



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – CAMPUS I  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
(PGBiotecM)**

**ARIANNE RAQUEL DE MENEZES MORAIS**

**POTENCIAL DO EXTRATO DA FOLHA DE *Morus nigra* L. COMO  
COMPONENTE DE DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE  
ESPERMATOZOIDES**

**JOÃO PESSOA  
2024**

**ARIANNE RAQUEL DE MENEZES MORAIS**

**POTENCIAL DO EXTRATO DA FOLHA DE *Morus nigra* L. COMO  
COMPONENTE DE DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE  
ESPERMATOZOIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PGBiotecM) da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.a Dr.a Sildivane Valcácia Silva

**JOÃO PESSOA  
2024**

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

M827p Morais, Arianne Raquel de Menezes.

Potencial do extrato da folha de *Morus nigra* L. como componente de diluidor para criopreservação de espermatozoides / Arianne Raquel de Menezes Morais. - João Pessoa, 2024.

55 f. : il.

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

1. Amora - Criopreservação de espermatozoide. 2. Flavonoides. 3. Membranas plasmáticas. I. Silva, Sildivane. II. Título.

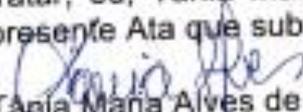
UFPB/BC

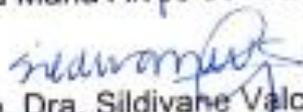
CDU 634.71:577(043)

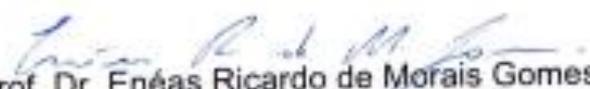


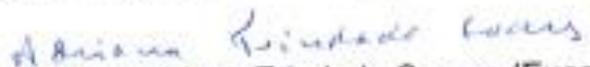
Ata da 45ª (quadragésima quinta) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia **ARIANNE RAQUEL DE MENEZES MORAIS** candidata ao Título de "Mestre" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Às nove horas (09h00) do dia 31 de agosto do ano de dois mil e vinte e quatro (31/08/2024), na sala 10 (dez) do Bloco Administrativo do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBIOTEC/UFPB), reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Ariane Raquel de Menezes Moraes** candidata ao Título de "MESTRE" em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores Sildivane Valcácia Silva (Orientadora) (Universidade Federal da Paraíba); Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Examinador interno) (Universidade Federal da Paraíba) e Adriana Trindade Soares (Examinador externo) (Centro Universitário de João Pessoa - UNIPÊ). Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca professora Sildivane Valcácia Silva, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Ariane Raquel de Menezes Moraes**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Potencial do extrato da folha de *Morus nigra* L. como componente de diluidor para criopreservação de espermatozoides". Após discorrer sobre o referido tema, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida, 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 **Ariane Raquel de Menezes Moraes** legalmente habilitada a receber o Título de "MESTRE" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde, 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. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Examinador interno)

  
Prof. Dra. Adriana Trindade Soares (Examinador externo)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu **DEUS** por ser misericordioso, cuidadoso e um PAI amoroso. A ELE toda honra e toda glória pois, em lugar algum eu teria chegado sem o SEU amor. ELE me deu forças e está comigo em todos os momentos da minha vida, dando-me sabedoria e realizando os desejos mais íntimos do meu coração.

Agradeço a minha amada Professora e amiga, **SILDIVANE VALCÁCIA SILVA**, pela paciência, pelo cuidado, direcionamentos, sinceridade e o amor que dela transborda. Ela me inspira como profissional e como ser humano! Também agradeço a querida **YARACY**, que me acolheu em um dia tão difícil e me deu forças para seguir meus sonhos!

Agradeço também a minha rede de apoio de amor terreno que é o meu querido, amado e guerreiro pai, **ANTONIO DE PADUA MORAIS** que me apoia em tudo sempre, sabendo exatamente o que eu preciso e me dando suporte, com todo amor e carinho para que eu consiga realizar meus sonhos. A minha amada mãe, **ADILMA MARIA DE MENEZES** toda a minha gratidão, pois, com ela eu aprendo a ter cada vez mais fé, a ser racional e a ter forças para alcançar meus objetivos, eles estão constantemente em oração pela minha vida e sempre estão por perto me dando suporte para que eu consiga realizar meus sonhos.

Ao meu amado esposo **RENAN FELIPE DE OLIVEIRA COQUEIJO**, toda minha gratidão, por ser minha calma diária, meu porto seguro, meu companheiro e meu grande amigo. Obrigada pela paciência, por andar ao meu lado, por ser leal, por torcer por mim e por me auxiliar em tudo que eu preciso.

Agradeço aos meus sogros **MARIA DILMA DE OLIVEIRA SILVA COQUEIJO** e **JOSÉ VALBERTO LUCENA COQUEIJO** por todo amor, carinho, cuidado e apoio que me dão diariamente, proporcionando assim, uma jornada mais tranquila e segura para a conclusão dos meus projetos.

Agradeço a querida Professora **MARTA CÉLIA**, por ter gentilmente me direcionado para iniciar a realização do extrato, dando-me suporte e direcionando-me na realização dos experimentos.

Agradeço ao querido Professor **IAN PORTO**, por toda paciência, carinho e auxílio no decorrer do mestrado e nos experimentos.

Agradeço ao **LABRA**, que me acolheu e me deu o suporte para que eu pudesse executar meus experimentos e aprender cada vez mais com todos.

Gratidão em especial aos meus amigos: **ALEX RIQUE** por pegar em minha mão e caminhar comigo nessa jornada acadêmica, a **CAMILLA FARIAS** que com todo carinho, objetividade e paciência me auxiliou no que eu precisava, a **MATHEUS SOARES** que me deu todo suporte, esteve comigo lado a lado acompanhando e auxiliando-me na minha pesquisa, a **ÁGATHA** que com muito compromisso, carinho e dedicação, auxiliou-me para que eu concluísse os meus experimentos.

Agradeço a **JERÔNIMO CORREIA**, que gentilmente se comprometeu a realizar as coletas seminais dos equinos e nos doar os ejaculados para que eu pudesse realizar os meus experimentos.

Aos meus queridos colegas e amigos de trabalho **PAULO MATHEUS, MARILAINE FÁBREGA, ALINE FERREIRA, THAÍS SILVA, CLAIRE BAZIN, DANIELLE ARAÚJO, JOÃO EDUARDO, SAMARA ROCHA, RENATA MARCULINO E SIMONE BRAGA**, que sempre me auxiliaram e me apoiaram para que eu pudesse realizar esse sonho.

Agradeço a Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade de cursar o Mestrado em Biotecnologia.

Agradeço a toda minha família e amigos pela paciência e incentivo.

*“Estou dizendo antes que aconteça, a fim  
de que, quando acontecer, vocês creiam  
que EU SOU.”*  
**João 13:19**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus nigra* L., em estágios de frutificação, como aditivo de um diluidor para a criopreservação de espermatozoides. As folhas foram coletadas das amoreiras presentes no Campus I (7° 05' S 34° 50' O) da Universidade Federal da Paraíba. O quantitativo de 297 g de folhas foram secas em estufa a 55 °C, por 48 h; em seguida, foram maceradas e imersas em um litro de etanol a 95% por 72 h, ao abrigo de luz, para que não houvesse alteração na composição de metabólitos fotossensíveis. Após esse processo, foi realizado a filtração e o filtrado submetido à secagem em rotaevaporador, a vácuo, com temperatura do banho maria a 55 °C, para a obtenção do extrato bruto. Na análise fitoquímica qualitativa, verificou-se a presença dos compostos esteroides e flavonoides, e a ausência dos compostos saponina, terpenoide, taninos e glicosídeos. No teste de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), confirmou a presença de esteroides e flavonoides no extrato. Na Quantificação de Açúcares Redutores (Método DNS), verificou-se a presença de 34% de açúcares redutores no extrato. Na Determinação do Potencial Antioxidante pelo Método DPPH que apresentou como resultado o IC50=0,5848 mg/mL que é favorável para um diluidor. Em seguida foi realizado o teste de diluição do extrato bruto em quatro possíveis solventes: TRIS, solução fisiológico (NaCl 0,09%) e água destilada. O solvente escolhido foi o TRIS por apresentar melhor diluição do extrato. Em seguida, o extrato bruto foi diluído 4 mg/mL em TRIS, formando a solução mãe, para posteriormente realizar a formação dos grupos experimentais: 1) Grupo Controle (GC), composto pelo diluidor Tris Gema (3,605 g de tris-hidroximetilaminometano; 2,024 g de Ácido cítrico; 1,488 g de Frutose; 100 mL de Água bidestilada; 20% de Gema de ovo; 5% Glicerol; pH 6,8); 2) Grupo Teste 1 (GT1), Tris Gema e 1% do extrato de amora; 3) Grupo Teste 2 (GT2), Tris Gema e 5% do extrato de amora; 4) Grupo Teste 3 (GT3), Tris Gema e 10% do extrato de amora. Os diluidores foram submetidos ao teste de Potencial hidrogeniônico (pH) com os seguintes resultados: A solução mãe teve pH 6,0 e os demais pH 7,0. Considerando os parâmetros acima, o extrato possui potencial para criopreservação espermática pela presença de flavonoides, que promovem a redução do estresse oxidativo, uma quantidade satisfatória de açúcares que pode proteger e ofertar energia para a célula, apresenta também um valor considerável como antioxidante. Como etapa final, foram realizados os testes em espermatozoides equinos. Os espermatozoides foram submetidos à refrigeração e congelação/descongelação nos grupos experimentais supracitados e posterior análises (motilidade e vigor espermático, integridade e funcionalidade das membranas plasmáticas e a atividade mitocondrial dos espermatozoides. O experimento foi realizado com ejaculado de oito indivíduos e as avaliações realizadas em duplicata e posteriormente foram geradas as médias. Foram apresentados resultados dentro dos padrões aceitáveis pós descongelação para as análises referentes a integridade e funcionalidade de membranas plasmáticas.

**Palavras-chave:** Amora. Criopreservação. Flavonoides.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate different concentrations of *Morus nigra L.* leaf extract, in fruiting stages, as an additive to a dilute for sperm cryopreservation. The leaves collected from mulberry trees presented on Campus I (7° 05' S 34° 50' W) of the Federal University of Paraíba. The amount of 297 g of leaves were dried in an oven at 55 °C for 48 h; then, they were macerated and immersed in one liter of 95% ethanol for 72 h, protected from light, so that there was no change in the composition of photosensitive metabolites. After this process, filtration was carried out and the filtrate was dried in a vacuum rotary evaporator, with a water bath temperature of 55 °C, to obtain the crude extract. In qualitative phytochemical analysis, the presence of steroid and flavonoid compounds is obtained, and the absence of saponin, terpenoid, tannin and glycoside compounds. No Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) test confirmed the presence of steroids and flavonoids in the extract. In the Quantification of Reducing Sugars (DNS Method), we obtained the presence of 34% of reducing sugars in the extract. In the Determination of Antioxidant Potential by the DPPH Method, the result was  $IC_{50}=0.5848$  mg/mL, which is favorable for a diluter. Next, the crude extract was diluted in four possible solvents: TRIS, physiological solution (NaCl 0.09%) and distilled water. The solvent chosen was TRIS to provide the best dilution of the extract. Then, the crude extract was diluted 4 mg/mL in TRIS, forming the mother solution, to later form the experimental groups: 1) Control Group (CG), composed of the Tris Gema diluter (3.605 g of tris-hydroxymethyl-aminomethane; 2,024 g of citric acid 1,488 g of fructose 100 mL of double-distilled water; 3) Test Group 2 (GT2), Tris Yolk and 5% blackberry extract; 4) Test Group 3 (GT3), Tris Yolk and 10% blackberry extract. The extenders were subjected to the Hydrogenion Potential (pH) test with the following results: The mother solution had pH 6.0 and the others pH 7.0. Considering the above parameters, the extract has potential for sperm cryopreservation due to the presence of flavonoids, which promote the reduction of oxidative stress, a satisfactory amount of sugars that can protect and provide energy for the cell, and also has considerable value as an antioxidant. As a final step, tests were carried out on equine sperm. The spermatozoa were subjected to refrigeration and freezing/thawing in the aforementioned experimental groups and subsequent analyzes (sperm motility and vigor, integrity and functionality of plasma membranes and sperm mitochondrial activity). The experiment was carried out with ejaculate from eight individuals and the evaluations carried out in duplicate and subsequently the averages were generated. Results were presented within acceptable post-thawing standards for analyzes regarding the integrity and functionality of plasma membranes.

