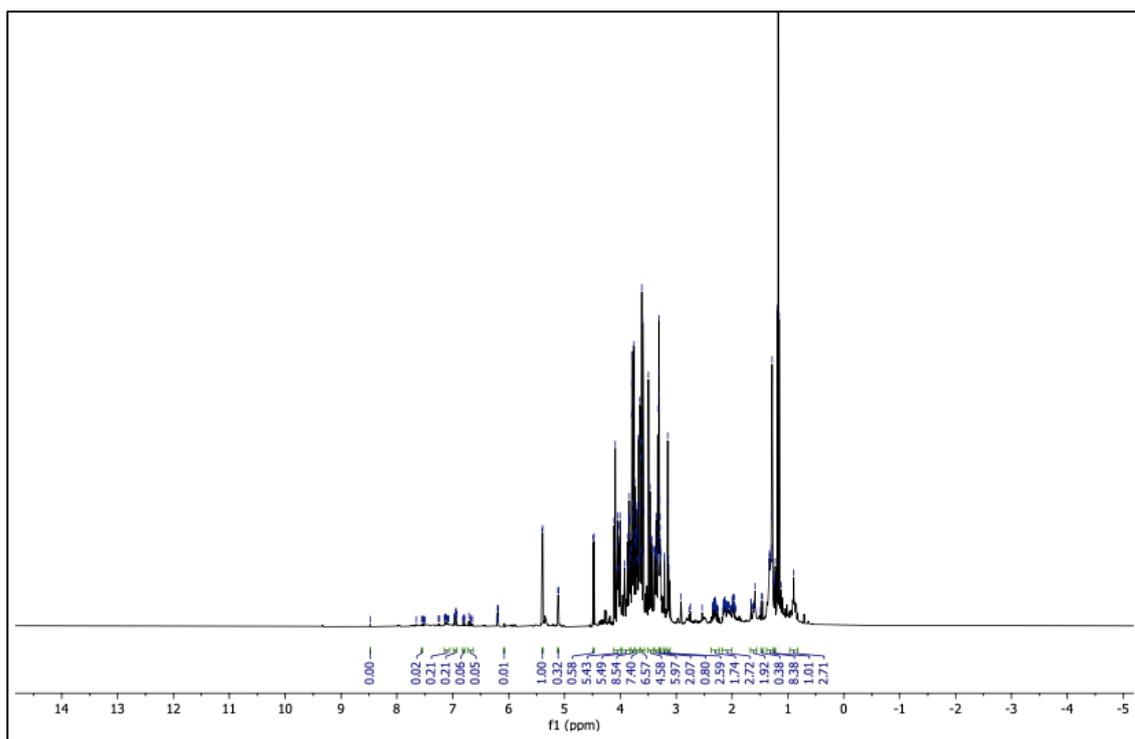
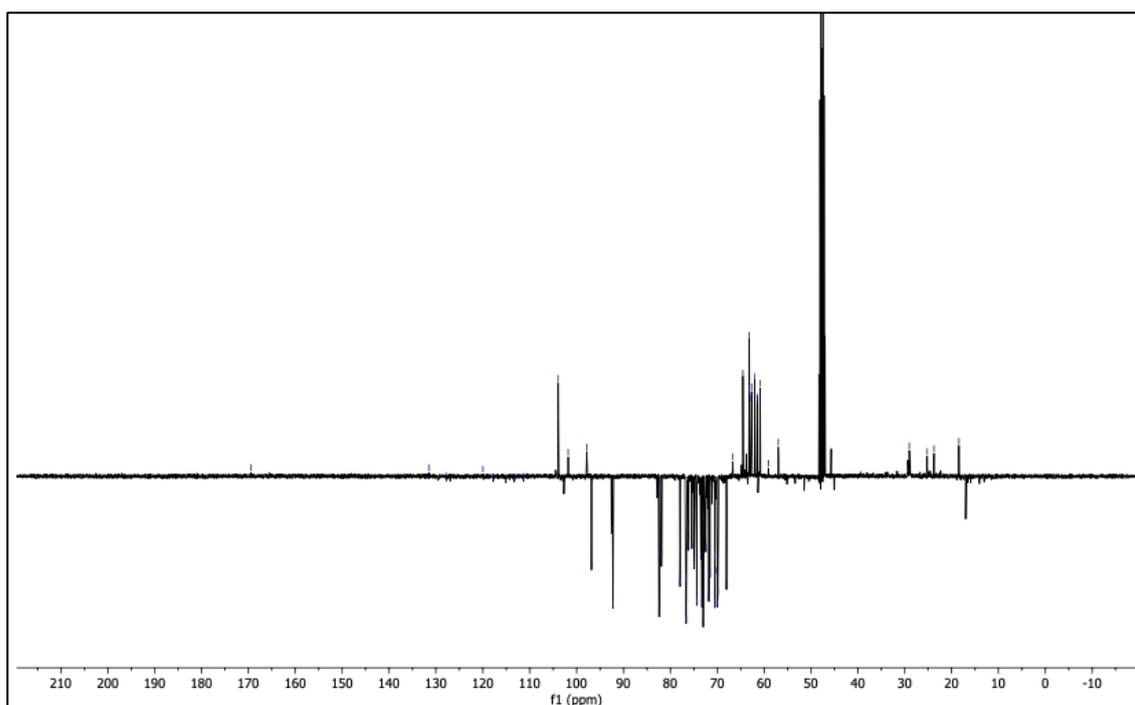
### ***Screening fitoquímico***

Os resultados do *screening* fitoquímico (figuras não mostradas) indicaram a ausência de saponinas e a presença de alcaloides, esteroides, taninos e flavonoides. Na avaliação da saponina, não houve formação de espuma no sistema. Para alcaloides, esteroides e taninos, houve formação do precipitado, indicando a presença destes compostos em seus respectivos testes. E para flavonoides, o resultado foi positivo pela apresentação da mudança de cor do sistema, apresentando coloração rósea após realização do teste.

Dados semelhantes quanto à presença destes compostos na casca de laranja foram descritos por Pereira *et al.* (2020), Silveira (2019) e Oliveira (2017).

### ***Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio $^1\text{H}$ e carbono $^{13}\text{C}$***

O espectro de hidrogênio  $^1\text{H}$  do extrato bruto está indicado na Figura 20 e o espectro de carbono  $^{13}\text{C}$  do extrato bruto está indicado na Figura 21.

**Figura 20** - Espectro de hidrogênio  $^1\text{H}$  do extrato bruto da casca de laranja pera**Figura 21** - Espectro de carbono  $^{13}\text{C}$  do extrato bruto da casca de laranja pera

Quanto ao espectro de  $^1\text{H}$ , foi possível perceber a presença de três intervalos distintos, os quais indicam a presença de certas classes de compostos químicos. O primeiro intervalo está entre 1,9 e 2,4 ppm (mg/Kg), e apresenta sinais de hidrogênios

alifáticos característicos de substâncias terpênicas. O segundo intervalo encontra-se entre 3 e 4 ppm e apresenta um envelope de sinais de características de açúcar ou glicosídeos. O terceiro intervalo está entre 6 e 8 ppm, e apresenta sinais característicos de substâncias aromáticas. O espectro de  $^1\text{H}$  forma ampliada para cada intervalo mencionado está presente no Apêndice B.

A partir da década de 1980, a presença de carboidratos passou a ser estabelecida com a utilização de dados de deslocamento químico, podendo ser avaliada pela técnica de RMN. Sinais de RMN de H em torno de 4,5 a 5 ppm podem indicar a presença de hidrogênios anoméricos de açúcares, juntamente com a presença de multipletos no intervalo de 3 e 4 ppm. Quanto aos espectros de RMN de C, a presença de carboidratos pode ser dada pela presença de sinais entre 90 a 115 ppm, correspondendo a carbonos anoméricos, e sinais em torno de 70 a 80 ppm, relativos aos carbonos hidroxilados. Além destes, a presença de glicosídeos pode ser destacada pela existência de um sinal em torno de 61 ppm (BORGES, 2006; GIL; GERALDES, 1987). O aspecto geral do espectro obtido neste trabalho apresenta muita semelhança com o espectro equivalente a classe dos carboidratos presente em Lima (2013), podendo ser considerado como o grupo de compostos majoritários presente neste extrato.

Segundo Pavia *et al.* (2016), os hidrogênios ligados a anéis aromáticos podem ser facilmente identificados dentro da faixa de deslocamento químico de  $^1\text{H}$  entre 6,5 e 8 ppm. Nesta faixa poucos outros tipos de hidrogênio irão apresentar absorção, caracterizando então uma correlação positiva quando há presença de sinais nesta faixa. Equivale para o grupo funcional aromático em compostos orgânicos. Além disto, a presença de compostos aromáticos, mais especificamente da classe dos flavonoides, pode ser reforçada pela presença de sinais com deslocamentos químicos próximos a 175 e 180 ppm em espectros de carbono (LIMA, 2013). A presença desta classe de compostos em extratos da casca de laranja também foi encontrada por Mencherini *et al.* (2012).

