



**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAMILLA FLÁVIA AVELINO DE FARIAS**

**NANOFORMULAÇÕES COM EXTRATO DE *SPIRULINA PLATENSIS*  
PARA UTILIZAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE  
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS**

**JOÃO PESSOA  
2025**

**CAMILLA FLÁVIA AVELINO DE FARIAS**

**Nanoformulações com Extrato De *Spirulina Platensis* para  
Utilização na Criopreservação de Espermatozoides Caprinos**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia (RENORBIO) - Ponto  
focal Universidade Federal da Paraíba  
como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Doutor em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo de  
Morais Gomes

Corientadora: Prof. Dra. Sildivane  
Valcácia Silva

**JOÃO PESSOA  
2025**

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

F224n Farias, Camilla Flávia Avelino de.

Nanoformulações com extrato de Spirulina platensis para utilização na criopreservação de espermatozoides caprinos / Camilla Flávia Avelino de Farias. - João Pessoa, 2025.

114 f. : il.

Orientação: Enéas Ricardo de Moraes Gomes.

Coorientação: Sildivane Valcácia Silva.

Tese (Doutorado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Spirulina platensis (Sp) - extrato. 2. Microalga.  
3. ArthrosPIRA. 4. Cinética espermática. 5. Congelação espermática - caprinos. I. Gomes, Enéas Ricardo de Moraes. II. Silva, Sildivane Valcácia. III. Título.

UFPB/BC

CDU 582.232(043)



Coordenação Ponto Focal do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Biotecnologia  
Cidade Universitária, Campus I. CEP:58051-900. João Pessoa, PB.  
Telefone : (83) 3216.7173 E-mails: [secrenorbio@cbiotec.ufpb.br](mailto:secrenorbio@cbiotec.ufpb.br)  
Homepage: <http://www.renorbio.org>

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: CAMILLA FLÁVIA AVELINO FARIAS

TÍTULO DO PROJETO: "NANOFORMULAÇÕES COM EXTRATO DE *SPIRULINA PLATENSIS* PARA UTILIZAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Enéas Ricardo De Moraes Gomes

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Enéas Ricardo De Moraes Gomes, UFPB/RENORBIO (Orientador)	<u>APROVADO</u>	[Redacted]
Profª. Dra. Sildivane Valcácia Silva (DB/UFPB) (Co-orientadora)	<u>APROVADA</u>	[Redacted]
Prof Dr. Júlio Santos Rebouças (DQ/UFPB) (Membro interno)	<u>APROVADO</u>	[Redacted]
Profª. Dra. Elisangênia Afonso de Moura Kretzchmar (DB/UFPB) (Examinador externo ao programa)	<u>Aprovado</u>	[Redacted]
Prof. Dr. Kristerson Reinaldo De Luna Freire (DBCN/UFPB) (Examinador externo ao programa)	<u>Aprovado</u>	[Redacted]
Prof Dr. André Mariano Batista (DMV/UFRPE) (Examinador externo a instituição)	<u>Aprovado</u>	[Redacted]

LOCAL: Auditório do IPeFarM/CBiotec.

DATA DA APROVAÇÃO: 29 de agosto de 2025

HORÁRIO: 14:00 horas.

Ao meu filho, que entende que a  
mãe precisa estudar.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

Ao meu orientador, Enéas Ricardo de Moraes Gomes. Primeiramente por me acolher e confiar em mim, mas também por sempre estar quando eu precisei, sempre com muito bom humor e piadas do “tio do pavê”. O senhor conseguiu deixar o doutorado um pouco mais leve, me apoiando e aconselhando. Agradeço de verdade, de todo coração.

A minha corientadora, Sildivane Valcácia Silva. Graças a senhora eu consegui ter forças para finalizar minha graduação, meu mestrado e, agora, meu doutorado. Continua sendo uma pessoa gentil, atenciosa e prestativa. Agradeço por tudo o que fez por mim durante todos esses anos. Uma professora que se preocupa com seus alunos e que tem seus orientandos como filhos, recebendo com todo carinho e puxando a orelha quando necessário. Reconheço que meu crescimento pessoal e acadêmico foi graças, em grande parte, à senhora.

Agradeço a minha banca examinadora, Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar, Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire e Prof. Dr. André Mariano Batista pela disponibilidade, atenção e enriquecimento ao trabalho.

Aos meus pais, Antônio Carlos Alves de Farias e Márcia Suelly Avelino de Farias e a minha irmã, Marinna Karla Avelino de Farias, literalmente, por tudo. Até porque, se estou aqui hoje foi graças a vocês. Agradeço por ficarem do meu lado até quando muitos não ficariam. Agradeço pela força que me deram e que me fez continuar. Agradeço as noites que perderam comigo, me acompanhando enquanto a ansiedade tomava conta de mim, ficando ao meu lado até que eu melhorasse. Agradeço IMENSAMENTE por cuidarem do meu filho, pois ele é o meu tesouro, enquanto eu tinha que ir a faculdade ou viajar para fazer minha pesquisa, sempre com muito carinho e cuidado.

Ao meu filho, Pedro Henrique de Farias Oliveira, que sempre entendeu a situação, sempre se comportou e nunca me deu trabalho nos estudos. Você foi a pessoa que mais entendeu que eu precisava fazer isso e sempre entendia quando eu precisava estudar. Será meu eterno pequeno príncipe, meu maior amor e a pessoa que mais me ama e se preocupa comigo. Farei sempre tudo o

que eu puder por você.

Aos meus tios, Michaelson Alves de Farias e Maria de Jesus Alves de Farias que, novamente (e sempre), me auxiliaram no meu processo. Vocês, repetidamente, nos acolhem, sempre com muito carinho e atenção. Vocês viram luz onde eu não estava conseguindo enxergar, me dando esperança. Além de fazerem o mesmo por meus amigos.

As minhas avós, Edileuza Alves de Farias e Shirley Melo Avelino, que contribuíram com minha educação. Eu sei que vocês estariam felizes por essa conclusão.

A Ronaldo Marques que sempre esteve ao meu lado e me apoiou sempre, principalmente na questão acadêmica. Você tentava me animar, apesar disto ser bem difícil, quando eu começava a me preocupar. Agradeço que sempre esteja do meu lado, até quando nem eu acredito em mim.

A Klivio Rafael Nunes e Silva e Keila Nunes, por todo acolhimento, carinho e preocupação que tiveram comigo. Minha caminhada não teria sido a mesma sem vocês. Vocês se tornaram parte da minha família. Agradeço as risadas que me faziam esquecer os problemas. Agradeço a força que me deram. Agradeço por vocês terem aparecido na minha vida.