**Keywords:** Blackberry. Cryopreservation. Flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espermatogênese .....	19
<b>Figura 2.</b> Diagrama da ultraestrutura do espermatozoide.....	20
<b>Figura 3.</b> Formação de gelo extracelular e acúmulo de solutos entre os espaços ...	23
<b>Figura 4.</b> Árvore e folhas da <i>Morus nigra L.</i> .....	26
<b>Figura 5.</b> Folhas de amoreira ( <i>Morus nigra L.</i> ) em estágio de frutificação.....	28
<b>Figura 6.</b> Folhas de amoreira ( <i>Morus nigra L.</i> ) .....	28
<b>Figura 7.</b> Folhas secas e imersas no etanol .....	29
<b>Figura 8.</b> Obtenção do extrato bruto .....	29
<b>Figura 9.</b> Caracterização fitoquímica do extrato da folha de <i>Morus nigra L.</i> .....	31
<b>Figura 10.</b> Resfriamento das amostras para preparação da realização da leitura no Spectrofotômetro da marca Kasvi .....	32
<b>Figura 11.</b> Mensuração do pH com fita reativa da “solução mãe”, do GC3 (GT3), GC, GC1 (GT1) e GC2 (GT2).....	35
<b>Figura 12.</b> Sêmen equino refrigerado, adquirido de forma comercial .....	36
<b>Figura 13.</b> Teste de solubilização do extrato da folha <i>Morus nigra L.</i> .....	40
<b>Figura 14.</b> Espectro FTIR do extrato bruto da folha de <i>Morus nigra L.</i> .....	42

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Caracterização através de análise química qualitativa do extrato da folha de <i>Morus nigra</i> L. ....	41
<b>Tabela 1.</b> Composição do diluidor PADRÃO Tris-gema.....	34
<b>Tabela 2.</b> Potencial antioxidante pelo método do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) para o extrato bruto de folha de amora .....	43
<b>Tabela 3.</b> Potencial hidrogeniônico (pH) da solução mãe e dos grupos experimentais acrescidos ou não do extrato de folha de <i>Morus nigra</i> L.....	44
<b>Tabela 4.</b> Valores da avaliação do sêmen de equinos recém-chegados ao laboratório, transportados sob refrigeração.....	45
<b>Tabela 5.</b> Valores das avaliações da atividade mitocondrial de classe I dos grupos refrigerados e dos grupos pós-descongelados com diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de <i>Morus Nigra</i> L.....	46

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Valores (média) das avaliações de motilidade (total e progressiva) do grupo refrigerado e do grupo pós-descongelado com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.* .....34
- Gráfico 2.** Valores (média) de vigor dos grupos refrigerados e dos grupos pós-descongelados com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.*.....43
- Gráfico 3.** Valores (média) das avaliações da funcionalidade das membranas plasmáticas dos grupos refrigerados e dos grupos pós-descongelados com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.* .....44
- Gráfico 4.** Valores (média) das avaliações da integridade da membrana plasmática do grupo refrigerado e do grupo pós-descongelado com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.* .....45

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitro salicílico
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>PMM</b>	Potencial de Membrana Mitocondrial
<b>iMPA</b>	Integridade das Membranas Plasmática e Acrossomal
<b>IROS</b>	Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular
<b>PBS</b>	Fosfato Salino Tamponado
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>LPO</b>	Lipoperoxidação
<b>SOD</b>	Superoxido dismutase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>GSH</b>	Glutathiona peroxidase
<b>GR</b>	Glutathiona reduzida

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>%</b>	Porcentagem
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>10<sup>6</sup></b>	Milhões
<b>sptz/mL</b>	Espermatozoides por mililitros
<b>h</b>	Hora
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mOsmol/ Kg</b>	Miliosmoles por quilograma
<b>g</b>	Gramas
<b>μL</b>	Microlitro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>mg</b>	Miligrama

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
3.1 Fisiologia e anatomia da célula espermática .....	19
3.2 Criopreservação Seminal .....	21
3.3 Diluidores Comumente Utilizados na Criopreservação Seminal e os antioxidantes .....	23
3.4 <i>Morus Nigra L.</i> .....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
4.1 Obtenção do extrato das folhas de <i>Morus Nigra L.</i> .....	28
4.2 Caracterização do extrato .....	30
O extrato hidroetanólico obtido foi utilizado nos testes descritos nos itens 4.2.1 a 4.5. ....	30
4.2.1 Testes de solubilização do extrato .....	30
4.2.2 <i>Screening</i> fitoquímico .....	30
4.2.3 Quantificação de Açúcares Redutores pelo Método DNS .....	32
4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	32
4.2.5 Determinação do Potencial Antioxidante pelo Método DPPH .....	33
4.3 Delineamento Experimental para Congelação Espermática .....	34
4.4 Potencial hidrogeniônico (pH) .....	34
4.5 Teste de refrigeração e congelação de espermatozoides equinos com a adição do extrato de amora .....	35
4.5.1 Obtenção de espermatozoides.....	35
4.5.2 Sêmen refrigerado recebido .....	35
4.5.3 Refrigeração e Congelação dos espermatozoides .....	36
4.5.4 Avaliação pós refrigeração e descongelação .....	37
4.6 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Obtenção do extrato das folhas de <i>Morus Nigra L.</i> .....	40
5.2 Testes de solubilização do extrato .....	40
5.3 <i>Screening</i> fitoquímico da folha de <i>Morus Nigra L.</i> .....	41
5.4 Quantificação de Açúcares Redutores pelo Método DNS .....	42
5.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	42

5.6 Determinação do Potencial Antioxidante pelo Método DPPH .....	43
5.7 Potencial hidrogeniônico (pH) .....	43
5.8 Análise Seminal.....	45
5.8.1 Avaliação do sêmen equino no recebimento .....	45
5.9 Avaliação do sêmen pós-refrigeração e pós-descongelação .....	45
5.9.1 Motilidade e vigor .....	45
5.9.2 Avaliação da Funcionalidade da Membrana Plasmática .....	46
5.9.3 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática (iMP) .....	47
5.9.3 Avaliações da atividade mitocondrial (DAB) .....	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51
REFERÊNCIAS .....	52

# 1 INTRODUÇÃO

A criopreservação celular é uma técnica usada para preservar células vivas, mantendo sua viabilidade e funções celulares mesmo em temperaturas criogênicas (geralmente de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nas temperaturas ultrabaixas, os processos químicos, biológicos e físicos que normalmente ocorrem em nível celular podem permanecer suspensos durante um longo período de tempo. Nos últimos anos, a criopreservação celular tornou-se uma importante tecnologia de apoio para várias aplicações, dentre elas, a reprodução assistida (Yang *et al.*, 2020).

Uma das opções padrão de preservação da fertilidade é a criopreservação seminal. Nela, os espermatozoides podem ser refrigerados, congelados e armazenados por um longo período, descongelados e usados para obter descendentes posteriormente através de técnicas de reprodução assistida existentes. A criopreservação seminal é uma técnica importante para a conservação de espécies ameaçadas, pois permite o armazenamento de material genético para programas de reprodução assistida futuros (Tran *et al.*, 2022).

Os espermatozoides são células pequenas com uma área de superfície relativamente grande e potencialmente menos suscetíveis a crioinjúrias em comparação com células maiores. No entanto, o espermatozoide não tem a capacidade de reverter os danos causados pela redução de temperatura no reaquecimento. Na prática, esse é o principal desafio da criopreservação. Para diminuir esses efeitos, ações como seleção do protocolo de refrigeração, congelação, descongelação e do uso dos crioprotetores ideais são fundamentais (Hughes *et al.*, 2023).

Para tal, a utilização de diluidores crioprotetores tem a finalidade de proteger os espermatozoides e fornecer a estas células o que necessitam para continuarem potencialmente férteis (Pimenta *et al.*, 2021). O leite desnatado e a gema de ovo são frequentemente utilizados como base de diluidores seminais, isso ocorre por sua eficácia em proteger os gametas masculinos durante o processo de refrigeração, congelação e descongelação, atuando principalmente na membrana plasmática dessas células (Queiros, 2018).

Além disso, com o intuito de manter a integridade, a viabilidade espermática e diminuir os efeitos deletérios, substâncias antioxidantes vêm sendo adicionadas aos

diluidores a fim de que sejam capazes de minimizar e/ou inibir a produção das espécies reativas de oxigênio, sem interferirem nos parâmetros funcionais dos espermatozoides (Borges, 2008).

A *Morus nigra* L., conhecida como amoreira-preta ou amora-preta, pertence à família Moraceae, é uma árvore decídua, apresentando porte de 4 a 12 m de altura, com copa ampla, de folhas ovaladas e serrilhadas (Haida *et al.*, 2014). Esta espécie é amplamente cultivada na Ásia e nas regiões sul e sudeste do Brasil, possui importância econômica devido a sua ampla utilização na medicina popular como anti-inflamatório, diurético, antitussígeno, anti-hemorragico, no tratamento do climatério e de doenças hepáticas e renais (Oliveira *et al.*, 2018).

Dentre as atividades biológicas são citadas as propriedades antioxidantes (Padilha *et al.*, 2010), que atuam retardando e/ou prevenindo a oxidação (Silva, 2012). Em experimento anterior, foi observado que o extrato hidroetanólico da folha de amora têm açúcares redutores, alcaloides e pH próximo a neutralidade. Os parâmetros citados são considerados ideais para a refrigeração de espermatozoides, sendo um promissor aditivo para a criopreservação seminal (Silva *et al.*, 2020). Baseado nos relatos anteriores, o extrato hidroetanólico da folha de amora pode ser testado como aditivo em diluidores seminais e observado os possíveis efeitos crioprotetores dos seus compostos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial da adição do extrato hidroetanólico da folha de amora (*Morus nigra* L.) ao diluidor de criopreservação espermática.