Um resultado similar quanto à disposição do espectro pode ser encontrado em Pei *et al.* (2022), que identificou e descreveu de forma detalhada a presença de 102 componentes da laranja, desde sua casca até seu suco, em diferentes variedades da fruta, a partir da avaliação de espectros de ressonância magnética nuclear.

### ***Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)***

A leitura espectrofotométrica da solução de 1mg/mL do extrato bruto resultou em uma absorbância de 0,191. Sendo assim, a partir da curva padrão do ácido gálico, este valor de absorbância indicou a presença de 340,88 mgEAG/100g de extrato bruto. Quanto à solução de extrato bruto na diluição 1:100, a qual foi utilizada na formulação dos diluidores testados, o valor de absorbância obtido foi de 1,335 e, a partir da mesma curva padrão, correspondeu a 2003,00 mgEAG/100g de extrato bruto.

O resultado obtido neste trabalho (equivalente a 1mg/mL) apresentou um valor maior de CFT em comparação aos extratos cítricos comerciais ( $142,19 \pm 8,35$  mgGAE/g de extrato) avaliados por Fiorentini *et al.* (2022).

Quimicamente, o extrato da casca de laranja é caracterizado pela presença de compostos fenólicos de grande poder antioxidante. De uma maneira geral, existe esta correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e a propriedade antioxidante das frutas e hortaliças (KAUR; KAPOOR, 2002). Todavia, outros autores não têm evidenciado esta correlação (ISMAIL; MARJAN; FOONG, 2004).

Assim, é necessário que a fim de explicar a capacidade antioxidante de um extrato, deve-se levar em consideração outros fatores além do seu teor de fenólicos totais. Deve-se observar a caracterização da estrutura do composto ativo e sua função biológica (HEINONEN, LEHTONEN, HOPIA, 1998/MELO *et al.* 2018).

### ***Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS***

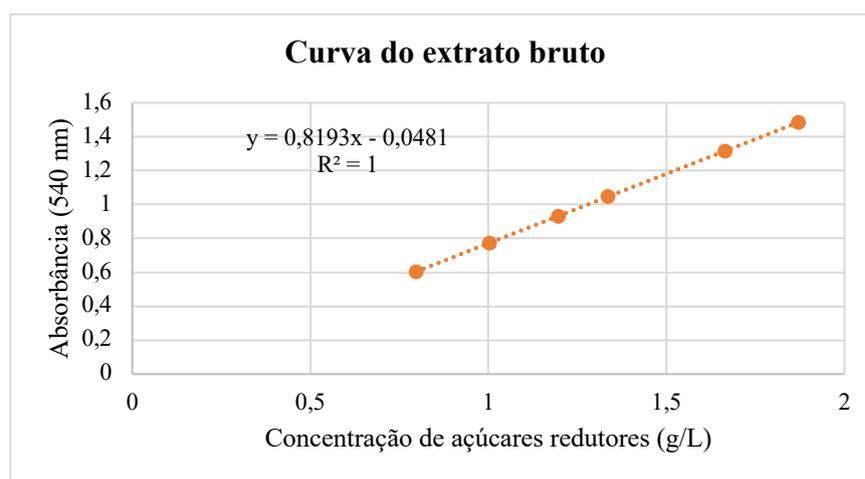
A tabela 17 traz os dados de absorbância e concentração de açúcares redutores nas diferentes diluições do extrato bruto da casca de laranja. Estes valores de concentração foram obtidos a partir da curva de calibração (Apêndice A). A Figura 22 representa a curva equivalente aos dados obtidos.

**Tabela 17** - Concentração de açúcares redutores no extrato da casca de laranja

<b>Diluição do extrato</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Concentração de açúcares redutores</b>
1:175	1,48	1,87 g/L

1:200	1,31	1,66 g/L
1:225	1,04	1,33 g/L
1:250	0,93	1,19 g/L
1:300	0,77	1,00 g/L
1:350	0,60	0,79 g/L

**Figura 22** - Curva da concentração de açúcares redutores nas diferentes diluições do extrato da casca de laranja



O teste de DNS é comumente utilizado para estimar a quantidade de açúcares redutores de uma amostra (GHOSE, 1987). Esse teste vem sendo aplicado na casca de laranja com a finalidade de medir a diferença na concentração destes açúcares em diferentes processos de extração, com variação de temperatura, substratos, solventes e biocatalizadores (KUMAR *et al.*, 2016/ MASHETTY; BIRADAR, 2019).

Os açúcares solúveis na casca de laranja variam entre 15 a 40% do peso total, eles atuam como um importante substrato para processos biológicos (AHMED *et al.*, 2016). Dentre eles, os açúcares principais encontrados são a glicose, frutose e sacarose, mas é possível encontrar em menor quantidade a xilose e glicopolissacarídeos (RIVAS *et al.*, 2008; TORRADO *et al.*, 2011). Os dados aqui obtidos indicam que o extrato produzido e utilizado neste trabalho apresenta uma alta concentração de açúcares redutores, este resultado vai de encontro a outros estudos que também realizaram esta técnica em diferentes extratos da casca de laranja (LOCATELLI, FINKLER, FINKLER, 2019; AYALA *et al.*, 2021).

Baseado no resultado obtido pela técnica de RMN e por esta técnica, pode-se considerar que o extrato da casca de laranja avaliado apresenta grande concentração de

carboidratos, entre eles os açúcares redutores, mas, seria necessário fazer uma análise mais detalhada para a determinação de quais moléculas específicas estão presentes.

### 5.2.5 Análises espermáticas

#### *Avaliação da motilidade espermática*

Os valores da média da motilidade espermática no pós-diluição e pós-descongelamento estão indicados na Tabela 18.

**Tabela 18** – Motilidade espermática no pós-diluição e pós-descongelamento

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-diluição</b> (%)	75,0±5,2 <sup>aA</sup>	79,1±3,7 <sup>aA</sup>	80,8±3,4 <sup>aA</sup>	19,1±13,1 <sup>bA</sup>	12,5±6,3 <sup>bA</sup>
<b>Pós-descongelamento</b> (%)	48,3±9,9 <sup>aB</sup>	50,8±9,3 <sup>aB</sup>	51,6±9,9 <sup>aB</sup>	0,6±0,5 <sup>bB</sup>	0,0 <sup>bB</sup>

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à motilidade espermática pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à motilidade espermática pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células móveis; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

A adição de 10 e 20% de extrato bruto da casca de laranja obteve resultados similares ao grupo controle (Tris-gema) quanto à motilidade espermática, tanto em 0h quanto na pós-descongelamento. Houve perda da motilidade em todos os grupos após a descongelamento, este processo já é esperado como resultado das crioinjúrias causadas pelo processo de criopreservação (SILVA; GUERRA, 2011). Os grupos que continham apenas a solução de Tris adicionada do extrato bruto, tanto nas concentrações de 10 e 20%, não apresentaram proteção à célula espermática epididimária bovina, uma vez que apresentam valores bem abaixo do grupo controle (no tempo 0h) e a perda quase total da motilidade após a descongelamento.

### ***Teste de integridade da membrana plasmática***

Os valores da média dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra no pós-diluição e pós-descongelamento estão indicados na Tabela 19.

**Tabela 19** – Teste de integridade da membrana plasmática no pós-diluição e pós-descongelamento

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-diluição</b>	72,1±5,4 <sup>aA</sup>	71,5±4,4 <sup>aA</sup>	71,6±5,2 <sup>aA</sup>	57,5±11,9 <sup>bA</sup>	45,0±11,1 <sup>bA</sup>
<b>Pós-descongelamento</b>	70,4±6,3 <sup>aA</sup>	72,1±2,4 <sup>aA</sup>	65,1±2,6 <sup>bB</sup>	6,2±3,3 <sup>cB</sup>	1,2±0,6 <sup>dB</sup>

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células íntegras; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

Não houve diferença estatística entre os grupos Tris-gema e TG+10%EB, tanto para o tempo 0h quanto para pós-descongelamento, assim como entre eles. Houve uma diminuição do número de células com MP íntegra no grupo TG+20%EB após a descongelamento, isso se dá em comparação ao grupo controle (Tris-gema) na mesma condição e ao próprio grupo no tempo de 0h. Quanto aos grupos T+10%EB e T+20%EB, estes apresentaram valores inferiores aos outros grupos, tanto no tempo 0h, quanto após a descongelamento.