Aos meus amigos, em especial a Alex Souza Rique, Andrwey Augusto Galvão Viana, Vinícius Novo da Silva e a Jéssica Vieira Dantas por toooooodo carinho que me deram e por sofrerem junto comigo nessa caminhada de pós-graduação. Eu não sei o que teria feito sem vocês lá, comigo. Estarei sempre na torcida pelo crescimento de vocês, assim como vocês sempre estão por mim. Para sempre seremos os mestres surtados.

A Matheus e Agatha do LABRA, Fellipe do BiotecFarm, Fernando de Fisico-quimica/CTDR, Anauara do LMCA, Shara, João Victor, Gustavo, Alcineide, Eduarda e Gerson do LARA, Aline e Eliana da UFRPE e tantos outros que me ajudaram em todas as etapas do meu trabalho. Ninguém faz trabalho sozinho, mas agradeço a Deus por terem mandado vocês como luz para me auxiliar. Fico feliz em dizer que esse trabalho tem um pouco de cada um.

Ainda, para a realização deste trabalho, agradeço imensamente a:

Ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA) pelo companheirismo de sempre. Meu trabalho não teria andado sem vocês me

auxiliando.

Ao Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (BiotecFarm), em especial ao Professor Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior e aos meninos, Anny Cardoso e Fellipe Alves, pelo acolhimento e paciência (muita paciência) durante todo o processo. O conhecimento, a ajuda e a disponibilidade de vocês são coisas que eu jamais irei esquecer e jamais terei como agradecer o suficiente.

Ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/CCEN/UFPB) e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Francisca da Costa Sassi, Laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia Industrial (LANNI/Cbiotec/UFPB) e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisângela Afonso de Moura, Laboratório de Análise Físico-Química (CTDR/UFPB) e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Haíssa Roberta Cardarelli, Laboratório de Andrologia (ANDROLAB/UFRPE) e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra, Laboratório de Reprodução Animal (LARA/CCHSA/UFPB) e o Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente, Laboratório de Tecnologia Cervejeira (Cbiotec/UFPB) e ao Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire, Laboratório Multusuário de Caracterização e Análises (LMCA/UFPB), Laboratório de Petróleo (LaPet/UFPB) por colaborarem na realização do trabalho.

Eu agradeço o apoio que eu consegui ter de todos vocês.

Ninguém faz ciência sozinho!

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo apoio financeiro e a Universidade Federal da Paraíba e ao Centro de Biotecnologia pela estrutura concedida para realização dos experimentos.

*“Aqui jaz Dobby, um elfo livre”*

*Harry Potter e as Relíquias da Morte*

## RESUMO

Produtos oriundos da caprinocultura têm sido buscados de forma crescente nos últimos anos. Para acompanhar esse interesse, biotécnicas precisam ser utilizadas a fim de maximizar a produção e melhorar a qualidade dos produtos. A inseminação artificial (IA) é a biotécnica mais utilizada. Em conjunto com ela, a criopreservação é utilizada para facilitar e baratear o processo. Entretanto, a criopreservação resulta em crioinjúrias ao espermatozoide durante o processo. Com isso, diluidores são empregados para que sejam capazes de proteger a célula durante a queda da temperatura. Todavia, os diluidores atuais são de origem animal e podem promover contaminação e transmissão de doenças, além da difícil padronização. Diante disso, o objetivo do trabalho foi formular um diluidor com extrato de *Spirulina platensis* (*Sp*) na criopreservação de espermatozoides caprinos. Inicialmente foi realizada a extração dos compostos da *Spirulina platensis* (D9Z) utilizando solvente etanólico. Em seguida, realizou-se a caracterização destes a partir das análises de Teor de Fenólicos Totais (TPC), Atividade Antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS), a Determinação do teor de açúcares redutores, Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa (CG). Nessa primeira etapa, podemos observar a presença de compostos antioxidantes com os resultados de fenólicos (19,04 mg GAE. g<sup>-1</sup>) e antioxidantes (DPPH: 133,10 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>; FRAP: 143,59 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>; ABTS: 136,02 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>), além de açúcares redutores (DNS: 0,25 mg/mL). Com o auxílio do FTIR e do RMN pudemos notar a presença de possíveis compostos, como aminoácidos livres e peptídeos curtos, carboidratos e polióis, ácidos graxos e lipídeos insaturados, compostos fenólicos e pigmentos como ficocianina ou β-caroteno. O GC mostrou presença de ácido D-lático, ácido butanedioico, L-prolina, pentadecano, ácido palmitelaídico, ácido hexadecanóico, ácido linolênico, ácido 9-12-octadecadienoico, nonacosano, tetracosano e triacontano. A presença desses compostos mostra a complexidade do extrato obtido em nosso trabalho e seu potencial uso na adição ao diluidor para criopreservação, visto que há presença de componentes que auxiliem a célula durante a queda da temperatura, como a presença de antioxidantes para reduzir as espécies reativas de oxigênio (EROs), presença de açúcares que auxiliam no suporte energético, além de dar suporte no exterior da célula. Ainda, a presença de outros compostos, como ácidos graxos favorecem a proteção da membrana celular. Com isso, esse extrato tem potencial para ser utilizado no diluidor para dar suporte à célula durante as etapas do processo. Posteriormente, nanoemulsões foram elaboradas com fosfatidilcolina, extrato (ESp) e/ou triglicerídeos de cadeia média (MCT) ou polaxamer 188 (P188): MC (micela), NE1 (1% lecitina + 50 µg/mL ESp), NE2 (1% lecitina + 1% MCT), NE3 (1% lecitina + 50 µg/mL ESp + 1% MCT), NE4 (1% lecitina + 50 µg/mL ESp + 1% P188), NE5 (1% lecitina e 1% MCT + 1% P188) e NE6 (1% lecitina + 50 µg/mL ESp + 1% MCT + 1% P188). Estes grupos foram analisados pelo Zetasizer Nano ZS90 para tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta e utilizados na formulação dos diluidores. As