### 2.2 Objetivos Específicos

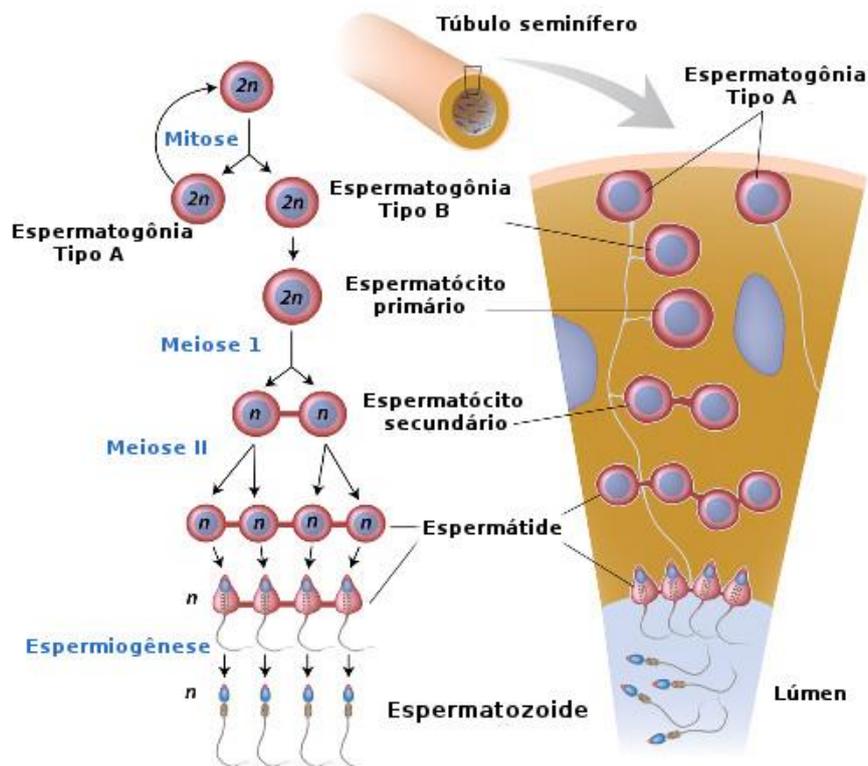
- a) Obter e caracterizar o extrato hidroetanólico de folhas de *Morus nigra* L.;
- b) Avaliar a motilidade de espermatozoides submetidos à refrigeração e pós-descongelamento, em diluidores acrescidos de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico de folhas de *Morus nigra* L.;
- c) Avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides submetidos à refrigeração e pós-descongelamento, em diluidores acrescidos de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico de folhas de *Morus nigra* L.;
- d) Avaliar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides submetidos à refrigeração e pós-descongelamento, em diluidores acrescidos de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico de folhas de *Morus nigra* L.;
- e) Avaliar a atividade mitocondrial de espermatozoides submetidos à refrigeração e pós-descongelamento, em diluidores acrescidos de diferentes concentrações de extrato hidroetanólico de folhas de *Morus nigra* L.;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Fisiologia e anatomia da célula espermática

A espermatogênese é o processo fisiológico de formação dos gametas masculinos em que as espermatídes que são células germinativas, haploides originadas das espermatogônias através do processo de divisão celular (Figura 1), que passam por etapas de diferenciação celular, desde sua organização estrutural, morfológica e bioquímica, dando origem assim aos espermatozoides que serão liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (Shi *et al.*, 2021).

Figura 1. Espermatogênese



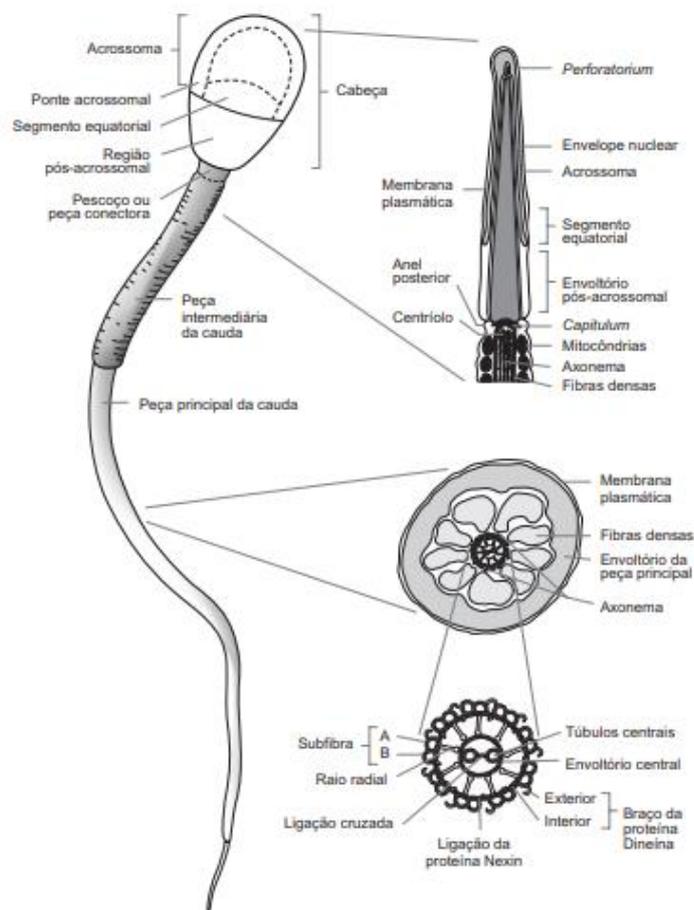
Fonte: [biologianet.com/anatomia-fisiologia-animal/espermatogenese.htm](http://biologianet.com/anatomia-fisiologia-animal/espermatogenese.htm)

As espermatídes são células arredondadas, de núcleo central e envolto de citoplasma, em que durante o processo de maturação, ocorre a reorganização das organelas presentes nesta célula, moldando-a para uma forma alongada. Há também o desenvolvimento do acrossoma, migração das mitocôndrias para a porção caudal do espermatozoide para geração de energia que concomitantemente auxiliará na

movimentação da célula com uma cauda, também desenvolvida, e que é de extrema importância no quesito reprodutivo ( Munguba *et al.*, 2023).

Os espermatozoides são células alongadas, recobertos pela membrana plasmática e são constituídos de uma cabeça que contém o núcleo e de uma cauda (flagelo) para motilidade celular (Figura 2). Eles desempenham um papel fundamental na fecundação devido ao DNA contido em seu núcleo (Garcia *et al.*, 2001).

**Figura 2.** Diagrama da ultraestrutura do espermatozoide



**Fonte:** Embrapa, 2016.

A cabeça do espermatozoide tem como sua principal característica ter o núcleo achatado de forma oval, contendo a cromatina altamente compactada, é a cromatina condensada que compreende um complexo de DNA com uma classe especial de proteínas conhecidas como protaminas. A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossomo, formado por uma dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo durante os últimos estágios de

formação do espermatozoide. A penetração da zona pelúcida e fusão com o oolema são eventos mediados por receptores, com áreas específicas da cabeça do espermatozoide se aderindo aos alvos no ovócito (Hafez, 1995).

A cauda do espermatozoide é composta de colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. A região da cauda entre o colo e o *annulus* é conhecida como peça intermediária. A parte central da peça intermediária que se estende por todo o comprimento da cauda, forma o axonema. O axonema é composto de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, em que a proteína dineína é responsável pela transformação da energia química em mecânica. Todo esse conjunto é recoberto externamente por numerosas mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática. A peça principal, que continua posteriormente ao *annulus* e se estende até a parte terminal da cauda, é composta centralmente do axonema e sua associação de fibras. A peça terminal, que é posterior à membrana fibrosa, contém somente o axonema recoberto pela membrana plasmática (Hafez, 1995).

O conhecimento e a análise da estrutura morfológica dos espermatozoides é de extrema importância, pois, permitem a eliminação de indivíduos com baixo potencial de fertilidade, evitando a entrada deles nos programas de congelação de sêmen e nos testes de progênie, pois sabe-se que os defeitos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e infertilidade masculina (Januskauskas, 2002).

### **3.2 Criopreservação Seminal**

A descoberta do glicerol como agente crioprotetor, na década de 1950, causou grande revolução na criopreservação, pois permitiu a congelação e o armazenamento do espermatozoide por longos períodos (Walters *et al.*, 2009). A função dos agentes crioprotetores é proporcionar nutrientes como fonte de energia; proteger contra o efeito prejudicial do resfriamento rápido; evitar variações de pH à medida que o ácido láctico é formado; manter a pressão osmótica e o equilíbrio eletrolítico; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do sêmen e proteger os espermatozoides durante a congelação (Hafez, 2004).

É através da criopreservação seminal que torna-se possível uma série de vantagens, dentre elas pode ser citada a redução de custos com aquisição e transporte de reprodutores, o armazenamento do material genético por tempo

indeterminado, a rápida difusão de material genético entre locais distantes e a diminuição da propagação de infecções sexualmente transmissíveis. (Leite *et al.*, 2011).

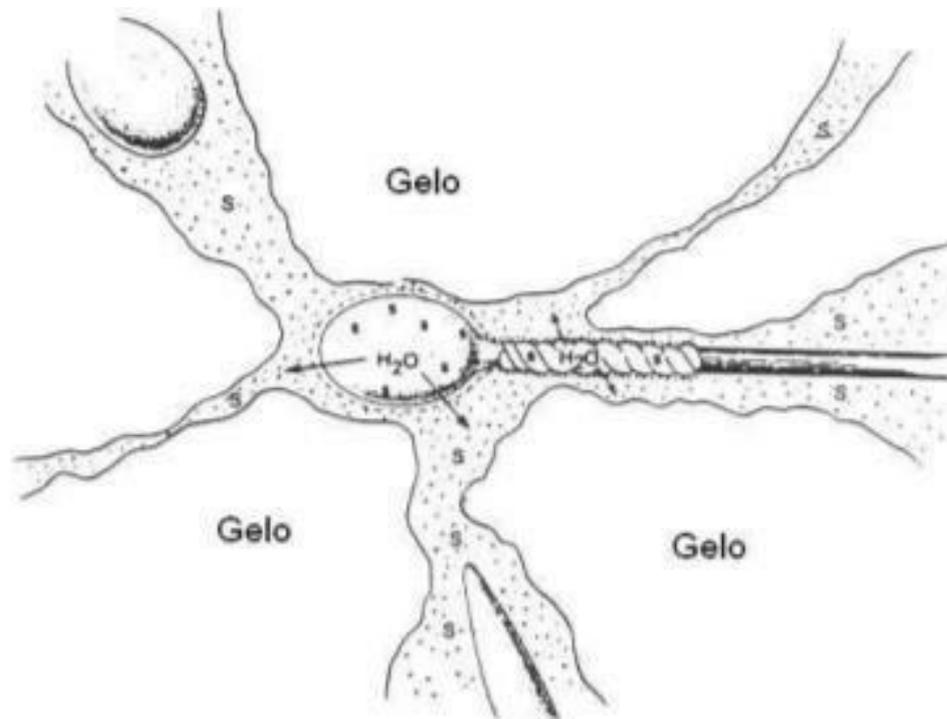
O processo de criopreservação do espermatozoide faz com que o mesmo fique em repouso, diminuindo seu gasto energético e a produção de catabólitos. Dessa forma, a estrutura espermática e a sua capacidade fecundante são preservadas e possibilitam a sua utilização posterior por tempo indeterminado (Castelo *et al.*, 2008).

Na maioria das espécies, os protocolos de congelação de sêmen compreendem as fases de refrigeração, pré-congelação e congelação. Na primeira, o sêmen diluído deve atingir a temperatura de 4 °C a 5 °C e a velocidade em que isso ocorre varia de acordo com o protocolo utilizado, ou seja, de 2 a 4 horas. Já, a etapa de pré-congelação é a mais crítica para a célula. Essa dura em torno de 20 minutos e o espermatozoide é submetido ao vapor de nitrogênio a uma temperatura de -5 a -60 °C e com isso há a formação de cristais de gelo intra e extracelulares. Por fim, na congelação, as palhetas são imersas em nitrogênio líquido e conservadas a -196 °C (Squires *et al.*, 1999).

A curva de congelação pode ser lenta ou rápida. Quando um diluidor com crioprotetor alcança temperatura ao redor de -5 °C, a água intra e extracelular permanece em estado de super-refrigeração. Entre -5 °C e -10 °C inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, mas a água intracelular permanece super-resfriada, resultando no aumento da concentração de solutos no fluido remanescente fora da célula, levando à desidratação da mesma (Medeiros, 2002).

Na curva rápida não haverá tempo para ocorrer a desidratação da célula e a concentração dos meios extra e intracelular serão semelhantes. No resfriamento lento haverá a desidratação do espermatozoide, evitando a formação de gelo intracelular. Porém, a alta concentração de solutos pode causar danos às células. A formação de cristais de gelo leva ao estresse osmótico, visto que quando uma solução é resfriada abaixo da temperatura de congelação, estes são formados, e os solutos se dissolvem no líquido remanescente (Figura 3), aumentando a força osmótica da solução (Watson, 2000).

**Figura 3.** Formação de gelo extracelular e acúmulo de solutos entre os espaços



Fonte: Squires *et al.*, 1999.