Esta diminuição do número de células com MP íntegra indica que o extrato sozinho, e nestas concentrações testadas, não possui ação protetora de membrana o suficiente para os espermatozoides epididimários bovinos que irão passar pelo processo de congelamento.

### ***Teste de funcionalidade da membrana plasmática***

Os valores da média dos espermatozoides com membrana plasmática funcional (cauda enrolada) no pós-diluição e pós-descongelamento estão indicados na Tabela 20.

**Tabela 20** - Teste de funcionalidade da membrana plasmática pós-diluição e pós-descongelamento

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-diluição (%)</b>	80,5±4,2 <sup>aA</sup>	83,5±5,5 <sup>aA</sup>	85,6±4,8 <sup>aA</sup>	69,3±7,1 <sup>bA</sup>	68,6±11,8 <sup>bA</sup>
<b>Pós-descongelamento (%)</b>	46,6±3,6 <sup>aB</sup>	39,6±10,6 <sup>aB</sup>	34,1±6,9 <sup>aB</sup>	8,6±3,9 <sup>bB</sup>	4,6±2,0 <sup>bB</sup>

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à funcionalidade da MP no pós-diluição (0h); Pós-descongelamento = Média dos avaliadores quanto à funcionalidade da MP no pós-descongelamento; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células com membrana funcional; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

Dentre um mesmo tempo, não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos Tris-gema adicionados do extrato bruto, tanto para 10 e 20%. Contudo, assim como os parâmetros de motilidade e integridade de membrana, houve diferença estatística entre os grupos com apenas o extrato bruto e sem a adição da gema de ovo. Quanto à funcionalidade da membrana plasmática, para estes dois grupos, houve uma diminuição no número de células com membrana plasmática funcional quando em comparação com o controle, tanto para o tempo 0h e após a descongelamento.

Este resultado é complementar aos anteriores, e corrobora com o entendimento de que o extrato bruto sozinho não é capaz de proteger a membrana plasmática destas células. É uma vez que o dano a esta estrutura está diretamente relacionado à morte celular, há uma notável diminuição da motilidade espermática nestes grupos (MORAES, MEYERS, 2018).

### 5.2.5 Análises espermáticas pós-descongelamento

#### *Avaliação dos parâmetros cinéticos*

Dos dados obtidos, estão aqui descritos os valores de motilidade progressiva (Tabela 21) e motilidade total (Tabela 22).

**Tabela 21** - Motilidade progressiva (%) pós-descongelamento e após 1h

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-descong.</b>	23,8±11,7 <sup>aA</sup>	27,2±13,6 <sup>aA</sup>	22,03±6,4 <sup>aA</sup>	0,1±0,3 <sup>b</sup>	0,1±0,2 <sup>b</sup>
<b>Após 1h</b>	14,2±6,5 <sup>aB</sup>	17,4±6,2 <sup>aB</sup>	13,5±7,6 <sup>aB</sup>	-	-

Pós-descong. – Média da motilidade progressiva pós-descongelamento; Após 1h – Média da motilidade progressiva após 1h; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1h).

**Tabela 22** - Motilidade total (%) pós-descongelamento e após 1h

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-descong.</b>	55,2±20,0 <sup>aA</sup>	66,7±15,5 <sup>aA</sup>	57,5±9,0 <sup>aA</sup>	8,3±2,6 <sup>b</sup>	7,0±3,4 <sup>b</sup>
<b>Após 1h</b>	40,5±15,7 <sup>aB</sup>	48,6±17,1 <sup>aB</sup>	43,0±8,0 <sup>aA</sup>	-	-

Pós-descong. – Média da motilidade total pós-descongelamento; Após 1h – Média da motilidade total após 1h; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1h).

Nota-se que não houve diferença estatística entre os grupos controle (Tris-gema) e os grupos TG+10%EB e TG+20%EB, tanto após a descongelamento, quanto na análise após 1h. Houve, por outro lado, uma diferença estatística entre o mesmo grupo quanto ao tempo, sendo que para os grupos citados, houve uma diminuição da motilidade progressiva e total na avaliação após 1h. Apenas o grupo TG+20%EB não obteve diferença estatística para motilidade total entre a análise pós-descongelamento e após 1h.

Os grupos T+10%EB e T+20%EB tiveram tanto a motilidade total quanto a motilidade progressiva menores que o grupo controle, chegando a valores próximos de zero quanto à motilidade progressiva. Esta avaliação, diferentemente da motilidade espermática avaliada anteriormente, foi feita por um método computadorizado e mais robusto (ARRUDA *et al.* 2011). Contudo, pode-se observar uma correlação entre os dois resultados obtidos, em que ambos mostram a diminuição da motilidade espermática na condição de pós-congelamento.

### ***Integridade de membrana plasmática (iMP)***

Os valores da média dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra pós-descongelamento e após 1h estão indicados na Tabela 23.

**Tabela 23** – Integridade da membrana plasmática (iMP) pós-descongelamento e após 1h

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-descong.</b>	47,1±1,9 <sup>aA</sup>	39,2±4,8 <sup>aA</sup>	34,1±8,2 <sup>bA</sup>	3,2±1,3 <sup>c</sup>	1,0±1,2 <sup>c</sup>
<b>Após 1h</b>	42,7±5,7 <sup>aA</sup>	41,0±7,2 <sup>aA</sup>	33,8±5,6 <sup>aA</sup>	-	-

Pós-descong. = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-descongelamento. Após 1h = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP na avaliação após 1h; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células íntegras; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

Têm-se que não houve diferença estatística entre o grupo controle (Tris-gema) e o grupo TG+10%EB, tanto após a descongelamento, quanto na avaliação após 1h. Para o grupo TG+20%EB, no pós-descongelamento apresentou uma diminuição, quando em comparação ao grupo controle, no número de células com membrana plasmática íntegras. Esta diferença estatística não apareceu quanto aos dados obtidos no tempo após 1h. Para T+10%EB e T+20%EB, houve uma diminuição deste número, indicando perda da integridade da membrana plasmática nestes grupos. Este resultado apresenta interpretação semelhante ao teste de integridade da membrana plasmática avaliado anteriormente.

### ***Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)***

Os valores da média dos espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (corados em laranja) pós-descongelamento e após 1h estão indicados na Tabela 24.

**Tabela 24** – Potencial de membrana mitocondrial (PPM) pós-descongelamento e após 1h

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-descong.</b>	64,0±14,4 <sup>aA</sup>	65,1±8,8 <sup>aA</sup>	68,9±11,2 <sup>aA</sup>	2,4±1,7 <sup>b</sup>	0,7±0,6 <sup>b</sup>
<b>Após 1h</b>	64,5±14,2 <sup>aA</sup>	66,8±9,1 <sup>aA</sup>	64,6±13,4 <sup>aA</sup>	-	-

Pós descong. – Média das células com alto potencial de membrana no pós-descongelamento; Após 1h – Média das células com alto potencial de membrana após 1h; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1h).

Para o PPM, não houve diferença estatística entre os grupos controle (Tris-gema), TG+10%EB e TG+20%EB, tanto para avaliação pós-descongelamento, quanto para o tempo

após 1h. Também não houve diferença entre estes dois tempos para um mesmo grupo. Apenas os grupos T+10%EB e T+20%EB apresentaram diferença estatística dos demais, caracterizando uma diminuição do número de células com alto potencial de membrana.

### ***Integridade de membrana acrossomal (iAC)***

Os valores da média dos espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (corados em verde brilhante) pós-descongelamento e após 1h estão indicados na Tabela 25.

**Tabela 25** - Integridade de membrana acrossomal (iAC) pós-descongelamento e após 1h

	<b>Tris-gema</b>	<b>TG+10%EB</b>	<b>TG+20%EB</b>	<b>T+10%EB</b>	<b>T+20%EB</b>
<b>Pós-descong.</b>	69,5±8,6 <sup>aA</sup>	73,4±7,4 <sup>aA</sup>	74,5±8,4 <sup>aA</sup>	49,1±9,5 <sup>b</sup>	39,0±9,9 <sup>b</sup>
<b>Após 1h</b>	68,2±9,9 <sup>aA</sup>	70,9±6,4 <sup>aA</sup>	71,9±8,7 <sup>aA</sup>	-	-

Pós-diluição = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP no pós-descongelamento; Após 1h = Média dos avaliadores quanto à integridade da MP após 1h; Dados apresentados quanto ao percentual (%) de células íntegras; Letras minúsculas indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de uma mesma condição (0h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0h e pós-descongelamento).

Assim como o teste anterior, não houve diferença estatística entre os grupos controle (Tris-gema), TG+10%EB e TG+20%EB, tanto logo após a descongelamento, assim como na avaliação após 1h. Também não houve para estes grupos diferença entre os valores nos dois tempos. Houve diferença estatística para os grupos T+10%EB e T+20%EB, com uma diminuição do número de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra.