nanoemulsões obtiveram uma média entre 172,0 nm (NE6) e 211,8 nm (NE2), enquanto a MC chegou a 211,6 nm. A mesma apresentou um PDI de apresentou também um PDI de 0,3960, enquanto as nanoemulsões mostraram valores entre 0,1687 (NE3) e 0,4123 (NE4). Por fim, a micela apresentou um potencial zeta de -16,13 mV, já os demais ficaram entre -10,12 mV (NE6) e -17,89 mV (NE1). Esses valores, apesar de mostrar variação entre eles, não apresentaram desestabilização. Diante disso, avançamos para a próxima etapa, onde os grupos experimentais para formação dos diluidores foram então montados: GC (micela), G1 (50% GC + 50% NE1), G2 (50% GC + 50% NE2), G3 (50% GC + 50% NE3), G4 (50% GC + 50% NE4), G5 (50% GC + 50% NE5) e G6 (50% GC + 50% NE6). Inicialmente foram avaliados quanto a osmolaridade, viscosidade e atividade antimicrobiana. Em seguida, ejaculados de reprodutores caprinos foram homogeneizados e submetidos ao protocolo de congelação utilizando os sete grupos experimentais. Pós-descongelação, as amostras seminais foram avaliadas quanto à cinética (*Computer Assisted Sperm Analysis*), integridade da membrana plasmática e potencial da membrana mitocondrial. A osmolaridade dos grupos variou entre 1034 (G1) e 1137 (G6). Essa variação foi baixa, além de manter um parâmetro ideal para diluidores de células caprinas. Quanto a viscosidade, notou-se um aumento com a queda da temperatura nos grupos com a presença de polaxamer 188. Isso colabora com a característica deste surfactante, geleificando com a diminuição da temperatura. Ainda, esse efeito não foi observado da mesma forma nos grupos sem a presença do P188, mostrando que o aumento maior se dá devido a adição do polaxamer a formulação. Na avaliação antimicrobiana, observou-se que a maioria dos tratamentos promoveu, em algum grau, a inibição do crescimento microbiano, apresentando efeito bactericidas/fungicidas ou bacteriostáticos/fungistáticos. Deste modo, podemos construir um diluidor com o extrato de SP sem que haja a necessidade de acréscimo de antibiótico ao meio. Por fim, nas análises com as células espermáticas, não houve uma diferença estatística entre os grupos MC, G1, G2, G3 e G4 em todas as análises, mostrando que a substituição de metade de micela de fosfatidilcolina pelas nanoemulsões não gerou efeito negativo e manteve os parâmetros, quando comparado com o MC, podendo ser relacionado a composição do extrato de SP adicionado. Entretanto, observou-se diferença significativa ( $p<0,05$ ) no G5 e de forma numérica no G6 em comparação com os demais grupos na maioria das avaliações, mostrando o efeito negativo da sinergia entre a concentração do MCT, a presença do P188 e a concentração do glicerol. Baseado no exposto, os componentes presentes no extrato têm potencial de proteger as células com a diminuição da temperatura, contudo a concentração do extrato deve ser ajustada para um melhor desempenho.

**Palavras-chave:** Arthrospira, microalga, cinética, congelação.

## ABSTRACT

Goat farming products have been increasingly sought after in recent years. To keep up with this interest, biotechniques need to be used to maximize production and improve product quality. Artificial insemination (AI) is the most widely used biotechnique. In conjunction with it, cryopreservation is used to facilitate and reduce the cost of the process. However, cryopreservation results in cryoinjuries to the sperm during the process. Therefore, diluents are used to protect the cells during the temperature drop. However, current diluents are of animal origin and can promote contamination and disease transmission, in addition to being difficult to standardize. Given this, the objective of this study was to formulate a diluent with *Spirulina platensis* (Sp) extract for the cryopreservation of goat sperm. Initially, the compounds of *Spirulina platensis* (D9Z) were extracted using an ethanolic solvent. Next, these compounds were characterized based on analyses of Total Phenolic Content (TPC), Antioxidant Activity (DPPH, FRAP, and ABTS), Determination of Reducing Sugar Content, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), and Fatty Acid Profile by Gas Chromatography (GC). In this first stage, we can observe the presence of antioxidant compounds with phenolic results (19.04 mg GAE. g<sup>-1</sup>) and antioxidants (DPPH: 133.10 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>; FRAP: 143.59 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>; ABTS: 136.02 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>), in addition to reducing sugars (DNS: 0.25 mg/mL). With the aid of FTIR and NMR, we were able to note the presence of possible compounds, such as free amino acids and short peptides, carbohydrates and polyols, fatty acids and unsaturated lipids, phenolic compounds, and pigments such as phycocyanin or β-carotene. GC showed the presence of D-lactic acid, butanedioic acid, L-proline, pentadecane, palmitelaic acid, hexadecanoic acid, linolenic acid, 9-12-octadecadienoic acid, nonacosane, tetracosane, and triacontane. The presence of these compounds shows the complexity of the extract obtained in our work and its potential use in addition to the cryopreservation diluent, since there are components that help the cell during the temperature drop, such as antioxidants to reduce reactive oxygen species (ROS), sugars that help with energy support, and provide support outside the cell. Furthermore, the presence of other compounds, such as fatty acids, promotes cell membrane protection. As a result, this extract has the potential to be used in the diluent to support the cell during the stages of the process. Subsequently, nanoemulsions were prepared with phosphatidylcholine, extract (ESp), and/or medium-chain triglycerides (MCT) or poloxamer 188 (P188): MC (micelle), NE1 (1% lecithin + 50 µg/mL ESp), NE2 (1% lecithin + 1% MCT), NE3 (1% lecithin + 50 µg/mL ESp + 1% MCT), NE4 (1% lecithin + 50 µg/mL ESp + 1% P188), NE5 (1% lecithin and 1% MCT + 1% P188), and NE6 (1% lecithin + 50 µg/mL ESp + 1% MCT + 1% P188). These groups were analyzed by Zetasizer Nano ZS90 for size, polydispersity index (PDI), and zeta potential and used in the formulation of the diluents. The nanoemulsions obtained an average between 172.0 nm (NE6) and 211.8 nm (NE2), while the MC reached 211.6 nm. The latter also had a PDI of 0.3960, while the nanoemulsions showed values between 0.1687 (NE3) and 0.4123 (NE4). Finally, the micelle presented a zeta potential of -16.13 mV, while the others ranged between -10.12 mV (NE6) and -17.89 mV (NE1). Although these values varied among themselves, they did not show destabilization. Given this, we moved on to the next stage, where the experimental groups for the