O estresse térmico causado pela criopreservação modifica o metabolismo energético da célula e, além disso, a diluição do sêmen pode reduzir a capacidade antioxidante do plasma seminal. Quando a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO's) supera a capacidade de neutralização do meio pelas substâncias antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, que por sua vez está relacionado com a diminuição da motilidade e aumento de lesões espermáticas (Alves *et al.*, 2018)

No entanto, as crioinjúrias podem ser reduzidas pela adição de antioxidantes ao meio diluidor durante a criopreservação, melhorando os parâmetros pós-descongelamento de motilidade e fertilização *in vitro* (Malo *et al.*, 2010).

### **3.3 Diluidores Comumente Utilizados na Criopreservação Seminal e os antioxidantes**

Sabendo da importância da criopreservação e a necessidade de conservar as características dos espermatozoides, tornou-se indispensável a assertividade na escolha do diluidor utilizado e em sua composição. A proteção eficaz dos gametas, determina o sucesso da criopreservação (Alcay *et al.*, 2020).

Os diluidores seminais além de proteger a membrana dos espermatozoides contra danos ocasionados por choques térmicos provocados durante a

criopreservação, possuem diversas outras funções, dentre elas, o efeito tampão, a estabilidade da pressão osmótica, o fornecimento de energia através dos nutrientes presentes em sua composição (Câmara *et al.*, 2018) o potencial antioxidante para reduzir os estresses oxidativos (Bustani *et al.*, 2021) e o favorecimento do fracionamento do ejaculado em doses de sêmen, além de tornar o meio propício para sua conservação *in vitro* (Sousa *et al.*, 2020).

É de fundamental importância a presença ou a adição de agentes crioprotetores aos diluidores seminais, para possibilitar a sobrevivência dos espermatozoides no processo de criopreservação. Os crioprotetores são classificados como penetrantes, quando exercem sua ação crioprotetora dentro da célula, ou não penetrantes, cuja atividade de crioproteção ocorre fora da célula ou na sua superfície (Bittencourt *et al.*, 2013).

O agente crioprotetor penetrante mais utilizado é o glicerol. Seu efeito protetor atribuído à sua propriedade coligativa ou de ligação à água, reduzindo a temperatura de congelação do meio intracelular. Ele entra rapidamente em muitas células e tem ação tanto intracelular como extracelular na proteção das estruturas celulares. A permeação real de glicerol nos espermatozoides, ou subsequente difusão dos espermatozoides após a inseminação, pode resultar em danos, principalmente quando a difusão é muito rápida. (Bittencourt *et al.*, 2013).

Os diluidores tradicionais para criopreservação seminal, incluem o leite desnatado e a gema de ovo, ou a combinação dos dois, mesmo sendo os mais comuns, possuem muitas limitações ao seu uso. Algumas outras bases, são utilizadas: o leite de vaca integral homogeneizado, a água de coco e a lecitina de soja (Leite *et al.*, 2011), também são acrescentados aos meios; antibióticos, solução tampão, açúcares e recentemente vem sendo investigados substâncias indutoras de funcionalidade da célula espermática e com o potencial de preservar o ejaculado (Purdy, 2006).

A ação protetora contra o choque térmico conferido pela gema do ovo ao espermatozoide se deve as lipoproteínas de baixa densidade. Os componentes do leite conferem proteção à célula espermática devido exercer efeitos antioxidantes. No entanto, grande parte dos pesquisadores tem preferência pela gema de ovo como um dos constituintes do diluidor não penetrante (Karolayne *et al.*, 2024).

O processo de criopreservação induz a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), o qual é responsável por danificar os espermatozoides de mamíferos, provocando alterações da motilidade, danos ao DNA e as membranas espermáticas

(Simon *et al.* 2013) e conseqüentemente redução na fertilização oocitária (Griveau; Le Lannou, 1997).

Uma forma de equilibrar a ação das ROS sobre as células espermáticas ocorre por meio da ação das defesas antioxidantes endógenas presente no plasma seminal, apesar de muitas vezes não serem suficientes, agem removendo as ROS, ou a partir delas formando produtos intermediários não tóxicos. Assim, existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante, como o combate a lipoperoxidação (LPO) e a apoptose espermática, desempenhada por enzimas como, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GSH) e Glutathione reduzida (GR), sendo esta última capaz de alterar a suscetibilidade espermática sob as condições de criopreservação. Desta maneira, se as ROS visam o conteúdo lipídico da membrana celular, conseqüentemente os danos estruturais da membrana, resultam em maior permeabilidade e fluidez da membrana espermática, mesmo no sêmen com maior viabilidade pós-descongelamento (Banday *et al.*, 2017).

No entanto, as crioinjúrias podem ser reduzidas pela adição de antioxidantes ao meio diluidor durante a criopreservação, melhorando os parâmetros pós-descongelamento de motilidade e fertilização *in vitro* (Branco *et al.*, 2020).

Os Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações retardam ou previnem a oxidação. Estas substâncias podem conferir proteção à membrana plasmática dos espermatozoides criopreservados e conseqüentemente mantêm a sua viabilidade e atividade metabólica (Beconi *et al.*, 1993). Pesquisas têm sido realizadas com adição de vitaminas em diferentes concentrações ao meio diluidor, buscando sua interação com radicais oxidantes. Sendo assim, estas interrompem a reação em cadeia da peroxidação lipídica da membrana, protegendo a célula do estresse oxidativo e contra danos nas membranas plasmática e acrossomal em diferentes espécies (Silva *et al.*, 2009).

### **3.4 *Morus Nigra L.***

A *Morus nigra L.* é originária do extremo oriente, é bastante utilizada na medicina tradicional chinesa. Foi trazida para o Brasil pelos imigrantes Japoneses, se adapta bem às condições de clima e solo. No vale do São Francisco, as folhas são utilizadas pela população na forma de chá, para o tratamento de colesterol, diabetes, problemas cardiovasculares, gota e obesidade (Oliveira, 2018). É uma espécie vegetal pertencente ao gênero *Morus*, família Moraceae, que possui pelo menos 24 espécies

e uma subespécie, com cerca de 100 variedades. Também conhecida como “amora-preta” em algumas regiões do Brasil e na região do Vale do São Francisco é popularmente denominada de “amora-miúra” (Almeida, 2011).

A árvore da *Morus nigra* L. tem médio porte e varia entre 4 a 5 metros de altura, possui cascas rugosas, escuras e copa grande. Suas folhas medem cerca de 16 por 8 cm, com margem serrilhada, base arredondada e ápice agudo, possuem cor esverdeadas e pouco ásperas, e são ovaladas (Figura 4). As flores da *Morus nigra* L. possuem tamanho pequeno com coloração branco-amarelada, seus frutos são de coloração escura e, quando maduras são de coloração negra com a polpa vermelho-escura e aparência comestível, possuem sabor agridoce característico e conhecido popularmente (Araújo, 2015).

**Figura 4.** Árvore e folhas da *Morus nigra* L.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Inúmeras atividades farmacológicas são relacionadas com a *Morus nigra* L. tem sido relacionada a, de acordo com estudos realizados com extratos de seu fruto, folhas e raízes, dentre as atividades biológicas são citadas propriedades antioxidantes, anticarcinogênica e antimutagênica com grande capacidade na modificação da expressão gênica (Padilha, 2010). Quando refere-se as características etnobotânicas, as folhas têm apresentado ter ação diurética, hipoglicemiante, atividades hipotensoras e têm sido usadas para o tratamento do climatério, assim o último justificado pela quantidade

de diferentes flavonoides, que possuem efeito fitoestrogênico e antioxidante (Pawlowska, 2008).

As ações dos antioxidantes naturais encontrados na *Morus nigra L.* ajudam na proteção do organismo contra radicais livres, diminuem a oxidação de lipídeos e conseqüentemente o progresso de algumas doenças crônicas, atuam inteiramente na neutralização da ação das espécies reativas de oxigênio (Araújo, 2015).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do extrato das folhas de *Morus Nigra L.*

Foram utilizadas folhas de amoreiras, coletadas em meados do mês de Julho do ano de 2023 no Campus I (7° 05' S 34° 50' O) da Universidade Federal da Paraíba para a obtenção do extrato de *Morus Nigra L.* As folhas foram coletadas em estágio de frutificação (Figura 5).

**Figura 5.** Folhas de amoreira (*Morus nigra L.*) em estágio de frutificação



Fonte: Arquivo pessoal.

As folhas colhidas foram limpas e pesadas (Figura 6). Em seguida, foram colocadas em bandejas e inseridas em uma estufa à 55 °C por 48 horas.

**Figura 6.** Folhas de amoreira (*Morus nigra L.*)



Fonte: Arquivo pessoal.

As folhas secas (Figura 7) foram maceradas e imersas em um litro de etanol a 95% (1:3) por 72 h, ao abrigo da luz, para que não houvesse alteração na composição de metabólitos fotossensíveis.

**Figura 7.** Folhas secas e imersas no etanol



Fonte: Arquivo pessoal.

A filtração foi realizada utilizando um filtro de papel e o filtrado foi submetido à secagem em rotaevaporador, a vácuo, com temperatura do banho maria a 55 °C (Figura 8), para a obtenção do extrato hidroetanólico. Esse processo foi realizado em parceria entre o LabOP do Centro de Tecnologia do Departamento de Química de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba, o Centro de Energias Renováveis e Alternativa da Universidade Federal da Paraíba e o Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

**Figura 8.** Obtenção do extrato bruto



Fonte: Arquivo pessoal.

## 4.2 Caracterização do extrato

O extrato hidroetanólico obtido foi utilizado nos testes descritos nos itens 4.2.1 a 4.5.

### 4.2.1 Testes de solubilização do extrato

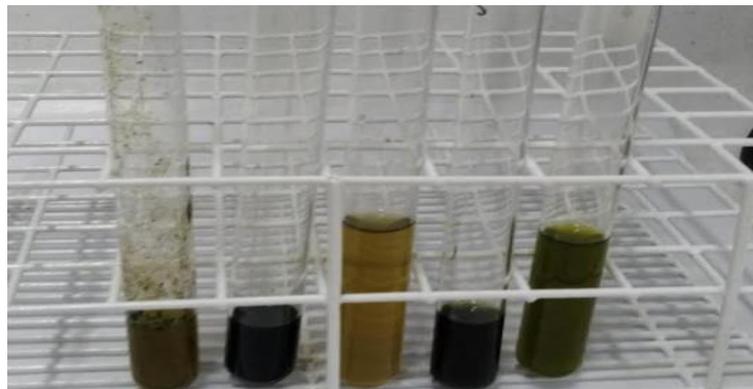
Para a observação da melhor solubilização para o extrato de folhas de *Morus Nigra L.* foram considerados apenas meios que não possuem interação negativa com a célula espermática. Para isso foram testadas como solventes: a água destilada, soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9%) e solução tampão TRIS (Tris-hidroximetilaminometano, ácido cítrico, frutose e água bidestilada), na mesma formulação geralmente utilizada para a produção de diluidores espermáticos.

Para a diluição foram utilizados tubos falcon de 15 mL, onde foi inserido 10 mg do extrato de folhas de *Morus Nigra L.* para cada 5 mL dos solventes testados, resultando em uma concentração final de 2 mg/mL. Em seguida foi promovido agitação com o auxílio de vórtex.

### 4.2.2 Screening fitoquímico

O *screening fitoquímico* foi realizado para se verificar de forma qualitativa a presença de seis grupos de compostos químicos no extrato hidroetanólico das folhas de *Morus Nigra L.* (Figura 9).

**Figura 9.** Caracterização fitoquímica do extrato da folha de *Morus Nigra L.*



Fonte: Arquivo pessoal.

#### Teste para Flavonoides

Para identificar a presença de flavonoides foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda [HCl (ácido clorídrico) concentrado e Mg (magnésio)]. Neste experimento, 5,0

mg do extrato foi adicionado em um tubo de ensaio com aproximadamente 0,5 cm de fita de magnésio e 2,0 mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação ocorreu pelo término da efervescência e o aparecimento de cor parda ou vermelha, indicando a presença ou não de flavonoides no extrato.