A partir dos dados obtidos nas avaliações cinéticas pós-descongelamento conclui-se que a adição do extrato da casca de laranja pera, tanto na concentração de 10 e 20%, de maneira geral não apresentou diferença estatística ao grupo controle (Tris-gema).

Além disso, pôde-se perceber que os grupos com apenas o extrato bruto (10 e 20%), e que não havia a presença da gema, mostraram não protegerem os espermatozoides epididimários bovinos quanto à integridade e funcionalidade da sua membrana plasmática, integridade da membrana acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.

A ausência de proteção às estas estruturas (membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias) está relacionada com a perda da motilidade (total e progressiva) destas

células, principalmente quando submetidas à técnica de congelação (SILVA; GUERRA 2011).

A adição de substâncias antioxidantes no diluidor seminal é um dos fatores que influenciam a melhora dos parâmetros de avaliação espermática, principalmente quanto à motilidade espermática (total e progressiva) (BOZZI, 2017/ DANELUZ, 2016/ TONIOLLI, 2012). O aumento destes parâmetros indica um aumento da qualidade do sêmen pós-descongelação (KALTHUR *et al.*, 2010).

### 5.2.6 Testes microbiológicos

#### ***Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)***

Os valores obtidos de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) para os diluidores com o extrato bruto da casca de laranja estão indicados nas Tabelas 26 e 27, respectivamente.

**Tabela 26** - Concentração inibitória mínima dos diluidores com extrato bruto

	<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA02	<i>Escherichia coli</i> AV12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC-13883
<b>TG+10%EB</b>	0,75%	-	5,00%
<b>TG+20%EB</b>	1,25%	-	5,00%
<b>T+10%EB</b>	-	5,00%	10,00%
<b>T+20%EB</b>	0,75%	20,00%	20,00%

**Tabela 27** - Concentração bactericida mínima dos diluidores com extrato bruto

	<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA02	<i>Escherichia coli</i> AV12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC-13883
<b>TG+10%EB</b>	0,75%	-	0,75%
<b>TG+20%EB</b>	0,75%	-	1,25%
<b>T+10%EB</b>	5,00%	20,00%	10,00%
<b>T+20%EB</b>	20,00%	20,00%	20,00%

Os grupos TG+10%EB e TG+20%EB, nas concentrações utilizadas no trabalho (de 10 e 20%, respectivamente) inibiram o crescimento e matar as colônias de *Staphylococcus aureus* UFPEDA02 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC-13883, mas não da *Escherichia coli* AV12. Este resultado pode estar relacionado com as características multidrogarresistente desta última espécie, sendo esta de mais difícil inibição. Apesar disto, pela sua propriedade inibitória e bactericida das outras duas bactérias, pode-se considerar que estes grupos apresentam atividade antimicrobiana. Este potencial é interessante para estes grupos, uma vez que o extrato bruto adicionado ao diluidor possibilita utilizar a da gema de ovo, um ingrediente que naturalmente apresenta altos riscos de contaminação, de forma mais segura.

Quanto aos grupos T+10% e T+20%, estes também inibiram o crescimento bacteriano e inviabilizar as células, desta vez para as três bactérias testadas. Contudo, os valores de concentração necessários para isto foram maiores do que o observado anteriormente. Têm-se então que a o extrato bruto da casca de laranja apresenta atividade antimicrobiana para os microrganismos testados.

A composição química dos resíduos da laranja (*Citrus sinensis*) aponta a presença de carboidratos, flavonoides, glicosídeos, cumarinas, compostos voláteis, ácidos orgânicos e óleos (OIKEH; ORIAKHI; OMOREGIE, 2013) Dentre estes grupos, os compostos fenólicos, óleos essenciais, taninos, alcaloides, flavonoides e saponinas, são as moléculas consideradas como responsáveis pelo efeito antimicrobiano nesta planta (RAHMAN *et al.*, 2011) A ação sinérgica destes compostos é descrita quanto à inibição do crescimento de patógenos (NWANKWO; ONWUAKOR; ANINWEZE, 2014).

Os resultados destas análises apresentam similaridade com o que foi obtido por Shetty *et al.* (2016), El-Desoukey *et al.* (2018), Baba *et al.* (2018) e Oikeh *et al.* (2020), que também investigaram a atividade antimicrobiana do extrato da casca de laranja em bactérias patógenas e em diferentes fungos. Estes autores sugerem que a atividade antimicrobiana deste extrato é o resultado da ação sinérgica dos compostos fenólicos, flavonoides e taninos presentes na amostra.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial da casca de laranja pera foi obtido com um maior rendimento pela metodologia de extração do tipo hidrodestilação com as carcas trituradas. Este óleo apresentou pH ácido e baixa atividade antioxidante. As nanoemulsões formuladas com este ativo, juntamente ao surfactante polisorbato 80 não obtiveram bons resultados quanto à estabilidade de suas formulações, assim como não apresentaram atividade crioprotetora para os espermatozoides epididimários bovinos.

O extrato bruto da casca de laranja-pera apresentou alta concentração de carboidratos, entre eles os açúcares redutores, e alta concentração de compostos fenólicos totais. Também apresentou atividade antioxidante maior que o óleo essencial estudado. Apesar do potencial antioxidante, os diluidores formulados com 10 e 20% da diluição (1:100) deste extrato adicionados ao diluidor padrão (Tris-gema) não apresentaram diferença significativa ao grupo controle quanto aos parâmetros de avaliação espermática. Os diluidores formulados apenas com Tris e a diluição do extrato bruto (10 e 20%) obtiveram resultados indesejáveis quanto aos parâmetros de avaliação espermática. Estes grupos não apresentaram atividade crioprotetora para estas células nestas condições de estudo.

Apesar das nanoemulsões e diluidores testados neste trabalho não apresentarem atividade crioprotetora, é necessário um aperfeiçoamento das metodologias utilizadas no preparo das nanoemulsões, além de novos testes com diferentes concentrações do extrato bruto, a fim de avaliar mais profundamente seu potencial crioprotetor.

## REFERÊNCIAS

ABDELGHFFAR, E. A. et al. Orange fruit (*Citrus sinensis*) peel extract attenuates chemotherapy-induced toxicity in male rats. **Food Funct.**, v. 12, p. 9443-9455, 2021.

AHMED, I. et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v.9, n. 2, p. 148-154, 2016.

AITKEN, R.J. et al. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian J. Androl.**, v. 16, p. 31–38, 2014.

ALMEIDA, F.C. et al. Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. **Andrologia**, v.49, p.e12623, 2017.

ALMEIDA, F.S. Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino sobre a produção in vitro de embriões. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2020.

ALVES, I.M. Extração de óleo essencial a partir da casca de frutas cítricas pela destilação por arraste a vapor. **V Congresso Interdisciplinar de Pesquisa, Iniciação Científica e Extensão Universitária**, 2020.

ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; VANITHA, M. K. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. **Journal of Food Biochemistry**, v.1, 2020.

ANANDHI, B. et al. Formulation of emulsions from plant essential oils against microbial biofilms. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Reseach**, v. 11, n.11, p. 5725-5732, 2020.

ARAÚJO, G. F. Viabilidade da dose fracionada de sêmen bovino criopreservado descongelada por diferentes métodos. **Mestrado em Ciência Animal (Dissertação)**, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, 2010.

ARAÚJO SILVA, R.A.J. et al. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat sêmen related with seminal plasma removal. **Animal Reproduction**, v.16, p.895–901, 2019.

ARRUDA, R. P. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.

ARRUDA, R.P et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 35, n. 2, p.145-151, 2011.

ASOKAN, G. V. et al. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of MedlinePubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. **Oman Medical Journal**, v. 34, n. 3, p. 184-193, 2019.

AYALA, J.R et al. Characterization of Orange Peel Waste and Valorization to Obtain Reducing Sugars. **Molecules**, v. 26, n. 1348, 2021.

AZAR, P. A. et al. Chemical composition of the essential oils of *Citrus sinensis* cv. Valencia and a quantitative structure-retention relationship study for the prediction of retention indices by multiple linear regression. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 76, n. 12, p. 1627-1637, 2011.

BABA, J. et al. Antibacterial activity of sweet Orange *Citrus sinensis* on some clinical Bacteria species isolated from wounds. **Journal of Family Medicine and Community Health**, v. 5, n. 4, 2018.

BARBOSA, L. M. et al. Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo de touros post-mortem. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, p. 14, 2012.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração.

**Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

BERGER, R.G.; KRINGS U.; E ZORN, H. Biotechnological flavours generation. **Food flavour technology**. p. 60-104, 2002.

BERNARDI, J. et al. Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 301-310, 2010.

BONACUCINA, G. et al. Colloidal Soft Matter as Drug Delivery System. **J. Pharm. Sci**, v. 98, p. 1–42, 2009.