formation of the diluents were then assembled: GC (micelle), G1 (50% GC + 50% NE1), G2 (50% GC + 50% NE2), G3 (50% GC + 50% NE3), G4 (50% GC + 50% NE4), G5 (50% GC + 50% NE5), and G6 (50% GC + 50% NE6). Initially, they were evaluated for osmolarity, viscosity, and antimicrobial activity. Next, ejaculates from breeding goats were homogenized and subjected to the freezing protocol using the seven experimental groups. After thawing, the semen samples were evaluated for kinetics (Computer Assisted Sperm Analysis), plasma membrane integrity, and mitochondrial membrane potential. The osmolarity of the groups ranged from 1034 (G1) to 1137 (G6). This variation was low, in addition to maintaining an ideal parameter for goat cell diluents. As for viscosity, an increase was noted with the drop in temperature in the groups with the presence of polaxamer 188. This contributes to the characteristic of this surfactant, which gels with decreasing temperature. Furthermore, this effect was not observed in the same way in the groups without the presence of P188, showing that the greater increase is due to the addition of polaxamer to the formulation. In the antimicrobial evaluation, it was observed that most treatments promoted, to some degree, the inhibition of microbial growth, presenting bactericidal/fungicidal or bacteriostatic/fungistatic effects. Thus, we can construct a diluent with SP extract without the need to add antibiotics to the medium. Finally, in the analyses with sperm cells, there was no statistical difference between the MC, G1, G2, G3, and G4 groups in all analyses, showing that replacing half of the phosphatidylcholine micelle with nanoemulsions did not generate a negative effect and maintained the parameters when compared to MC, which may be related to the composition of the added SP extract. However, a significant difference ( $p<0.05$ ) was observed in G5 and numerically in G6 compared to the other groups in most assessments, showing the negative effect of the synergy between the concentration of MCT, the presence of P188, and the concentration of glycerol. Based on the above, the components present in the extract have the potential to protect cells by lowering the temperature; however, the concentration of the extract must be adjusted for better performance.

**Keywords:** Arthrospira, microalgae, kinetics, freezing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Classificação das áreas da biotecnologia	22
<b>Figura 2</b>	Concentração do rebanho nacional de caprinos em 2022	26
<b>Figura 3</b>	Concentração de caprinos no estado da Paraíba em 2022	27
<b>Figura 4</b>	Danos causados pelo processo de criopreservação	31
<b>Figura 5</b>	<i>Spirulina ssp.</i> analisada por microscopia óptica	35
<b>Figura 6</b>	Aplicações da nanotecnologia na medicina	38
<b>Figura 7</b>	Versatilidade dos nanomateriais	38
<b>Figura 8</b>	Comparação em nanoscala	39

### **Capítulo I**

<b>Figura 1</b>	Etapas da produção de biomassa de <i>Spirulina platensis</i> (D9Z)	52
<b>Figura 2</b>	Extração por Soxlet (A) e evaporação dos extratores (B)	53
<b>Figura 3</b>	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato etanólico de <i>Spirulina platensis</i>	59
<b>Figura 4</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN do extrato etanólico bruto de <i>Spirulina platensis</i> (500 MHz, MeOD)	61
<b>Figura 5</b>	Cromatograma do extrato etanólico (derivatizado) de <i>Spirulina platensis</i> obtido na análise por CG-E	63

### **Capítulo II**

<b>Figura 1</b>	Coleta dos ejaculados	77
<b>Figura 2</b>	Campo de avaliação da motilidade espermática	81
<b>Figura 3</b>	Integridade da membrana plasmática	82
<b>Figura 4</b>	Potencial da membrana mitocondrial	83
<b>Figura 5</b>	Mapa de calor da atividade antimicrobiana de nanoformulações e extrato de <i>Spirulina platensis</i> frente a diferentes microrganismos patogênicos, com base em leituras de absorbância	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Principais características dos nanomateriais que favorecem a sua utilização em biomedicina	40
-----------------	--	----

### **Capítulo I**

<b>Tabela 1</b>	Fenólicos totais (TPC), capacidade antioxidante e quantidade de açúcares redutores de extrato etanólico de <i>Spirulina platensis</i> por Soxlet.	57
<b>Tabela 2</b>	Frequências de FTIR e os grupos funcionais atribuídos presentes no extrato metanólico bruto de <i>Spirulina platensis</i>	58
<b>Tabela 3</b>	Regiões do espectro de $^1\text{H}$ RMN com seus relativos deslocamentos químicos (ppm), tipo de próton e possível atribuição	62
<b>Tabela 5</b>	Compostos identificados pela biblioteca do CG-EM no extrato etanólico (derivatizado) de <i>Spirulina platensis</i> e comparados com a literatura	64

### **Capítulo II**

<b>Tabela 1</b>	Nanoformulações para os diluidores de criopreservação de sêmen caprino	76
<b>Tabela 2</b>	Valores (média $\pm$ desvio padrão) do tamanho de partícula hidrodinâmica, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes nanoformulações com lecitina, MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	84
<b>Tabela 3</b>	Valores da osmolaridade (mOsmol/kg) das nanoformulações com lecitina, MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	84
<b>Tabela 4</b>	Valores (média $\pm$ desvio padrão) da motilidade total e progressiva dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	87
<b>Tabela 5</b>	Valores (média $\pm$ desvio padrão) da velocidade curvilínea (VCL) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	88
<b>Tabela 6</b>	Valores (média $\pm$ desvio padrão) da velocidade linear progressiva (VSL) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	88

<b>Tabela 7</b>	Valores (média ± desvio padrão) da velocidade média da trajetória (VAP) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	89
<b>Tabela 8</b>	Valores (média ± desvio padrão) percentuais da linearidade (LIN) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	89
<b>Tabela 9</b>	Valores (média ± desvio padrão) percentuais da retilinearidade (STR) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	90
<b>Tabela 10</b>	Valores (média ± desvio padrão) percentuais do índice de oscilação (WOB) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	90
<b>Tabela 11</b>	Valores (média ± desvio padrão) da amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	91
<b>Tabela 12</b>	Valores (média ± desvio padrão) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	91
<b>Tabela 13</b>	Valores (média ± desvio padrão) do teste de integridade da membrana plasmática (iMP) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	92
<b>Tabela 14</b>	Valores (média ± desvio padrão) do teste de potencial da membrana mitocondrial (PMM) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	92

## **LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1</b>	Tamanho do rebanho de caprinos entre 2019-2023 no Brasil	26
<b>Gráfico 2</b>	Tamanho do rebanho de caprinos entre 2019-2023 na Paraíba	27
<b>Gráfico 3</b>	Quantidades de produção/rendimento de carne, leite e couro de caprino, no Mundo + (Total) (A) e no Brasil (B) de 2013 – 2023	28
<b>Gráfico 4</b>	Participação na produção de carne (A), leite (B) e couro (C) de caprino por região (2012 – 2022)	29