#### *Teste para glicosídeos*

Em um tubo de ensaio contendo 4,0 mL do extrato teste (solubilizado em solvente orgânico) foram secos até 2,0 mL. Adicionou-se 2,0 mL de hidróxido de amônio e foi submetido à agitação. Aparência de cor levemente vermelha indica a presença de glicosídeos.

#### *Teste para Saponinas*

Em um tubo de ensaio, 5,0 mg do extrato foi acrescentado com 2,0 mL de  $\text{CHCl}_3$  e 5,0 mL de água destilada. A mistura obtida foi filtrada para um tubo de ensaio e em seguida a solução foi agitada permanentemente por três minutos, observando-se a formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponina.

#### *Teste para Taninos*

Em um tubo de ensaio contendo 2,0 mL do extrato teste (solubilizado em solvente orgânico) foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$ , agitando fortemente, para observar qualquer variação de cor. Um precipitado de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e de tonalidade verde indica a presença de taninos condensados.

#### *Teste para Esteroides/Terpenoides*

O teste para esteroides/triterpenoides foi realizado pela reação de Liebermann-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado). Em um tubo de ensaio, 10 mg do extrato foi adicionado com 2,0 mL de clorofórmio. Em seguida, a solução clorofórmica foi filtrada em um funil com algodão coberto com alguns miligramas de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Na solução filtrada foi adicionado 1,0 mL de anidrido acético, agitando-se suavemente, e acrescentou-se cuidadosamente três gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, agitando suavemente e observando, se haveria desenvolvimento de

cores. Coloração azul evanescente seguida de verde, indica a presença de esteroides/triterpenoides.

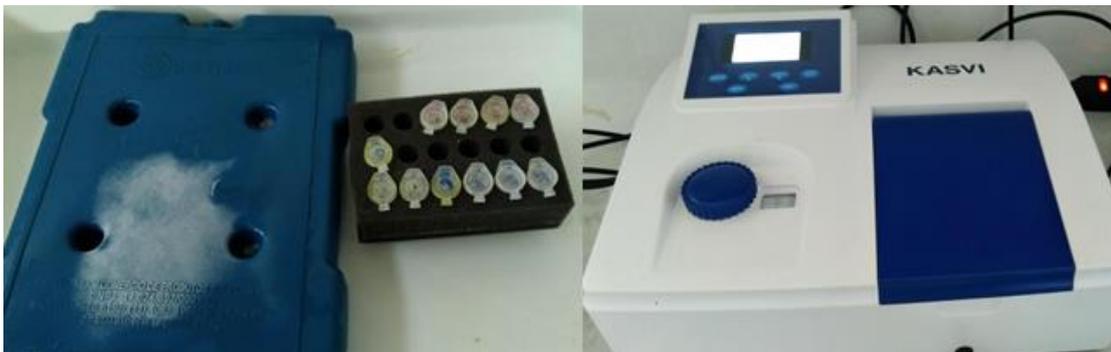
#### 4.2.3 Quantificação de Açúcares Redutores pelo Método DNS

A quantidade de açúcares redutores do extrato de folha de *Morus Nigra L.* foi determinada pelo método DNS. Nesse o ácido 3,5- dinitro salicílico é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico enquanto ocorre a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

A metodologia foi obtida através de adaptações de Bernfeld (1955). Foram realizadas diluições do extrato de *Morus Nigra L.* em metanol em uma concentração final de 2 mg/mL. Foram preparadas duas diluições iniciais, nas concentrações 1/3 e 1/10. Em seguida, 200  $\mu$ L das soluções (padrão e extrato) foram colocadas em eppendorfs e adicionado posteriormente o reagente DNS.

As amostras foram submetidas a aquecimento a 90 °C por 15 minutos e logo depois resfriadas em banho de gelo até se obter a temperatura ambiente (28 °C) (Figura 10). Após, foi adicionado 900  $\mu$ L de água destilada para a realização das leituras em espectrofotômetro na absorvância de 540 nm. Para se obter o controle da reação foi utilizado apenas o metanol como branco. Para a realização da curva padrão foram realizadas diferentes diluições de glicose.

**Figura 10.** Resfriamento das amostras para preparação da realização da leitura no Spectrofotômetro da marca Kasvi



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para se observar o perfil químico dos grupos funcionais presentes no extrato foi realizado uma espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

com Reflectância Total Atenuada (ATR). Uma alíquota do extrato foi colocada sobre o leitor do espectrômetro modelo Cary 630 (Agilent) para a análise. Os dados foram gerados com em número de onda de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  através do software MicroLab e analisados através do programa GraphPad Prism.

#### 4.2.5 Determinação do Potencial Antioxidante pelo Método DPPH

O ensaio do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) é um método comum para avaliar o potencial antioxidante de compostos químicos, extratos vegetais, alimentos ou produtos naturais. Neste ensaio, o DPPH, um radical livre estável e roxo, reage com antioxidantes, resultando em uma redução na intensidade de sua cor, que pode ser medida por espectrofotômetro. Quanto mais forte for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a redução na absorbância do DPPH (Oliveira, 2015). As amostras foram diluídas em várias concentrações para determinar a atividade antioxidante equivalente à do Trolox (TEAC). Para tal, foi feita a preparação de uma curva de calibração ou curva padrão, utilizando diferentes concentrações do controle positivo (Trolox, análogo da vitamina E).

No teste, utilizou-se placas de 96 poços com fundo plano, onde adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de amostra em cada poço, incluindo o controle positivo. Em seguida, em um ambiente com pouca luz, adicionamos 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de DPPH (Sigma-Aldrich) com concentração de 0,3 mM em cada poço. Para o controle negativo foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  da solução DPPH 0,3 mM e 100  $\mu\text{L}$  de metanol. A placa permaneceu no escuro, sem agitação, por 30 minutos.

Posteriormente, as absorbâncias foram medidas a 517 nm usando um leitor de microplacas multidetector Biotek modelo Synergy HT. A porcentagem de inibição (%I) (ou porcentagem de sequestro de radicais livres) foi então calculada com base nos valores obtidos a partir do equipamento para cada amostra usando a Equação 1.

**Equação 1.** Equação da porcentagem de sequestro de radicais livres

$$\%SLR \text{ ou } \%I = \left[ \frac{(\text{Absorbância do Controle} - \text{Absorbância da Amostra})}{\text{Absorbância do Controle}} \right] \times 100$$

A partir dos valores de porcentagem de inibição (%I) foi possível mensurar concentração necessária para atingir a  $\text{IC}_{50}$ , referente a concentração necessária para

reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH em solução. A  $IC_{50}$  foi calculada a partir da plotagem de gráfico, onde %I representa o eixo Y e as concentrações testadas o eixo X. Foi traçada uma regressão não linear a partir do gráfico e obtido o valor da  $IC_{50}$  com auxílio do software GraphPad Prism.

### 4.3 Delineamento Experimental para Congelação Espermática

Para a formação dos grupos de teste espermático foi inicialmente realizada a confecção, seguindo metodologia de Hafez e Hafez (2004), do diluidor Tris-gema (Tabela 1) comumente utilizado para a congelação espermática.

Em seguida o extrato foi pesado e utilizado para a formulação da solução-mãe, 4,0 mg para 1,0 mL de solução TRIS. Formulação: solução-mãe 4,0 mg/mL de extrato de folhas de *Morus Nigra L.*

**Tabela 1.** Composição do diluidor PADRÃO Tris-gema

<b>Composição</b>	<b>Concentração</b>
Tris	3,605 g
Ácido Cítrico	2,024 g
Frutose	1,488 g
Água destilada	100 MI
Gema de ovo	20%
Glicerol	5%
pH	6,8

Fonte: Hafez; Hafez, 2004 (adaptado).

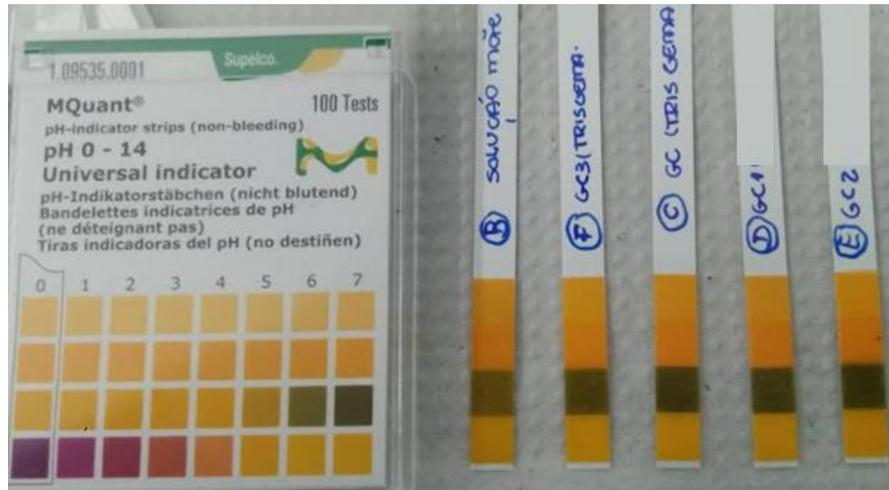
Posteriormente, para a formação dos grupos experimentais, diferentes concentrações do diluidor padrão tris-gema foi adicionada a solução-mãe preparada anteriormente, resultando nos seguintes grupos:

- **GC** (Grupo controle): Tris-gema Padrão.
- **GT1-1%**: Tris-gema – adição de 1% da solução-mãe.
- **GT2-5%**: Tris-gema – adição de 5% da solução-mãe.
- **GT3-10%**: Tris-gema – adição de 10% da solução-mãe.

### 4.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

Para a mensuração do potencial hidrogeniônico (pH) de todos os grupos experimentais, foram utilizadas fitas de pH (Merck) (Figura 11). Para a análise, 50  $\mu$ L de cada amostra foi colocada sobre as fitas e avaliadas de acordo com a coloração indicativa ofertada pelo fabricante na caixa.

**Figura 11.** Mensuração do pH com fita reativa da “solução mãe”, do GC3 (GT3), GC, GC1 (GT1) e GC2 (GT2)



Fonte: Arquivo pessoal

#### **4.5 Teste de refrigeração e congelamento de espermatozoides equinos com a adição do extrato de amora**

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/CBiotec/UFPB) em parceria com o médico veterinário Jerônimo Correia de Oliveira.

##### **4.5.1 Obtenção de espermatozoides**

Os espermatozoides equinos foram obtidos de forma comercial. Foram realizadas oito encomendas de sêmen equino, que foram colhidas na cidade de Campina Grande-PB e enviadas, sob prévia diluição em meio comercial à base de leite desnatado e refrigeração a 5 °C (Botuflex®, Botupharma) para o Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/CBiotec/UFPB), localizado na cidade de João Pessoa-PB. A comercialização de sêmen equino é uma prática zootécnica comum e não implica na experimentação com animais, sendo dispensável a aprovação da CEUA.

##### **4.5.2 Sêmen refrigerado recebido**

As amostras de sêmen refrigerado foram enviadas em diluição de 1:1 em meio de refrigeração da marca comercial Botusêmen® (Botupharma, Botucatu) (Figura 12) onde a fórmula é baseada em leite em pó desnatado, com adição de açúcares e

aminoácidos acondicionadas em caixas de transporte seminal com a temperatura de 5 °C como recomendado nas instruções do kit utilizado.

**Figura 12.** Sêmen equino refrigerado, adquirido de forma comercial



Fonte: Arquivo pessoal

Após o recebimento, as amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria à 37 °C e analisadas para os parâmetros macroscópicos (volume, cor, odor, aspecto) e microscópicos (motilidade, vigor, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e atividade mitocondrial), seguindo os parâmetros determinados pelo Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (turbilhonamento  $\geq 3$ ; motilidade  $\geq 70\%$ ; CBRA, 2013).