BORA, H. et al. Citrus Essential Oils (CEOs) and Their Applications in Food: An Overview. **Plants**, v. 9, n. 357, 2020.

BORGES, J. C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro*. **Mestrado em Medicina Veterinária (Dissertação)**, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP, 2008.

BOZZI, A. R. Adição de sucos de frutas e beterraba no diluente de sêmen criopreservado ovino. **Dissertação (Mestrado)** – APTAA/SAA, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W. et al. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. 2010. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm)>

CÂMARA, T.S et al. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, v. 28, n.2, p.67-83, 2018.

CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2014.

CANDEIAS, M. L. Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, 2010.

CARVALHO, K. G. A et al. Extrato da casca da laranja como inibidor de corrosão. **Revista Exatamente Newton**, n. 1, p.125-134, 2020.

CASTELO, T. S. et al. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CASTRO, S. V et al. Intracellular Cryoprotant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011.

CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal: manual de orientação**. Belo Horizonte, 2013.

CHIRNEA, V. H. Efeito do meio de congelamento sobre as características morfofuncionais do sêmen canino. **Dissertação (Mestrado)** – UNESP, 2004.

CHOI H. S., et al. Radical- scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **J Agric Food Chem.**, v. 48, n. 9, p. 4156–4161, 2000.

CHUTIA, M. et al. Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n.3, p. 679-796, 2009.

COLLODEL et al. Relevance of fatty acids to sperm maturation and quality. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

DANELUZ, L. O. Efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre a

função espermática bovina. **TCC (Graduação)** – UFP, 2016.

DARR, C.R. et al. Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion sperm spermatozoal health and varies with cryopreservation media. **Theriogenology**, v. 86, p. 1382–1392, 2016.

DEEPA, B; ANURADHA, C.V. Linalool, a plant derived monoterpene alcohol, rescues kidney from diabetes-induced nephropathic changes via blood glucose reduction. **Diabetologia Croatica**, v. 40, p. 121–137, 2011.

DEITOS, A. et al. Avaliação do resíduo casca de laranja na obtenção de pectina e óleo essencial. **IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**, 2014.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EL-DESOUKEY, R.M.A et al. The phytochemical and antimicrobial effect of Citrus sinensis (Orange) Peel powder extracts on some animal pathogens as eco-friendly. **EC Microbiology**, v. 14, n. 6, p.312–318, 2018.

ESPINOZA et al. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. **Andrologia**, v. 41, p. 51–54, 2009.

FAO. The State of Food and Agriculture 2019. **Moving forward on food loss and waste reduction**. Rome, 2019.

FARHAT, A. et al. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. **Food and bioproducts processing**, v. 125, p. 255-261, 2011.

FARIAS, C.F.A. Estudo da eficácia da aloe vera como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos, **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal da Paraíba, 68p. 2017.

FERNANDES, C.P. et al. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Rev. Bras.Farmacogn.**, v. 23, p. 108–114, 2013.

FERNANDES, R. E.; CARDOSO, M. G.; HOFFMANN, R. S. Aproveitamento da casca da laranja através da extração de óleos essenciais. **11º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia**, 2006.

FERRONATO, A.N; ROSSI, R.C. Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingrediente natural. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v.12, n.2, p.78-93, 2018.

FIORENTINI, C. et al. Citrus Peel Extracts for Industrial-Scale Production of Bio-Based Active Food Packaging. **Foods**, v. 11, n. 30, 2022.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 160-170, 2011.

GEANKOPLIS, C. J. Transport process and unit operations. 3ed. **Englewood Cliffs: PrenticeHall**, 1993.

GENHARTDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KIEG, N. R. Methods for general and molecular bacteriology. 1<sup>st</sup> ed. Washington: American Society for microbiology, 1994. 791p.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl Chem.**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GONZALEZ-FERNANDEZ, L. et al. Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and mitochondria. **Theriogenology**, v. 78, p. 415–422, 2012.

GONZÁLES-MAS, M. C. et al. Volatile Compounds in Citrus Essential Oils: A Comprehensive Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n.12, 2019.

GREEN, K.W.; CLUNAS, H.; NARANJO, C.J. A Review of the Potential Use of Pinene and Linalool as Terpene-Based Medicines for Brain Health: Discovering Novel Therapeutics in the Flavours and Fragrances of Cannabis. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, 2021.

GRIFFIN, W.C. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 5, p. 249–256, 1954.

GROTTER, L.G. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, n.4, p.655-665, 2018.

GUO, J. et al. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 1-840, 2018.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, v.12, p. 2826–2841, 2016.

HAN, D., WILLIAMS, E., CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochem. J.**, v. 353, p. 411–416, 2001.

HASHTJIN, A.M.; ABASSI, S. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 40–48, 2015.

HU, C.H. et al. Comparison of mitochondrial function in boar and bull spermatozoa throughout cryopreservation based on JC-1 staining. **Cryo. Lett.**, v. 38, p. 75–79, 2017.

IBARZ, A.; BARBOSA CANOVAS, G. V. Unit operations in food engineering. **Boca Raton CRC**, 2002.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chem.**, v. 87, p. 581-586, 2004.

ISO. International Standart 9235 (2013) Aromatic natural raw materials-vocabulary. International Organization for Standardization. Disponível em <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en> Acesso em: 3 de dezembro de 2021.

JACOB, R. G. et al. Óleos Essenciais como Matéria-Prima Sustentável para o Preparo de Produtos com Maior Valor Agregado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2017.

JEYENDRAN, R.S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics, **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JORDAN, J.; CHALLA, S.S.R.K; THEEGALA, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. **J Mol Catal B Enzym.**, v. 68, p. 139–146, 2011.

JUNIOR, A. M.; FEITOSA, F.L.F. Semiologia do sistema reprodutor masculino. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária – a arte do diagnóstico**. Ed. Roca. 3a. ed. 2014. Cap. 8, p. 401-425.

KALE, S. N.; DEORE, S.L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. **Syst. Rev. Pharm.**,v. 8, p. 39–47, 2016.

KALTHUR, G. et al. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw–induced DNA damage. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 3, 2011.

KARTHIK, P; EZHILARASI, P. N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 1435–1450, 2017.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 37, p. 153-161, 2002.

KAUR, G.; MEHTA, S.K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 134-160, 2017.

KIM, Y. W. et al. Safety Evaluation And Risk Assessment Of d- Limonene. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B**, v. 16, n.1, p.17-38, 2013.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

KUMAR, S et al. Reusable nanobiocatalysts for the efficient extraction of pigments from orange peel. **J Food Sci Technol.**, v. 53, n. 7, p. 3013-3019, 2016.

LEÃO, M. Análise do óleo essencial da laranja doce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck obtido das cascas secas e frescas através do método de extração por hidrodestilação, **Dissertação (TCC)** - Universidade de Santa Cruz do Sul, 49p., 2015.

LEITE, P. A. et al. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Científica - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 279-286, 2011.

LENZ, D.R. et al. Avaliação de diferentes crioprotetores e tempos de descongelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.42, n.1, p.36-41, 2018.

LEON, P. M. M. Criopreservação de Oócitos e Embriões, Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas, 2011.

LIMA, D. I. Identificação de compostos orgânicos na química de produtos naturais por técnicas de RMN. **Tese (Doutorado)** – UFA, 2013.

LIMA, L. A. Avaliação da atividade repelente de nanoemulsões a base de óleo essencial de *Baccharis reticularia* e de três constituintes contra *Tribolium castaneum*. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Amapá, 2020.

LOCATELLI, G. O; FINKLER, L; FINKLER, C. Orange and Passion Fruit Wastes Characterization, Substrate Hydrolysis and Cell Growth of *Cupriavidus necator*, as Proposal to Converting of Residues in High Value Added Product. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, 2019.

LU, Q. et al. Peel oils from three Citrus species: volatile constituents, antioxidant activities and related contributions of individual components. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 4492–4502, 2019.

MAGALHÃES, M.L. et al. Biological activities of the essential oil from the Moro orange peel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Flavour and Fragrance Journal**, v.35, n.3, p.294-301, 2020.

MAHATO, N. et al. Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 611-625, 2019.

MAHMOUD, A. E. et al. Effect of D-Limonene on the Age-Related Androgenic Changes in Male Rats. **Med. J. Cairo Univ.**, v. 88, n. 2, p. 599-609, 2020.

MANCHERINI, T. et al. HPLC-PDA-MS and NMR Characterization of a Hydroalcoholic Extract of *Citrus aurantium* L. var. amara Peel with Antiedematogenic Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1686-1693, 2013.

MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 382-387, 2007.

MARQUES FILHO, W. C. Espermatogênese em bovinos. 2006. 25 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia)** - Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, Botucatu 2006.