## **Capítulo II**

<b>Gráfico 1</b>	Valores da viscosidade (cP) das nanoformulações com lecitina, MCT e extrato de <i>Spirulina platensis</i>	85
------------------	---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	18
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	22
3.1 Biotecnologia e a Agropecuária .....	22
3.2 Caprinocultura .....	25
3.3 Criopreservação de espermatozoide caprino .....	30
3.4 Diluidores utilizados na criopreservação.....	31
3.5 Diluidores vegetais.....	33
3.6 Lecitina de soja .....	34
3.7 <i>Spirulina platensis</i> .....	35
3.8 Nanotecnologia .....	38
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	42
<b>Capítulo I .....</b>	49
<b>Composição química e atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>Spirulina platensis</i> e seu potencial para a utilização na criopreservação de espermatozoides .....</b>	50
<b>Introdução.....</b>	50
<b>Material e Métodos .....</b>	51
Produção do Diluidor .....	51
Obtenção da microalga <i>Spirulina platensis</i> .....	51
Produção do extrato da <i>Spirulina platensis</i> .....	53
Caracterização .....	53
Teor de Fenólicos Totais (TPC) .....	53
Atividade Antioxidante.....	54
<b>Atividade de Eliminação de Radicais Livres do DPPH .....</b>	54
<b>FRAP – Poder Antioxidante Redutor Férrico.....</b>	54
<b>Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre ABTS*</b> .....	54
Determinação do teor de açúcares redutores .....	55
Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	55
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	56

Perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa (CG) .....	56
<b>Resultados .....</b>	<b>57</b>
Compostos Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante dos Extratos .....	57
Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	57
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	59
Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....	60
<b>Discussão .....</b>	<b>64</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>68</b>
<b>Referências .....</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo II .....</b>	<b>73</b>
<b>Utilização de nanoformulações para a criopreservação de espermatozoides caprino .....</b>	<b>74</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>74</b>
<b>Material e métodos .....</b>	<b>76</b>
Formulação das nanoemulsões .....	76
Tamanho de partícula hidrodinâmica.....	76
Potencial Zeta .....	76
Delineamento Experimental para Congelação Espermática.....	77
Colheita seminal .....	77
Sêmen fresco.....	77
Diluidor de congelação do sêmen.....	78
Osmolaridade .....	78
Teste de viscosidade (Ensaio reológico) .....	79
Microbiológico .....	79
Microrganismos .....	79
Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de Spirulina platensis e nanoformulações para criopreservação .....	79
Confirmação da atividade bactericida ou bacteriostática .....	80
Avaliação pós-descongelação .....	81
Avaliação dos parâmetros cinéticos .....	81
Avaliação da integridade da membrana plasmática (iMP) .....	82
Avaliação do potencial da membrana mitocondrial (PMM) .....	82
Análise estatística.....	83
<b>Resultados .....</b>	<b>83</b>

Tamanho de partícula hidrodinâmica, PDI e potencial zeta das nanoemulsões teste .....	83
Osmolaridade das nanoformulações.....	84
Viscosidade das nanoformulações .....	84
Atividade microbiana do extrato e das nanoformulações .....	85
Motilidade Total e Progressiva .....	87
Cinética espermática .....	87
Integridade da Membrana Plasmática .....	91
Potencial da Membrana Mitocondrial .....	92
<b>Discussão .....</b>	<b>93</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>99</b>
<b>Referências .....</b>	<b>100</b>
<b>Considerações finais .....</b>	<b>104</b>
<b>Apêndice A – Meio Zarrouk.....</b>	<b>105</b>
<b>Apêndice B – Formulação do TRIS.....</b>	<b>106</b>
<b>Apêndice C – Curva padrão do Teor de Fenólicos Totais (TPC) .....</b>	<b>107</b>
<b>Apêndice D - Curva padrão da Atividade de Eliminação de Radicais Livres do DPPH .....</b>	<b>108</b>
<b>Apêndice E - Curva padrão do Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP) 109</b>	
<b>Apêndice F - Curva padrão da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre ABTS* .....</b>	<b>110</b>
<b>Apêndice G - Curva padrão da Determinação do teor de açúcares redutores pelo método DNS .....</b>	<b>111</b>
<b>Anexo A. Comprovante da CEUA .....</b>	<b>112</b>
<b>Anexo B. Patente BR 10 2025 002457 8.....</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma das áreas mais promissoras para o futuro. Pela sua interdisciplinaridade, ela vem sendo cada vez mais estudada e produtos oriundos dessa área vêm sendo cada vez mais difundidos e utilizados, principalmente focados na saúde humana (Arbix, 2007).

Por sua vez, a agropecuária vem utilizando de biotécnicas para baratear os custos e aumentar a biossegurança e a produção. Um dos focos biotecnológicos na agropecuária está relacionado à reprodução animal. As biotécnicas focadas na reprodução estão relacionadas à seleção de animais de alto valor genético e a redução dos níveis de endogamia no rebanho. Para isso, a inseminação é de suma importância, uma vez que não precisa que o macho esteja no mesmo local que a fêmea para que ocorra a fertilização (Kahi; Rewe, 2008; Steinwand; Ronald, 2020).

Em relação à produção animal, a caprinocultura está presente em países em desenvolvimento. No Brasil, a criação de caprinos está mais localizada na região nordeste do país. Devido às altas taxas de evapotranspiração, baixa umidade relativa do ar e altas temperaturas, muitos rebanhos acabaram migrando para regiões mais amenas do país, enquanto a espécie caprina conseguiu se manter nessa região por conseguirem se adaptar a esse clima e vegetação do local (Tarso; Lorena, 2022).

Com o passar dos anos, produtos oriundos da caprinocultura começaram a ganhar mais valor comercial. Apesar de serem produtos mais consumidos devido a cultura da região, estão sendo cada vez mais procurados. Com isso, o rebanho de caprinos tem aumentado gradativamente para suprir essa demanda. Aliada ao aumento da procura, também se aumentou a utilização da biotecnologia nessa espécie, principalmente na reprodução, para alavancar a produção e refinar a genética desses animais. A inseminação artificial (IA) favoreceu a melhoria desses animais para o produto final, seja ele carne, leite ou couro. Colaborando com a IA, a criopreservação vem sendo utilizada em diversas espécies, pois ela consegue prolongar a viabilidade celular por tempo indeterminado, além de reduzir o risco de doenças e facilitar a difusão do material

genético de forma mais rápida, prática e com menores custos (Leboeuf; Restall; Salamon, 2000; Mazinani; Rude, 2020).