#### 4.5.3 Refrigeração e Congelação dos espermatozoides

Cada ejaculado foi dividido em quatro tubos falcon de 15 mL contendo 5 mL de ejaculado cada. Os tubos foram colocados em uma centrífuga (CE800, Centrilab) e centrifugados por 10 min a 2.220 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi retirado e acrescido ao *pellet* os diluidores (GC, GT1, GT2 e GT3), proporcionalmente para que cada grupo tivesse quatro palhetas de 250  $\mu$ L envasadas, com  $20 \times 10^6$  de espermatozoides viáveis cada. Para análise de refrigeração, o sêmen foi fracionado em tubos eppendorf, com o mesmo volume (250  $\mu$ L).

Os grupos foram submetidos à curva de refrigeração até atingir 5 °C (20 minutos), onde foram avaliados na condição de refrigeração. Após retirada para análise, os grupos acondicionados em palhetas foram submetidos à curva de congelação em vapor de nitrogênio por 20 minutos, e em seguida, foram imersos em nitrogênio líquido (-196 °C) seguindo acondicionadas em *racks* identificadas e

estocadas no botijão de nitrogênio líquido para posterior descongelamento e avaliação (Alvarenga *et al.*, 2016).

#### **4.5.4 Avaliação pós refrigeração e descongelamento**

Os tubos eppendorf e palhetas dos grupos avaliados pós-refrigeração e pós-descongelamento, respectivamente, foram submetidos a 37 °C em banho maria, por 60 segundos. As palhetas, após abertura, tinham o seu conteúdo colocado em tubos tipo eppendorf e submetidos às avaliações, que ocorreram no momento imediato pós aquecimento à 37 °C.

As amostras foram avaliadas microscopicamente (motilidade, vigor, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e atividade mitocondrial), seguindo os parâmetros determinados pelo Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

##### *Avaliação da motilidade e vigor*

A motilidade é expressa em porcentagem (0 a 100%) a proporção de espermatozoides móveis, através de avaliações subjetivas de uma gota de 10 µL de sêmen em uma lâmina com uma lamínula sobreposta onde foi realizada a leitura através de um microscópio binocular (CBRA, 2013).

##### *Avaliação da Funcionalidade da Membrana Plasmática*

O teste hiposmótico (HOST) visa avaliar a funcionalidade da membrana plasmática, condição importante para observar a viabilidade da célula espermática, pois está direcionalmente ligada a reação acrossômica, na capacitação espermática, no metabolismo espermático e na ligação do espermatozoide à zona pelúcida. Ele se baseia nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular, pois quando a célula é submetida a uma concentração diferente de água, ela buscará pelo equilíbrio osmótico através do transporte ativo que bombeará a maior concentração de água para a menor concentração, até que o equilíbrio seja estabelecido.

Caso a membrana plasmática esteja com a funcionalidade intacta, ela estimulará esse transporte ativo, causando a ingurgitação da célula, observada pela cauda dobrada (CBRA, 2013; Check; Check; Bollendorf, 2023).

Foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de cada grupo diluído em 100  $\mu\text{L}$  de solução hiposmótica (50 mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ ), composta por citrato de sódio e água destilada. A solução foi colocada em banho maria e incubada a 37 °C por 30 minutos. Em seguida foram colocados 50  $\mu\text{L}$  de solução formol-salina para parar a reação osmótica dos espermatozoides.

O HOST foi avaliado ao colocar 10  $\mu\text{L}$  da mistura entre lâmina e lamínula e observado através de microscopia óptica com aumento de 40x. Foram contadas 200 células, considerando funcionais aquelas com cauda enrolada, pois as membranas funcionais absorvem a água do meio, resultando na ingurgitação da cauda do espermatozoide e não-funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada (Fagundes *et al.*, 2010).

#### *Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática (iMP)*

Esta avaliação também é conhecido como o teste de mortos e vivos, o qual consiste na utilização de corantes, sendo a eosina o mais utilizado, tendo como opção a adição da nigrosina como corante de fundo.

A avaliação baseia-se no fato de que a membrana plasmática íntegra pode prevenir a entrada do corante no citoplasma celular. Desta maneira, a eosina penetra pela membrana lesionada dos espermatozoides e cora o interior do núcleo em rosa, permitindo identificar os espermatozoides mortos. É considerada uma técnica rápida, de fácil manipulação o que dispensa o uso de microscópio especial (Ker, 2010).

#### *Avaliações da atividade mitocondrial (DAB)*

O princípio desta técnica baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo c (incluindo CcO) presente nas mitocôndrias das células (Hrudka, 1987). A oxidação do DAB segue uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e depositado nos sítios de reação, gerando características visuais que podem ser observadas à microscopia óptica (Hrudka, 1987). Essa técnica permite a classificação dos espermatozoides em quatro classes (1, 2, 3 e 4), quanto a atividade das mitocôndrias presentes na peça intermediária de acordo com a quantidade de deposição do reagente polimerizado nesse sítio (Hrudka, 1987).

## **4.6 Análise estatística**

As análises dos dados foram realizadas no programa RStudio (versão 2024.4.2.764), utilizando o software R. Para verificar a normalidade dos dados, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi testada por meio do teste de Bartlett. Posteriormente, foi conduzida uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores (two-way ANOVA) para avaliar os efeitos das variáveis independentes, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias. Os resultados foram expressos em forma de gráficos pelo software GraphPad Prism 9.5.1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção do extrato das folhas de *Morus Nigra L.*

Foram colhidas 294 g de folhas frescas de *Morus nigra L.* e realizada a secagem e maceração, totalizando 100 g de pó de folhas. Após a extração, filtração e rotaevaporação, foram obtidos 3,0 gramas de extrato hidroetanólico, que foram utilizadas na experimentação.

### 5.2 Testes de solubilização do extrato

Para solubilização observou-se diferença entre os solventes utilizados (Figura 13). A solubilidade do extrato hidroetanólico foi melhor no solvente TRIS, isso se dá pois, as propriedades químicas e pH do TRIS são mais eficazes do que do soro fisiológico e da água destilada.

**Figura 13.** Teste de solubilização do extrato hidroetanólico da folha *Morus Nigra L.*



Fonte: Arquivo pessoal

A capacidade de tamponamento do TRIS contribuiu para um ambiente que possui. O pH da solução TRIS pode interagir de forma mais eficaz com os componentes e compostos bioativos presentes no extrato da folha de *Morus Nigra L.*. A água destilada tem um pH 5,5 e o soro fisiológico tem pH 6,0 sendo assim, não

possuem capacidade tamponante adequado como o TRIS possui (Brooke *et al.*, 2022).

### 5.3 Screening fitoquímico da folha de *Morus Nigra L.*

Os resultados obtidos no *screening fitoquímico* podem ser observados no quadro 1. Foram confirmadas a presença de flavonoides e esteroides além da ausência de terpenoides, glicosídeos, taninos e saponinas no extrato da folha de *Morus Nigra L.*

**Quadro 1.** Caracterização através de análise química qualitativa do extrato hidroetanólico da folha de *Morus nigra L.*

	Flavonoides	Glicosídeos	Saponina	Taninos	Esteroides	Terpenoides
Extrato de amora	+	-	-	-	+	-

Símbolo positivo (+) significa presente, símbolo negativo (-) significa ausente.

Os flavonoides, apresentam um importante potencial terapêutico e diferentes atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, atividade imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante (intimamente ligada a estrutura dos flavonoides e ao número de substituintes hidroxilas, que são os radicais fenólicos). Além disso, sua atividade antioxidante é combinada com a sua capacidade de modular funções de enzimas celulares essenciais do organismo (Moraes *et al.*, 2022). Desta forma, a presença de flavonoides no extrato hidroetanólico de amora pode contribuir para a diminuição do processo oxidativo que o espermatozoide sofre no processo de criopreservação, minimizando a lipoperoxidação. Por outro lado, a depender da quantidade de flavonoides no meio, estes podem ter potenciais efeitos citotóxicos (Bezerra *et al.*, 2016).

Os esteroides têm propriedades bioativas que podem colaborar para a manutenção, viabilidade e proteção celular. Os esteroides também podem influenciar positivamente na fluidez da membrana e permeabilidade celular (Bishop *et al.*, 2001),

sendo assim, a presença de esteroides pode promover proteção à membrana plasmática pós-criopreservação espermática.

#### 5.4 Quantificação de Açúcares Redutores pelo Método DNS

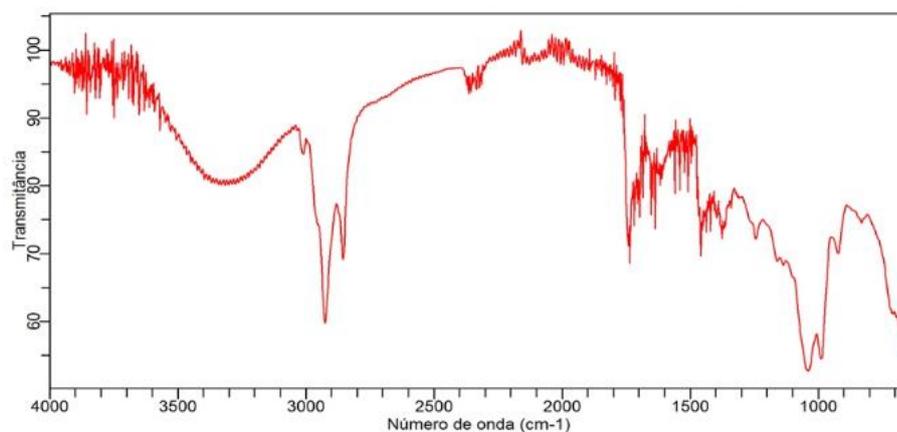
A concentração de moléculas totais no extrato etanólico de folha de *Morus Nigra L.* era 2 mg/mL, sendo utilizado 5 mL da solução para o teste. Destes, foi observado que 3,42 mg representaram a presença de açúcares redutores, correspondendo a aproximadamente 34% da composição da amostra.

A presença dos açúcares no extrato é de fundamental importância pois, o mesmo participa da via da glicólise, que fornecerá energia livre para a célula. No gameta masculino, essa energia será utilizada para a movimentação da cauda. Em complemento, nos diluidores seminais, o açúcar ainda fornece proteção extracelular, evitando assim danos à membrana plasmática do espermatozoide, causada pelo processo de criopreservação e das ROS (Borate *et al.*, 2022).

#### 5.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta recomendada para identificar grupos funcionais em compostos (Silverstein *et al.*, 2015). O FTIR mostrou a presença de grupos funcionais característicos dos metabólitos secundários. O espectro resultante do teste está exposto na Figura 14.

**Figura 14.** Espectro FTIR do extrato bruto da folha de *Morus Nigra L.*



Fonte: Arquivo pessoal.

Bandas de absorção entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  mostram a presença de carbonila (C=O), ácidos carboxílicos, de ésteres, de aldeído e de cetonas, característicos de flavonoides e esteroides. Esses resultados corroboram com os do *screening* fitoquímico previamente realizado, comprovando a presença dos metabólitos secundários flavonoides e esteroides no extrato testado.

## 5.6 Determinação do Potencial Antioxidante pelo Método DPPH

A partir da equação da curva padrão de Trolox foi possível calcular os valores de equivalência ao Trolox (TEAC) de diferentes concentrações do extrato (Tabela 2).

**Tabela 2.** Potencial antioxidante pelo método do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) para o extrato bruto de folha de amora

[ ] mg/mL	TEAC (uM)
1	0,0903
0,5	0,0378
0,1	0,0225
0,05	0,0160
0,025	0,0070

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados obtidos a partir do teste de potencial antioxidante pelo método DPPH, demonstram que o extrato hidroetanólico da folha de *Morus Nigra L.* tem um potencial antioxidante considerável, assim como mostraram (Balakrishnan *et al.*, 2014).

O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) é um análogo hidrofílico do  $\alpha$ -tocoferol, a forma mais ativa e mais comum de tocoferóis (vitamina E) no corpo humano. O  $\alpha$ -tocoferol é o principal antioxidante lipídico das biomembranas; previne o dano oxidativo da membrana através da inibição da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, eliminando radicais peroxil lipídicos (Giordano *et al.*, 2020).