MARTINS JÚNIOR, A.; FEITOSA, F. L. F. Semiologia do Sistema Reprodutor Masculino. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico**. 2ed.

São Paulo: Roca, 2008. Cap. 8, p. 399-425.

MASHETTY, S.B.; BIRADAR, V. Orange Peel as Novel Substrate for Enhanced Invertase Production by *A. niger* in Solid State Fermentation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 4, 2019.

MCCLEMENTS, D.J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, v. 51, p. 285–330, 2011.

MELO, S. A. Floração, frutificação e características físico-químicas de laranja ‘Pera-Rio’ em relação à disposição na copa. **Dissertação (mestrado)** - INPA, Manaus, 96p., 2013.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORADI, S; BARATI, A. Essential Oils Nanoemulsions: Preparation, Characterization and Study of Antibacterial Activity against *Escherichia Coli*. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199-210, 2019.

MORAES, C. R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. **Animal Reproduction Science**, v. 194, p. 71–80, 2018.

MOREIRA, I. J. A. et al. Prospecção tecnológica da utilização do beta-pineno. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 2, p.186-194, 2013.

MORENO-TREJO et al. Development of Nano-Emulsions of Essential Citrus Oil Stabilized with Mesquite Gum. **Nanoemulsions - Properties, Fabrications and Applications**, 2019.

MURADÁS, P.R. et al. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.3, p.62-68, 2006.

NADRI, T. et al. Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. **Theriogenology**, v. 133, n.15, p. 38-44, 2019.

NEVE, M.; HENRY, M. Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 36, n. 4, p. 209-214, 2012.

NICOLOSI, E. et al. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 8, p. 1155-1166, 2000.

NOUDEH, G.D. et al. Study of the effects of polyethylene glycol sorbitanesters surfactants group on biological membranes. **International Journal of Pharmacology**, v. 4, p.27-33, 2008.

NWANKWO, I.U.; ONWUAKOR, C.E.; ANINWEZE, O.N. Antibacterial activity of Ethanolic extracts of *Citrus sinensis* peels on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa isolated from wound infections. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 941-947, 2014.

OIKEH, E.I.; ORIAKHI, K.; OMOREGIE E.S. Proximate analysis and phytochemical screening of *Citrus sinensis* fruit wastes. **The Bioscientist**, v. 1, n. 2, p.164–170, 2013.

OIKEH, E.I et al. Quantitative phytochemical analysis and antimicrobial activities of fresh and dry ethanol extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet Orange) peels. **Clinical Phytoscience**, v. 6, n. 46, 2020.

OKARU, A. O.; LACHENMEIER, D. W. The Food and Beverage Occurrence of Furfuryl Alcohol and Myrcene—Two Emerging Potential Human Carcinogens? **Toxics**, v. 5, n. 9, 2017.

OLIVEIRA, E. M. D. Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pêra Rio orgânica. **Dissertação (Mestrado) – FCFAR**, 2017.

PAVIA, D. L. et al. Introdução à Espectroscopia. **4ª Ed**, 2016.

PAVONI et al. Green Micro-and Nanoemulsions for Managing Parasites, **Vectors and Pests. *Nanomaterials***, v. 9, n. 1285, 2019.

PAVONI et al. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. ***Nanomaterials***, v. 10, n. 135, 2020.

PEGG, D.E. Principles of cryopreservation. ***Methods in Molecular Biology***, v.1257, p.3–19, 2015.

PEI, Y. et al. Compositional Analysis of Four Kinds of Citrus Fruits with a NMR-Based Method for Understanding Nutritional Value and Rational Utilization: From Pericarp to Juice. ***Molecules***, v. 27, n. 2579, 2022.

PENITENTE FILHO, J. M. Adição da vitamina E na criopreservação do sêmen caprino. **Mestrado em Zootecnia (Dissertação)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2010.

PERRY, S.W. et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. ***Biotechniques***, v. 50, p. 98–115, 2011.

RAHMAN, S. ET al. Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water. ***Bangladesh Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials***, v. 10, n. 10, 2011.

RAZOLA-DÍAZ et al. Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil. ***Food Chemistry***, v. 354, 2021.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S; AMANTE, E.R. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. ***Food and bioproducts processing***, v. 90, p. 606–614, 2012.

RIVAS, B. et al. Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate. ***J Agric Food Chem***, v. 56, p. 2380-2387, 2008.

SALAGER, J.L. et al. Surfactant-oil-water systems near the affinity inversion part i: relationship between equilibrium phase behavior and emulsion type and stability.

**Journal of Dispersion Science and Technology**, v.3, n.3, p. 279-292, 1982.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALES, L.C.S. Avaliação da adição de quercetina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) na criopreservação de espermatozoides epididimários bovinos, **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal da Paraíba, 56p., 2017.

SANTOS, A. C. A; SERAFINI, L. A; CASSEL, E. Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas, 112p, 2003.

SANTOS, E. R. Q. Óleos essenciais ricos em linalol (aniba rosaeodora, a. parviflora e aeollanthus suaveolens) na amazônia e seus efeitos neurocomportamentais em roedores. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal do Pará, 2017.

SANTOS, A. C. A; SERAFINI, L. A; CASSEL, E. Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas. **4º Fórum Internacional de Resíduos Sólidos**, 112p., 2003.

SAKAMOTO, K. et al. Emulsion and Emulsification Technology. **Cosmet. Sci. Technol**, p. 489–506, 2017.

SHETTY, S. B. et al. Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental caries bacteria: An *in vitro* study. **J Clin Exp Dent.**, v.8, n.1, p.71-77, 2016.

SIEME, H. et al. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 2-5, 2016.

SILVA, M.F.R. Caracterização de aleloquímicos envolvidos nas interações interespecíficas entre plantas e duas espécies de díptera: *Beebeomyia taccarivora* Wendt & Maia sp. nov. e *Aedes aegypti* Linnaeus, **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Pernambuco, 113p., 2018.

SILVA, N.C. Uso de antioxidantes em diluentes de criopreservação de sêmen bovino, **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Goiás, 96p., 2017.

SILVA, N.C. Efeito da adição de diferentes antioxidantes em diluentes de criopreservação sobre a qualidade do sêmen e a produção in vitro de embriões bovinos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, 2020.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVEIRA, K. G. Caracterização físico-química e bioacessibilidade de compostos fenólicos de sucos e cascas de laranja e limão. **TCC (Graduação)** – UFSC, 2019.

SIMAS, D.L.R. et al. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas. **Citrus Research & Technology**, v.36, n.1, p.15-26, 2015.

SINGH, V. K.; SINGH, A. K.; KUMAR, R.A.S Development of soya milk extender for semen cryopreservation of karan fries (crossbreed cattle). **Cryo-Letters**, v. 34, n.1, p. 52–61, 2013.

SITEPU, S.A. et al. Quality differences of boer liquid semen during storage with addition sweet orange essential oil in tris yolk and gentamicin extender. **Journal of Community Service and Research**, v. 1, n.2, p.78-82, 2018.

SITEPU, E.A. et al. Improved quality of frozen boer goat semen with the addition of sweet orange essential oil on tris yolk and gentamicin extender. **International Conference on Agriculture, Environment, and Food Security**, v.122, 2018.

SITEPU, E.A; MARISA, J. The effect of addition sweet orange essential oil and penicillin in tris yolk extender to Simmental liquid semen against percentage motility, viability and abnormalities of spermatozoa. **International Conference on Animal Production for Food Sustainability**, v. 287, 2019.

SITEPU, E.A. et al. Percentage Viability Spermatozoa in Post-Thawing Boer Buck Semen with Addition of Sweet Orange Essential Oil to Tris Yolk Extender. **Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences**, v.6, n.4, p.1-5, 2020.

SOMMANO, S. R. et al. The Cannabis Terpenes. **Molecules**, v. 25, n. 5792, 2020.

SNOEK, P. P., HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen eqüino. **Arq Bras Med Vet e Zootec**, v. 59, n. 1, p. 56–64, 2007.

SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, V. K. Biological action of essential oils (terpenes). **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 10, n. 3, p. 6854-6859, 2020.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. **Animal**, v. 12, n.1, p. 27-35, 2018.

SUNDARARAJAN, B. et al. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 475-485, 2018.

SURENDRAN, S. et al. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.

SWAIN, J.E.; SMITH, G.D. Fertility Cryopreservation. Chapter 4: Cryoprotectants - **Cambridge University Press**, 2010.

SWANSON, E.W; BEARDEN, H.J. An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa, **Journal of Animal Science**, v.10, n. 4, p. 981–987, 1951.

TAO, N. et al. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v.153, p. 265–271, 2014.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, p. 1-8, 2019.

TRANCHIDA, P.Q. et al. Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n.2, p. 98-123, 2011.