Apesar dos pontos positivos da criopreservação, a diminuição da temperatura promove crioinjúrias que acometem as células tanto de forma estrutural, como molecular. Esses danos causados estão associados a formação de cristais de gelo, a toxicidade do meio e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Para se reduzir esses fatores, há a necessidade de utilização de diluidores próprios para cada espécie. Esses diluidores são comumente formados à base de gema de ovo ou leite desnatado. Os compostos presentes neles conseguem proteger a célula espermática nos ambientes intra e extracelular contra os efeitos deletérios da redução de temperatura (Purdy, 2006; Futino *et al.*, 2010).

Entretanto, esses diluidores, além de serem difíceis de padronizar e com risco de contaminação e transmissão de doenças, interagem negativamente com os componentes do plasma seminal da espécie caprina, como as fosfolipases. Eles transformam componentes presentes na gema do ovo e no leite desnatado em moléculas com efeito espermicida. Com isso, o sêmen desta espécie precisa ser previamente centrifugado para, posteriormente, ser diluído. Entretanto essa centrifugação também acarreta em dano mecânico às células, como também encarece mais o processo (Leboeuf; Restall; Salamon, 2000; Purdy, 2006).

Com isso, pesquisas com o objetivo de desenvolver diluidores que não sejam de origem animal vêm sendo realizadas a fim de conseguir uma criopreservação das células espermáticas igual ou melhor ao alcançado com os produtos já comercializados. Com isso, diluidores à base de lecitina e de água de coco foram desenvolvidos, mostrando bons resultados no processo, e estão atualmente sendo comercializados (Singh, Kumar, Atreja, 2014; Sánchez-Calabuig *et al.*, 2017). Além disso, outros estudos também estão sendo desenvolvidos para se ter mais opções desses diluidores, como é o caso de estudos com leite de soja (Singh, Kumar, Atreja, 2014) e *Aloe vera* (Farias *et al.*, 2019).

A lecitina é uma molécula anfifílica correspondente a uma mistura de fosfolipídios que são encontrados, principalmente, na composição de membranas celulares de plantas e animais. Na criopreservação, ela vem sendo

utilizada devido à sua capacidade protetora extracelular durante a criopreservação, mantendo a estrutura e a funcionalidade da membrana plasmática após a queda da temperatura. Apesar da eficácia de diluidores contendo lecitina, a busca por crioprotetores mais eficazes vêm sendo testados para garantir cada vez menos perdas (Klang; Valenta, 2011; Vidal *et al.*, 2013).

A *Spirulina sp.* é uma cianobactéria e ganhou este nome devido à sua natureza helicoidal ou espiral. Sua composição é formada por proteínas com aminoácidos essenciais, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), vitaminas, e minerais. Em decorrência de sua rica composição, ela é utilizada de diversas formas e é considerada segura para o consumo desde 2003 pela *General Recognized As Safe* (GRAS) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, afirmando a segurança de se utilizar esta microalga na dieta do homem (Jung *et al.*, 2019; ElFar *et al.*, 2022). Alguns estudos já demonstraram a eficácia de seu extrato ou uma molécula extraída da *Spirulina* adicionada ao meio diluidor em diferentes espécies, como equino (Zeitoun *et al.*, 2022), ovino (Rahim *et al.*, 2024) e bubalino (Badr *et al.*, 2021).

Devido à necessidade de diluidores com melhor eficácia para a congelabilidade do espermatozoide caprino, sem a adição de componente de origem animal, e a rica composição da *Spirulina platensis*, a perspectiva do trabalho é produzir, utilizando a nanotecnologia, um diluidor associando lecitina de soja e extrato de *Spirulina platensis* para substituir os diluidores comumente utilizados na criopreservação de espermatozoides caprinos, mantendo os parâmetros de viabilidade das células espermáticas após a congelação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um diluidor com nanoformulações contendo extrato de microalga *Spirulina platensis* para criopreservação de espermatozoides de caprino.

### 2.2 Objetivos Específicos

Elaborar o extrato da microalga *Spirulina platensis* com um solvente polar (etanol) e caracterizar os componentes existentes na extração;

Preparar nanoformulações para a produção dos diluidores e avaliar quanto ao tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão.

Submeter os espermatozoides caprinos à criopreservação com o diluidor controle (micela de lecitina) e os diluidores com as nanoformulações para posterior descongelação e submissão às análises.

Avaliar a cinética de espermatozoides caprinos pós-descongelação submetidos à criopreservação com diferentes nanoformulações;

Analizar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos pós-descongelação submetidos à criopreservação com diferentes nanoformulações;

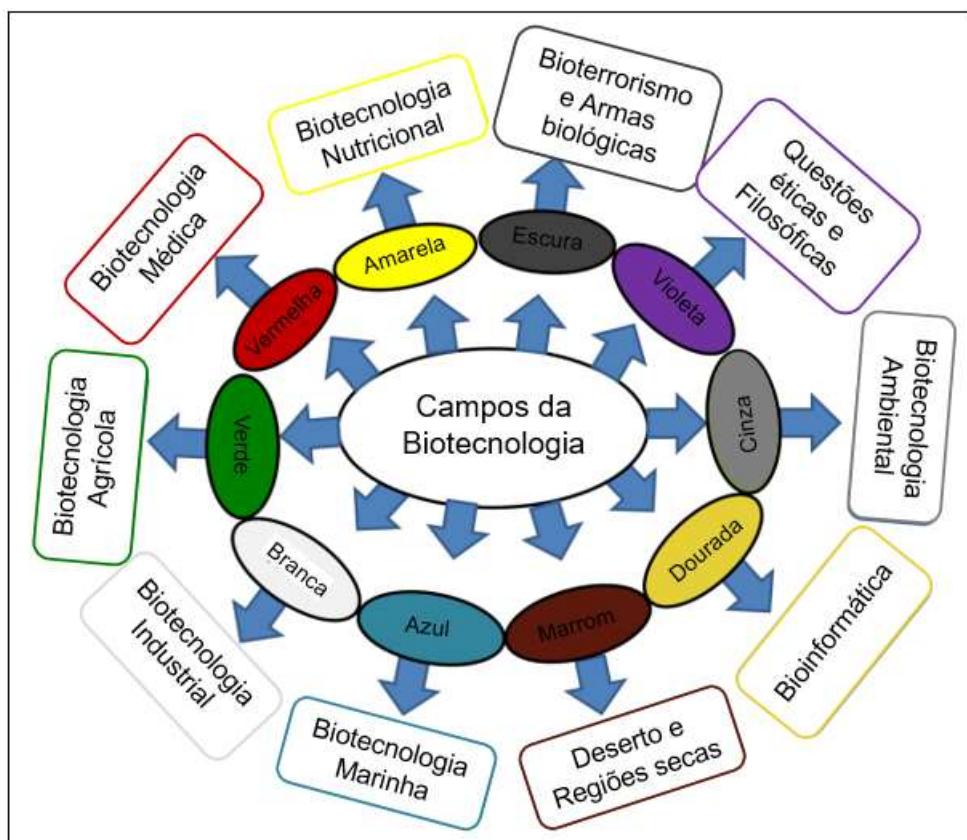
Observar o potencial da membrana mitocondrial de espermatozoides caprinos pós-descongelação submetidos à criopreservação com diferentes nanoformulações;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Biotecnologia e a Agropecuária

Segundo a Convenção Sobre Diversidade Biológica (CDB), o termo “biotecnologia” se refere a qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. Ela é uma área que depende da contribuição de vários campos da ciência e é classificada, principalmente, em cores (Figura 1).