É possível que os flavonoides presentes no extrato hidroetanólico, confirmados pelos testes anteriores tenham a função antioxidante observada no teste.

## 5.7 Potencial hidrogeniônico (pH)

Os dados da mensuração do potencial hidrogeniônico estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3.** Potencial hidrogeniônico (pH) da solução mãe e dos grupos experimentais acrescidos ou não do extrato de folha de *Morus nigra L.*

Grupos	pH
Solução mãe (4 mg do extrato/mL)	6,0
GC	7,0
GT1	7,0
GT2	7,0
GT3	7,0

Fonte: Arquivo pessoal.

Os eventos fisiológicos em células envolvendo hormônios, enzimas, transmissores e fatores de crescimento são dependentes do pH. Alterações no pH pode levar ao desvio da função celular e a inibição da mesma. As macromoléculas biológicas evoluíram para desempenhar sua função em ambiente celular específico, e sua dependência do pH para atividade e estabilidade reflete a importância do pH (Casey *et al.*, 2010).

As células espermáticas têm o propósito de fertilizar o oócito. Na ejaculação, milhões de espermatozoides são liberadas no trato reprodutivo feminino, porém, apenas alguns atingem seu alvo. Para concluir o propósito, os espermatozoides têm que encontrar um ambiente extracelular ideal como o pH e a temperatura adequada, entre outras variáveis físico-químicas que influenciam o comportamento e o metabolismo da célula reprodutora masculina. Entre esses fatores, o pH pode ter um grande efeito inicial na atividade e motilidade do espermatozoide antes e durante o processo de fertilização (Yoshida *et al.*, 2018).

Nos túbulos seminíferos de mamíferos e na rede testicular, os espermatozoides encontram pH de 7,2-7,4, que se torna 6,5 na cabeça do epidídimo e 6,7-6,8 na cauda do epidídimo. Durante a ejaculação, o pH do sêmen torna-se 7,2-7,4 e, posteriormente, após a ejaculação na vagina, o pH torna-se 4,5-7,5 e, no colo do útero, o pH aumenta para 6,5-7,5 e, finalmente, no útero e na tuba uterina (7-7,8) (CHAKRABORTY *et al.*, 2018). Neste caso, o pH do extrato é ácido, mas ao ser adicionado aos diluidores, apresenta o comportamento neutro, similar ao do ejaculado. Esta manutenção do pH é fundamental para a estabilidade do

espermatozoide, sem impedir o seu movimento, como ocorre no pH ácido, observado no ambiente do epidídimo, nem aumenta o batimento flagelar, como observado no pH alcalino, o mesmo do ambiente uterino.

## 5.8 Análise Seminal

### 5.8.1 Avaliação do sêmen equino no recebimento

Os dados obtidos na avaliação das amostras de sêmen equino, assim que chegaram ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/CBiotec/UFPB), estão apresentados na tabela 4. Após a prévia avaliação e de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo CBRA (2013), o sêmen foi considerado apto para submissão ao processo de criopreservação.

**Tabela 4.** Valores da avaliação do sêmen de equinos recém-chegados ao laboratório, transportados sob refrigeração

Amostras seminais	Motilidade (0-100%)	Vigor (0-5)	Funcionalidade Membrana plasmática (0-100%)	Integralidade Membrana plasmática (0-100%)	Atividade mitocondrial Classe I (0-100%)
1	69,00%	3,00	62,00%	79,00%	18,00%
2	63,00%	3,00	69,00%	76,00%	18,00%
3	65,00%	3,00	73,00%	82,00%	20,00%
4	58,00%	3,00	73,00%	75,00%	18,00%
5	70,00%	3,00	76,00%	79,00%	22,00%
6	75,00%	3,50	79,00%	80,00%	22,00%
7	63,00%	3,50	87,00%	75,00%	20,00%
8	70,00%	4,00	70,00%	71,00%	20,00%

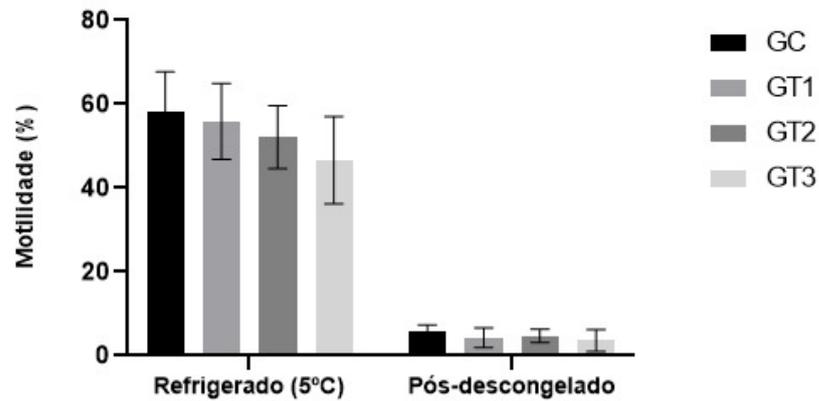
Fonte: Arquivo pessoal

## 5.9 Avaliação do sêmen pós-refrigeração e pós-descongelção

### 5.9.1 Motilidade e vigor

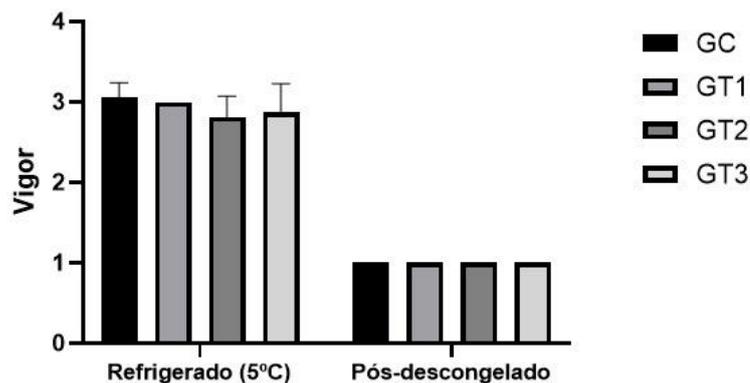
Após a curva de refrigeração e descongelção, os grupos apresentaram-se como observados nos gráficos 1 e 2.

**Gráfico 1.** Valores (média) das avaliações de motilidade (total e progressiva) do grupo refrigerado e do grupo pós-descongelado com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.*



Fonte: Arquivo pessoal

**Gráfico 2.** Valores (média) de vigor dos grupos refrigerados e dos grupos pós-descongelados com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.*



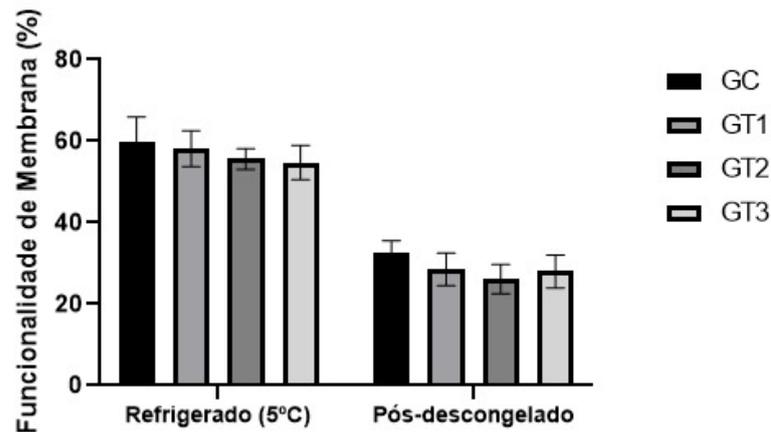
Fonte: Arquivo pessoal

Após a curva de refrigeração, não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos para os parâmetros de motilidade e vigor. Desta forma, o extrato não teve efeito estimulante da motilidade durante a curva de refrigeração. Estes mesmos resultados foram observados após a descongelação. É perceptível que houve uma redução drástica nos resultados de motilidade e vigor pós-descongelação, mas este fator não foi devido ao extrato de amora e sim à resposta do espermatozoide equino ao diluidor utilizado no processo, que foi o tris-gema, que não é o diluidor de eleição para a congelação de sêmen equino, devido à toxicidade do glicerol (Nascimento *et al.*, 2015).

### 5.9.2 Avaliação da Funcionalidade da Membrana Plasmática

Após a refrigeração e descongelação, os grupos apresentaram-se como observado no gráfico 3.

**Gráfico 3.** Valores (média) das avaliações da funcionalidade das membranas plasmáticas dos grupos refrigerados e dos grupos pós-descongelados com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.*



Fonte: Arquivo pessoal

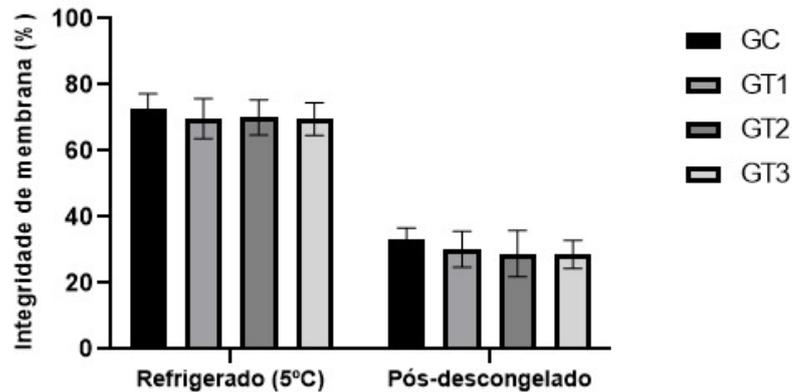
A funcionalidade da membrana plasmática das células reprodutoras masculina, é essencial para uma fertilização bem-sucedida. A integridade e o funcionamento normal da membrana da célula espermática são essenciais para o metabolismo dos espermatozoides, capacitação, reação acrossômica e capacidade de fertilizar o óvulo (Wysokińska *et al.*, 2021).

Após a curva de refrigeração, não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos para os parâmetros de funcionalidade das membranas plasmáticas. Da mesma forma, não foi observada diferença pós-descongelação. Entretanto, ao comparar os dados deste resultado com os dados de motilidade, é perceptível que a membrana plasmática apresentou função mesmo após a congelação, ou seja, dentro do estabelecido para sêmen descongelado, em torno de 30%. O extrato de amora, por outro lado, não teve efeito superior ao do grupo controle, evidenciando ausência de efeito sobre a função da membrana plasmática.

### 5.9.3 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática (iMP)

Após a refrigeração e descongelamento, os grupos apresentaram-se como observado no gráfico 4.

**Gráfico 4.** Valores (média) das avaliações da integridade da membrana plasmática do grupo refrigerado e do grupo pós-descongelado com o diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra* L..



Fonte: Arquivo pessoal

A integridade da membrana celular espermática é um dos parâmetros mais importantes avaliados para sinalizar a qualidade do espermatozoide e prever a fertilidade masculina. Fatores como o processo de diluição, as condições de armazenamento e a taxa de resfriamento podem afetar adversamente a estrutura da membrana da célula espermática. O resfriamento induz alterações na membrana da célula espermática, prejudicando seu estado funcional e molecular, tornando assim a escolha do diluidor crucial para manter as células reprodutoras masculinas com potencial fertilizante (Wysokińska *et al.*, 2021).

Após a curva de refrigeração, não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos para o parâmetro de integridade de membrana plasmática. Desta forma, a adição do extrato não teve efeito superior ao do grupo controle na integridade das membranas plasmáticas durante as curvas de refrigeração e congelamento. Embora o extrato tenha a presença de fitoesteroides que poderiam ter o efeito similar ao do colesterol, é possível que não tenha havido a interação entre o esteroide vegetal e a membrana espermática. Em trabalhos com sêmen equino, a interação do colesterol foi otimizada com a inclusão da ciclodextrina, que promove melhor incorporação do colesterol à membrana espermática (Hartwig; Papa; Dell'Aqua Junior, 2012). Desta forma, acredita-se que o extrato de amora ainda pode ser testado adicionado de um oligossacarídeo para melhor interação do fitoesterol com a membrana espermática.