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

TORRADO, A.M. et al. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Braz J Microbiol**, v. 42, p. 394-409, 2011.

TRALDI, A.S., Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – **Manual técnico. Texto apostilado**, 1994.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol. Lond.**, v. 552, p. 335–344, 2003.

VADNAIS, M. L.; ALTHOUSE, G.C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 1508–1516, 2011.

VAN DAT, D. et al. Orange Peel Essential Oil Nanoemulsions Supported by Nanosilver for Antibacterial Application. **Indonesian Journal of Chemistry**, v.20, n. 2, p 430-439, 2020

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**, v. 54, p. 57-67, 2000.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 0, p. 463–471, 1963.

VELÁZQUEZ-NUÑEZ, M.J et al. Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 2013.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p. 149–179, 2002.

VIEIRA, A. J. et al. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018.

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

VOO, S. S., GRIMES, H. D.; LANGE, B. M. Assessing the Biosynthetic Capabilities of Secretory Glands in Citrus Peel. **Plant Physiology**, v. 159, p. 81–94, 2012.

WALSTRA, P. Principles of emulsion formation. **Chem. Eng. Sci**, v. 48, p. 333–349, 1993.

WANG, C. et al. Microbial Platform for Terpenoid Production: *Escherichia coli* and Yeast. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

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

WITTHAYAPANYANON, A, et al. Formulation of ultra low interfacial tension systems using extended surfactants. **J. Surfactants Deterg**, v. 9, p. 331–339, 2006.

ZHANG, W. et al. Peel Essential Oil Composition and Antibacterial Activities of *Citrus x sinensis* L. Osbeck ‘Tarocco’ and *Citrus reticulata* Blanco. **Horticulturae**, v. 8, n. 793, 2022.

## Anexo I – Preparação dos diluidores padrão

- Preparação da solução de Tris

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Tris-hidroximetilaminometano	3,605g
Ácido cítrico	2,024g
Frutose	1,488g
Água destilada	100 mL

Preparação do diluidor padrão Tris-gema

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
TRIS	80 mL
Gema de ovo	20 mL
Antibiótico	3 mg

Retirar 5 mL do meio e acrescentar 5 mL de glicerol.

- Preparação do diluidor padrão leite desnatado

Pesar:

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Leite em pó desnatado	10g
Glicose	194 mg
Água destilada	100 mL

Retirar 7 mL do diluidor e acrescentar 7 mL de glicerol.

## Anexo II – Preparação das soluções para os testes

### Preparação da solução de DNS

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	2,5g
Hidróxido de sódio (NaOH) 2N	50 mL
Água destilada	200 mL
Sal de Rochelle	75g

### Preparação da solução eosina-nigrosina

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Eosina y	1,1g
Nigrosina	6,7g
Citrato de sódio	0,5g
Água destilada	100 mL

### Preparação da solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O)

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Citrato de sódio	0,464g
Água destilada	100 mL

### Preparação da solução de Folin-Ciocalteu 10%

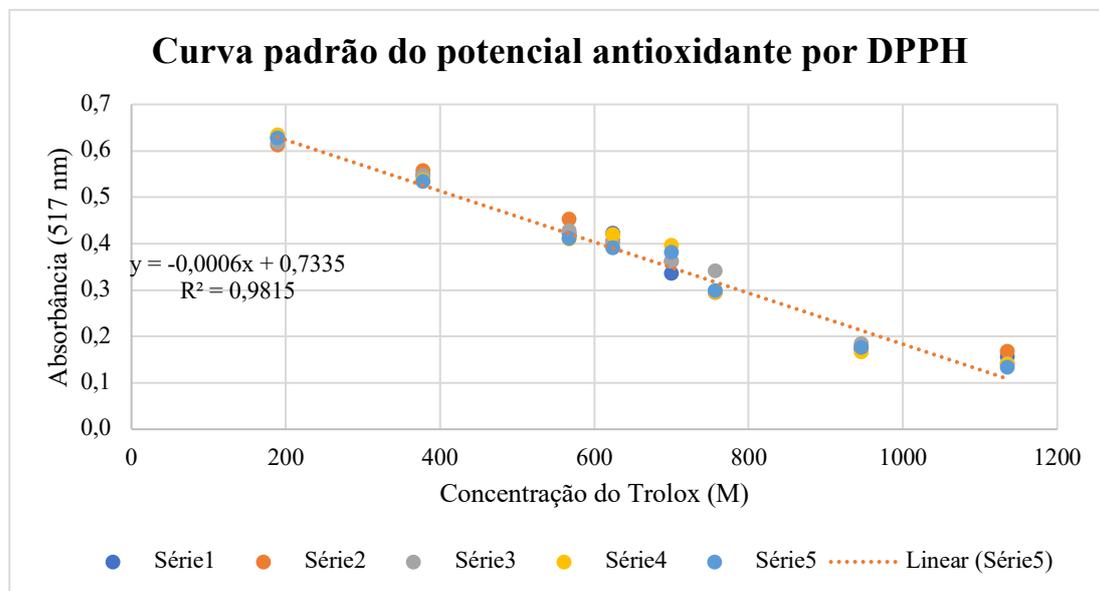
<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Reagente Folin-Ciocalteu	5 mL
Água destilada	50 mL

### Preparação da solução de carbonato de sódio 7,5%

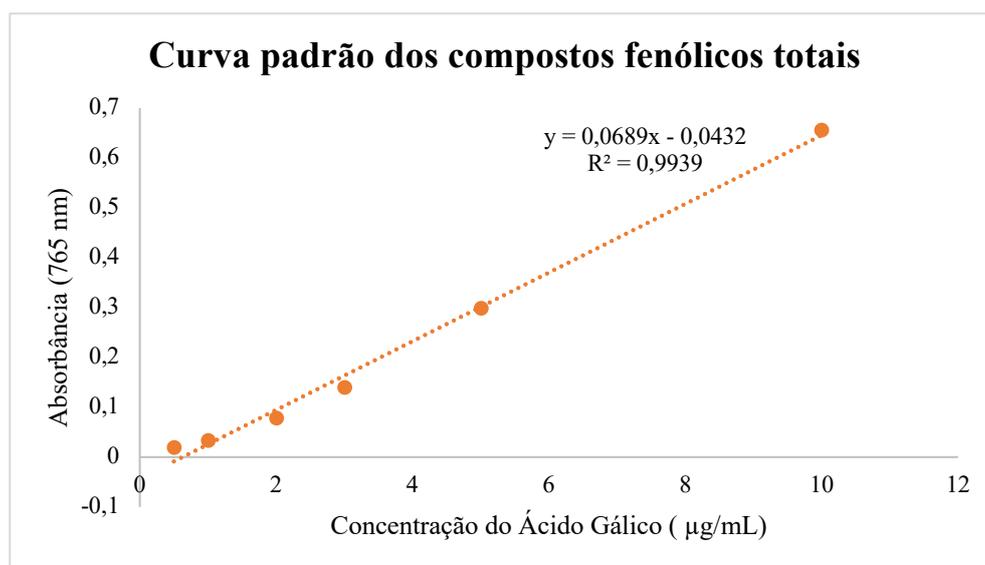
<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Carbonato de sódio	7,5 mg
Água destilada	100 mL

## Apêndice A – Curvas padrão

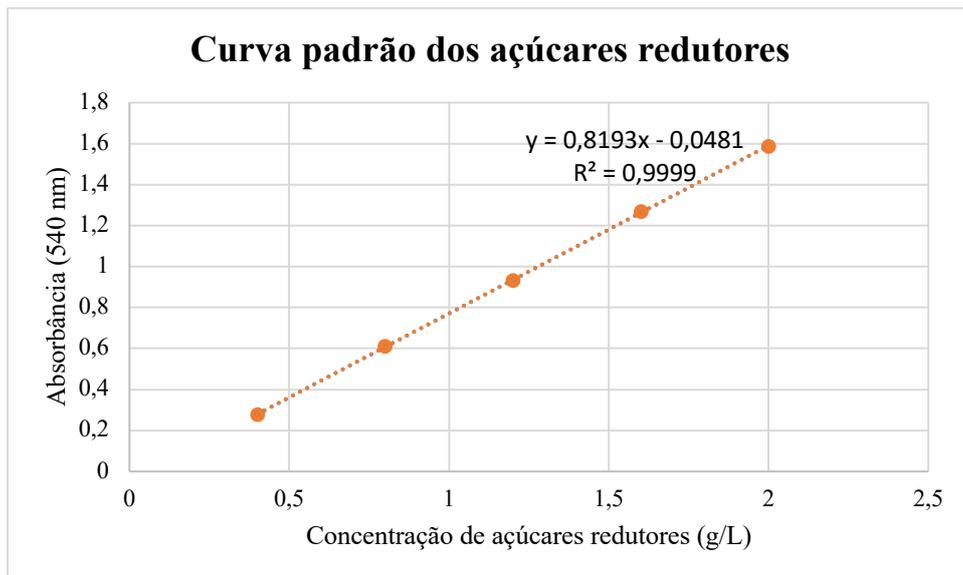
Curva padrão do potencial antioxidante (Trolox)