**Figura 1. Classificação das áreas da biotecnologia**



Fonte: Padhy et al., 2020.

Segundo Kafarski (2012), existe uma classificação principal que é focada em quatro cores principais: vermelho, verde, branco e azul. Contudo há classificações que contém mais cores, quase como um “arco-íris”, como: verde (agricultura), amarelo (nutricional), vermelho (medicina e saúde humana), branco (industrial), cinza (problemas ambientais), azul (aquática), marrom (deserto e

regiões secas), ouro (bioinformática), violeta (questões jurídicas, éticas e filosóficas) e a negra (bioterrorismo) (Ministério do Meio Ambiente, 2020).

Apesar do termo e das técnicas serem relativamente recentes, a descoberta dos microrganismos em 1675 por Anton Van Leeuwenhoek e sua utilização na fermentação apenas em 1862 por Louis Pasteur, a utilização dos princípios da biotecnologia é muito antiga, sendo empregada, primeiramente, na agricultura ou na agropecuária. Existem registros de povos utilizando a biotecnologia em 8000 a.C., onde escolhiam as melhores sementes para aumentar a produtividade das colheitas. Como também foi encontrado a utilização, em 7000 a.C., de leveduras na fermentação e produção do vinho e pão e, em 3000 a.C., a utilização de bactérias na fermentação e produção de queijos (Faleiro, Andrade, 2011).

No Brasil, a utilização da biotecnologia pelos índios também foi encontrada na produção dos beijus e com a produção de uma bebida fermentada, o *caium*, produzida a partir da mastigação de mandioca e seu posterior repouso. Assim, as enzimas presentes na saliva quebravam o amido, e este era utilizado por leveduras para formação de uma bebida alcoólica adocicada (Faleiro; Andrade, 2011; Sena *et al.*, 2017).

No Brasil, pesquisas voltadas para a utilização de biotécnicas começaram a ser realizadas por Oswaldo Cruz, se tornando um dos pioneiros na biotecnologia no país, seguindo os passos e pesquisas de Louis Pasteur e fundando, em 1893, o Instituto Soroterápico Nacional que atualmente é conhecido como Instituto Oswaldo Cruz, com o propósito estudar doenças endêmicas e epidêmicas. Porém, a biotecnologia começou a dar os primeiros passos, de forma efetiva, na década de 80, com a iniciação dos primeiros programas para dar suporte ao crescimento desta área no país (Faleiro; Andrade, 2011; Daniel-Ribeiro; Savino, 2018).

Assim se seguiu pelos anos posteriores com a criação do Fundo Setorial de Biotecnologia, gerando um importante financiamento às ações de Ciência, Tecnologia & Inovação (CT&I) que tem como foco o crescimento da biotecnologia no Brasil. Em 2004, a biotecnologia foi vista como uma das áreas “portadora de futuro” com a Criação da Política Industrial Tecnológica e de Comércio Exterior (PITCE). Esse processo iniciou-se devido à necessidade de

uma política industrial e tecnológica no país para definir diretrizes e medidas de política, com a finalidade de um desenvolvimento industrial, tecnológico e a geração de divisas. Com isso, os setores que utilizam a biotecnologia começaram a se desenvolver no Brasil. (Vermulm, 2004; Faleiro; Andrade, 2011; Bianchi, 2013; Costa *et al.*, 2017).

A agropecuária, por sua vez, é um dos principais setores presentes no Brasil, constituindo boa parte do produto interno bruto (PIB) do país. Ela está diretamente relacionada com a evolução e a atividade da sociedade humana. Contudo, o foco neste setor está se tornando cada vez mais imprescindível, devido à necessidade do aumento da produtividade das plantas e dos animais para acompanhar o crescimento populacional. Métodos tradicionais utilizados na agropecuária conseguiam atender a demanda mundial para diversos setores industriais, todavia, a biotecnologia consegue intensificar a produção de forma efetiva e segura, entrando, então, com um papel importante na agropecuária, com foco na criação, saúde, nutrição e reprodução através de técnicas biológicas, físicas e químicas (Faleiro; Andrade, 2011; Getabalew; Alemneh, 2019; Monteiro; Brisola; Vieira Filho, 2021).

Existem diversas formas biotecnológicas utilizadas no setor agropecuário para aumentar a produtividade ou a resistência a fatores ambientais de plantas e animais, já que a produção está relacionada tanto com forças genéticas quanto por fatores ambientais que podem influenciar o rendimento que podem gerar. O melhoramento genético, por exemplo, vem sendo utilizado para aumentar o ganho genético, consequentemente, a produção através do aumento na quantidade de componentes específicos ou diminuindo o tempo de obtenção, como também tornando eles mais resistentes a pragas ou doenças específicas que ocorre em determinadas espécies de plantas ou animais (Pereira, 2008; Faleiro; Andrade, 2011).

A aplicação de microrganismos na agricultura também é observada, como a adição de bactérias diazotróficas que proporciona um efeito positivo nas raízes das plantas ou nas sementes pela captação de nitrogênio ( $N_2$ ) e formação de compostos nitrogenados, importantes para nutrição da planta, como o amônio e o nitrato. Já na pecuária, as biotécnicas empregadas para o melhoramento genético dos animais estão voltadas para o aumento da produtividade, seleção

e reprodução de animais com características de interesse, como maior obtenção de carne ou leite, além da conservação do material genético desses animais. Técnicas como inseminação artificial, criopreservação, transferência de embriões, clonagem e a transformação genética estão entre as utilizadas para estes fins (Faleiro; Andrade, 2011).