### 5.9.3 Avaliações da atividade mitocondrial (DAB)

Após a refrigeração e descongelamento, a classe I da atividade mitocondrial dos grupos apresentaram-se como observado na tabela 5.

**Tabela 5.** Valores das avaliações da atividade mitocondrial de classe I dos grupos refrigerados e dos grupos pós-descongelados com diluidores com diferentes concentrações do extrato de folhas de *Morus Nigra L.*

ATIVIDADE MITOCONDRIAL CLASSE I	
<b>Amostras refrigeradas</b>	
<b>GC</b>	15,50%
<b>GT1</b>	14,63%
<b>GT2</b>	14,38%
<b>GT3</b>	10,88%
<b>Amostras pós-descongelamento</b>	
<b>GC</b>	7,87%
<b>GT1</b>	7,12%
<b>GT2</b>	7,12%
<b>GT3</b>	6,62%

Fonte: Arquivo pessoal

Defeitos na função mitocondrial do espermatozoide podem prejudicar gravemente o potencial de fertilidade dos machos (Vahedi *et al.*, 2024). As mitocôndrias são fundamentais para o metabolismo dos espermatozoides e estão implicadas na produção de energia, equilíbrio redox e regulação do cálcio, bem como vias apoptóticas, todas necessárias para a motilidade flagelar, capacitação, reação acrossômica e fusão gamética. Em vários casos, alterações em uma das funções mencionadas acima podem estar relacionadas a um declínio na qualidade do esperma e/ou infertilidade (Boguenet *et al.*, 2021).

A atividade mitocondrial dos espermatozoides é observada através do grau de coloração da peça intermediária, que indica diferentes níveis de atividade mitocondrial, sendo elas classificadas em classe I, II, III e IV. A classe I apresenta a peça intermediária totalmente corada, indicando uma alta atividade mitocondrial, o que sugere maior motilidade e potencial fertilizante. Acontece o declínio desse potencial no decorrer de cada classe, sendo a classe II indicando uma atividade mitocondrial

moderada, a classe III indicando uma baixa atividade mitocondrial e a classe IV indicando atividade mitocondrial ausente (BARBAGALLO et al., 2020).

Após a curva de refrigeração, foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos para os parâmetros de atividade mitocondrial de classe I. O GT3 apresentou redução das células com atividade mitocondrial de classe I. O GC, GT1 e GT2 não diferiram ( $P < 0,05$ ) entre si. Após a descongelação os grupos não diferiram ( $P < 0,05$ ) entre si em relação à classe I. Por este motivo, pode inferir-se que o GT3 das amostras refrigeradas, teve o resultado mais baixo com relação a atividade mitocondrial, pois, foi o grupo com a maior concentração de extrato etanólico em seu diluidor. Estudos com células cancerígenas com o extrato etanólico da folha de amora que observaram que os flavonoides mais presentes no extrato são a rutina e a isoquercetina, que é mais biodisponível em comparação à quercetina devido a sua característica hidrossolúvel, sendo estes relacionados com a ativação da atividade da caspase, contribuindo para a redução do potencial mitocondrial. É sabido que estes flavonoides podem ser benéficos para a atividade celular, todavia, é percebido que, ao aumentar a dose nas condições deste experimento, tenha sido acima do necessário para a viabilidade celular, tornando-se citotóxica ao estimular o ciclo de apoptose iniciada na mitocôndria (Turan *et al.*, 2017), objeto do estudo do DAB.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato bruto de folhas de *Morus nigra* L. apresenta flavonoides e esteroides, além de açúcares redutores em quantidade considerável, sendo um possível candidato para a proteção de células espermáticas durante a criopreservação. Entretanto, a concentração do extrato hidroetanólico de amora adicionada aos diluidores precisa ser melhor investigada, uma vez que ao ser testada em espermatozoides equinos interfere na atividade mitocondrial e compromete a viabilidade celular. O extrato pode ser testado em outras espécies para averiguação da sua possível capacidade crioprotetora.

## REFERÊNCIAS

- ALCAY, S. et al. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. **Andrologia**, v. 52, n. 4, p. e13555, 2020.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 96-100, 2011.
- ALVARENGA, M. A. et al. Advances in stallion semen cryopreservation. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 521-530, 2016.
- ALVES DOS REIS, W. V. et al. Uso da quercetina na criopreservação de sêmen de bovinos. [s.l.: s.n.], p. 2016-2018, 2018.
- ARAUJO, C. M. Análise da eficácia da polpa do fruto e do extrato das folhas de amoreira (*Morus nigra* L.) sobre a modulação de marcadores metabólicos e do estado redox celular em um modelo experimental de diabetes tipo 1. 2015. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.
- BALAKRISHNAN, B. et al. Avaliação da planta capim-limão ( *Cymbopogon citratus* ) extraída em diferentes solventes quanto à atividade antioxidante e antibacteriana contra patógenos humanos. *Revista Asiática do Pacífico de Doenças Tropicais*. V. 4, Suplemento 1, Páginas S134-S139, 2014.
- BANDAY, M. N. et al. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**, v. 74, p. 25-30, 2017.
- BARBAGALLO, F. et al. Evaluation of sperm mitochondrial function: A key organelle for sperm motility. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, 2020.
- BECONI, M. T. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BEZERRA, A. G. et al. Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 14, n. 1, p. 56–63, 2016.
- BISHOP, G. J. et al. Plants steroid hormones, brassinosteroids: Current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 2, p. 114-120, 2001.
- BITTENCOURT, R. F. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, p. 522-536, 2013.

BOGUENET, M. et al. Mitochondria: Their role in spermatozoa and in male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 27, n. 4, p. 697-719, 2021.

BORATE, G. M. et al. Cryopreservation of sperm: **A review. Cureus**, v. 14, n. 11, p. 1-6, 2022.

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. **Aleph**, 70 f, 2008.

BRANCO, Y. N. T. C. C. et al. O uso do eugenol na criopreservação do sêmen bovino. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 86336-86355, 2020.

BROOKE, D.; MOVAHED, N.; BOTHNER, B. **Experiments**. v. 2, n. 3, p. 336-342, 2022.

BUSTANI, G. S. et al. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. **Veterinary World**, v. 14, n. 5, p. 1220-1233, 2021.

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

CASEY J.R. et al. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2010 Jan;11(1):50-61. doi: 10.1038/nrm2820. Epub 2009 Dec 9. PMID: 19997129.

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

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

CHAKRABORTY, S., SAHA, S. Compreendendo os mecanismos de motilidade do esperma e a implicação das moléculas da superfície do esperma na promoção da motilidade. **Middle East Fertil Soc J** 27 , 4 (2022). <https://doi.org/10.1186/s43043-022-00094-7>

FAGUNDES, B. T. et al. Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 273-278, 2010.

GARCIA, S. M. L. et al. Espermatogênese. **Embriologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 42-61, 2001.

GIORDANO, M. E. et al. Concentration dependence of the antioxidant and prooxidant activity of trolox in hela cells. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1-12, 2020.

GRIVEAU, J.F. et al. Reactive oxygen species and human 511 spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**. 20, 61–9, 1997.

HAIDA, K. S. et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante de amoreira-preta (*Morus nigra* L.). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 12, n. 40, p. 21-28, 2014.

HAFEZ, E. S. E. et al. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 167-190.

HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed. Barueri - SP: Manole, 2004, cap. 7, p. 97-110.

HARTWIG, Felipe Pires; PAPA, Frederico Ozanam; DELL'AQUA JUNIOR, José Antonio. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 157-168, 2012.

HUGHES, G. et al. Sperm cryopreservation for impaired spermatogenesis. **Reproduction and Fertility**, v. 4, n. 1, 2023.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, Oxford, v.10, n.6, p.809-828, 1987.

JANUSKAUSKAS, A. et al. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Vet Zootech**, v. 39, p. 1-8, 2002.

MALO, C. et al. Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Cryobiology**, v. 61, p. 142–147, 2010.

KAROLAYNE, A. et al. Avaliação da viabilidade espermática do sêmen equino resfriado a 5 °C por 36 horas de garanhões alojados no município de Rolim de Moura – **Rondônia**. v., p. 1–10, 2024.

KER, P. G. Fertilidade do sêmen congelado de jumento da Raça Pêga em éguas inseminadas antes e após a detecção da ovulação. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Viçosa, 2010.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R. et al. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279–286, 2011.

MEDEIROS, C. M. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327–344, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00674-4).

MORAES, G. V. et al. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e238111436225, 2022.

MUNGUBA, D. S. et al. **A espermatogênese**. Letícia Moura Alcântara; Ricardo Toniolli, p. 101–121, 2023.

- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.
- OLIVEIRA, T. N. F. L. et al. *Morus nigra* L.: revisão sistematizada das propriedades botânicas, fitoquímicas e farmacológicas. **Archives of Health Investigation**, v. 7, n. 10, p. 450–454, 2018.
- PADILHA, M. M. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 621–626, 2010.
- PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Qualiquantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3377–3380, 2008.
- PIMENTA, M. dos S. et al. Efeito da adição do extrato de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e noni (*Morinda citrifolia*) ao sêmen bovino in natura e pós-descongelado. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3459–3169, 2021.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215–225, 2006.
- QUEIROS, A. F. D. E. Crioprotetores e remoção do plasma seminal. 2018.
- SHI, L. et al. The role of the epididymis in sperm maturation and male fertility. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 1123, 2021.
- SILVA, A. F.; SANTOS, G. G.; VALADARES, R. L.; ALMEIDA, J. L.; FREITAS, C. M.; CUNHA, D. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 11, n. 2, p. 121-128, 2009.
- SILVA, R. A. H. Estudo da ação do extrato bruto de *Morus nigra* L. sobre a atividade antimicrobiana e geração de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio: in vitro com ensaios químicos, enzimáticos e celulares. **Aleph**, 2012.
- SILVA, S. V.; BEATRIZ, A.; BARROS, C. Estudo sobre a obtenção e utilização do extrato da folha de *Morus nigra* L. como eficiente crioprotetor de espermatozoides epididimários bovinos. Universidade Federal da Paraíba. 2020.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8. ed. New York: Wiley, 2015.
- SIMON, L. et al.. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth 578 rates after IVF, **Reprod. Bio. Med. Online**. 26, 68–78, 2013.

SOUZA, M. S. et al. Criopreservação do sêmen de caprinos em diluidores alternativos e análise da viabilidade. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 56478–56485, 2020.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K. et al. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin**, n. 9, p. 80, 1999.

TRAN, K. T. D. et al. Male fertility preservation and restoration strategies for patients undergoing gonadotoxic therapies. **Biology of Reproduction**, v. 107, n. 2, p. 382–405, 2022.

TURAN, Ibrahim et al. Antiproliferative and apoptotic effect of Morus nigra extract on human prostate cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 25, n. 2, p. 241-248, 2017.

VAHEDI RAAD, M. et al. The impact of mitochondrial impairments on sperm function and male fertility: a systematic review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 1–17, 2024.

YOSHIDA, M. et al, (2018). Modulation of Sperm Motility and Function Prior to Fertilization. In: Kobayashi, K., Kitano, T., Iwao, Y., Kondo, M. (eds) *Reproductive and Developmental Strategies*. **Diversity and Commonality in Animals**. Springer, Tokyo. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-56609-0\\_21](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56609-0_21)

WALTERS, E. M. et al. The history of sperm cryopreservation. In: PEACY, A. A.; TOMLINSON, M. J. *Sperm banking: Theory and practice*. Cambridge: **Cambridge University**, 2009.

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

WYSOKIŃSKA, A.; SZABLICKA, D. Integrity of sperm cell membrane in the semen of crossbred and purebred boars during storage at 17 °C: Heterosis effects. **Animals**, v. 11, n. 12, 2021.

YANG, J. et al. Advanced biotechnology for cell cryopreservation. **Transactions of Tianjin University**, v. 26, n. 6, p. 409–423, 2020.