Curva padrão dos compostos fenólicos totais (ácido gálico)

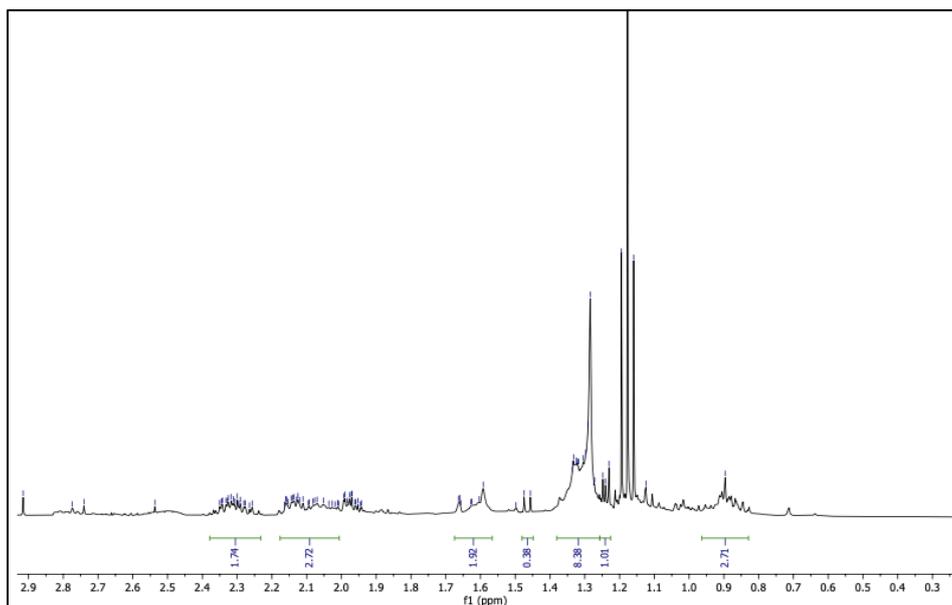


Curva padrão de açúcares redutores (glicose + frutose)

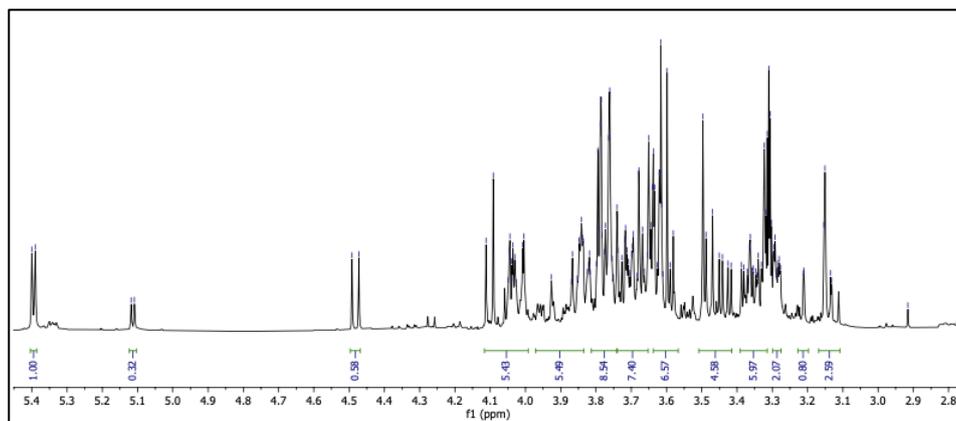


## Apêndice B – Espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ampliados

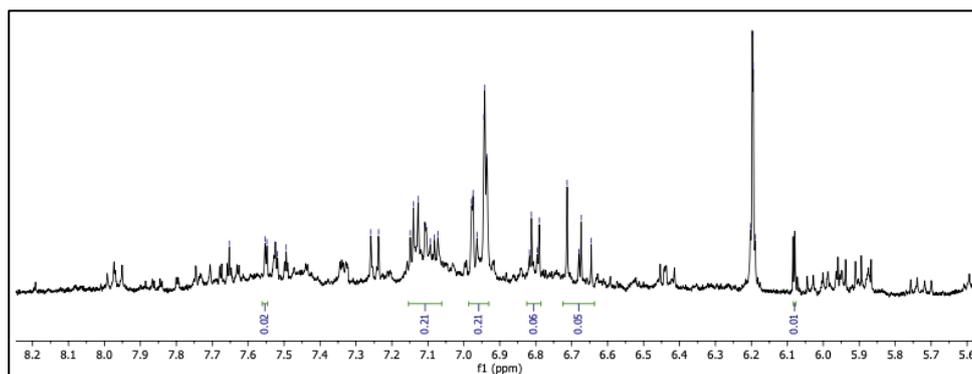
Espectro de  $^1\text{H}$  do intervalo de 1,9 e 2,4 ppm

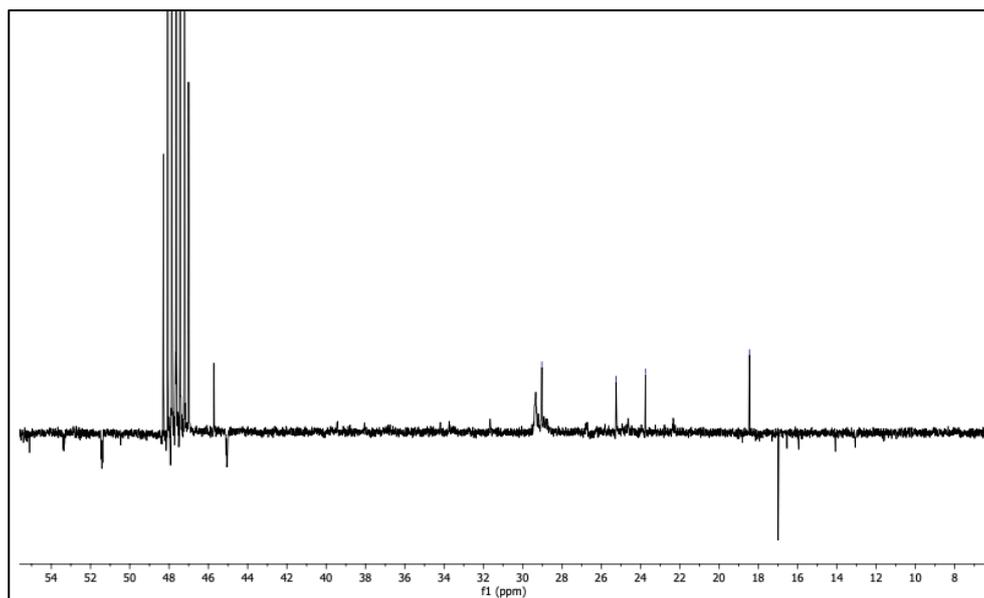
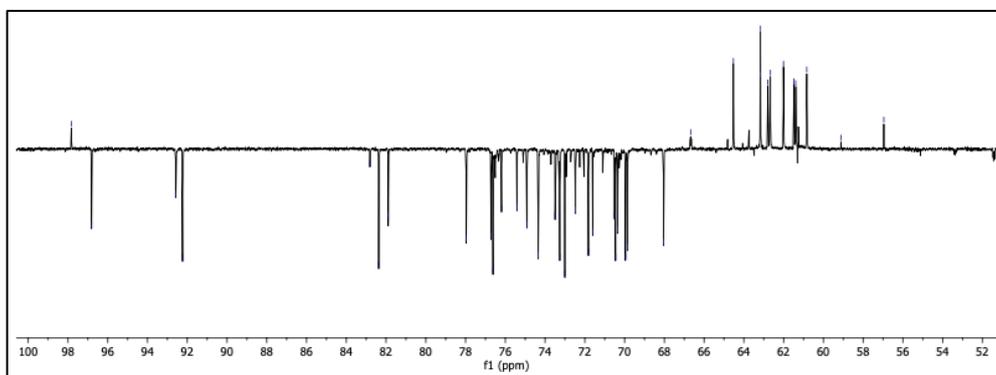


Espectro de  $^1\text{H}$  do intervalo de 3 e 4 ppm



Espectro de  $^1\text{H}$  do intervalo de 6 e 8 ppm



Espectro de  $^{13}\text{C}$  do intervalo de 10 a 52 ppmEspectro de  $^{13}\text{C}$  do intervalo de 52 a 100 ppmEspectro de  $^{13}\text{C}$  do intervalo de 90 a 130 ppm