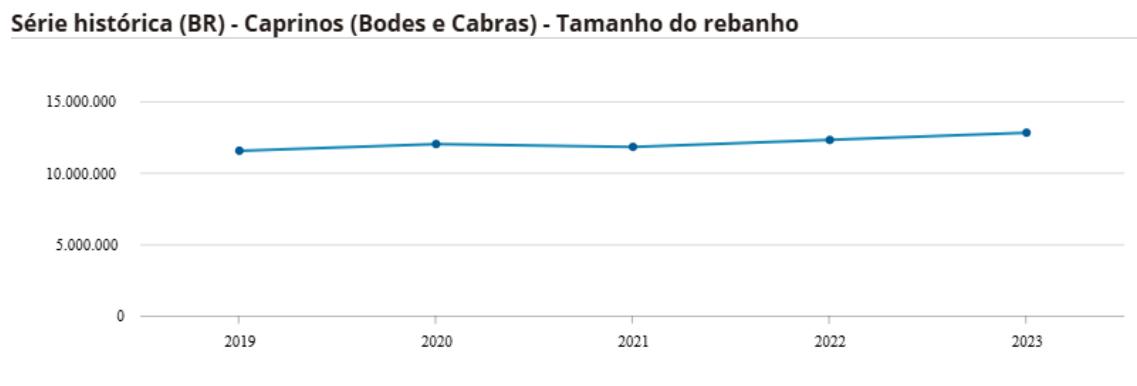
### **3.2 Caprinocultura**

Durante muito tempo, o consumo de produtos oriundos de pequenos ruminantes se dava mais pela questão cultural nas regiões nordeste e sul do Brasil, entretanto observa-se uma melhoria nesse setor, com o foco na profissionalização da atividade, a criação de cooperativas e iniciativas coletivas e a melhoria de condições higiênicas e sanitárias por parte dos criadores. Todos esses fatores foram necessários para se adequar as políticas públicas e dos mercados privados, devido à crescente procura de produtos oriundos destes animais, tornando mais fácil a aceitabilidade (Guimarães *et al.*, 2022).

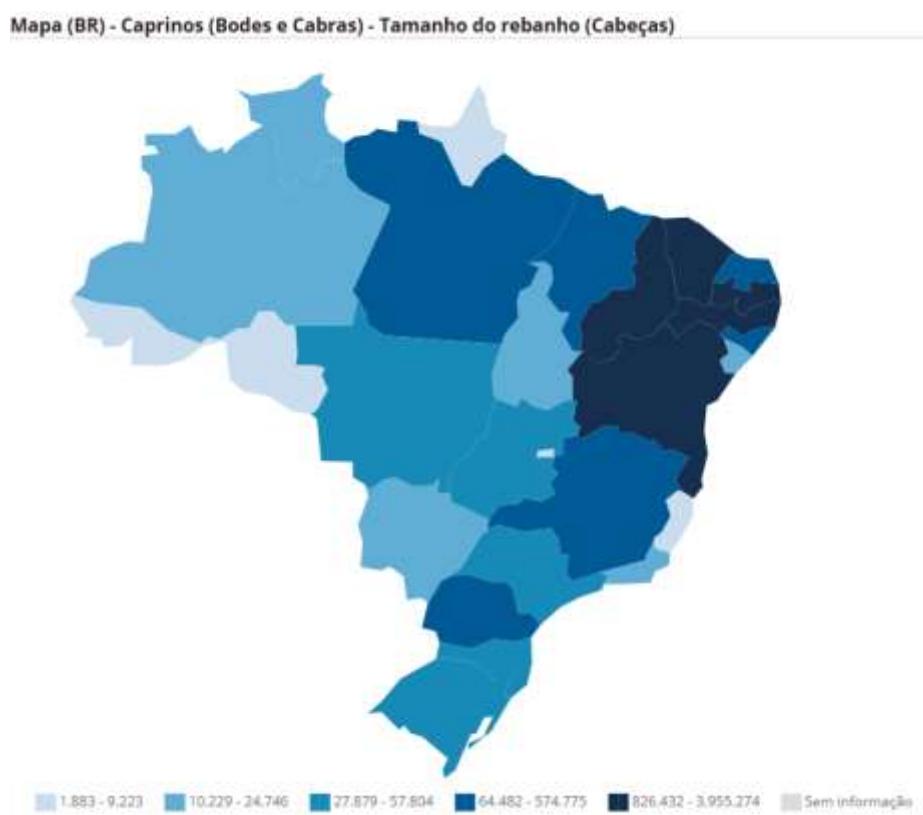
Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2023, o rebanho nacional de caprinos (bodes e cabras) foi de 12.891.493 cabeças (Gráfico 1), concentradas, principalmente, na região Nordeste (Figura 2). O estado da Bahia apresentou o maior percentual destes animais no Brasil, com um total de 3.955.274 cabeças, enquanto a Paraíba detinha 826.432 cabeças (Gráfico 2), se encontrando em maior concentração na região do Cariri paraibano (Figura 3). Um número relativamente maior quando comparado com 2019, quando o rebanho nacional chegava a 10.959.694 cabeças e na Paraíba se encontravam 692.427 cabeças.

Os caprinos foram uma das primeiras espécies a serem domesticadas pelo homem. Contudo, no Brasil, essa espécie veio somente em 1534, junto com a colonização de países europeus. Por ser uma região que enfrenta temperaturas mais altas e a presença de secas, a espécie caprina foi a que prevaleceu na região nordestina, pela adaptabilidade ao clima e à vegetação local (Machado, 2011; Guimarães *et al.*, 2022).

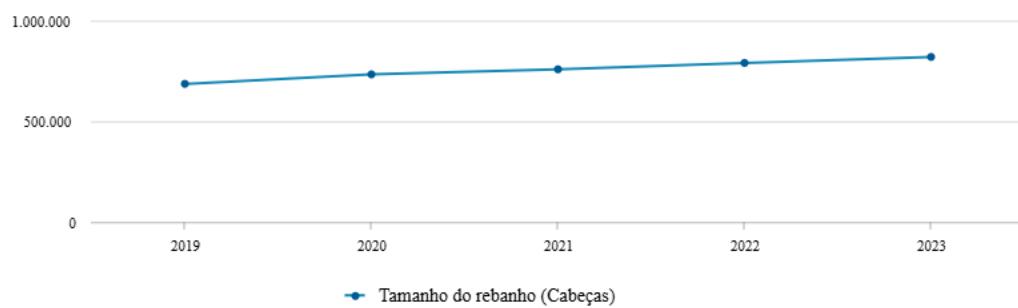
### Gráfico 1. Tamanho do rebanho de caprinos entre 2019-2023 no Brasil



### Figura 2. Concentração do rebanho nacional de caprinos em 2022



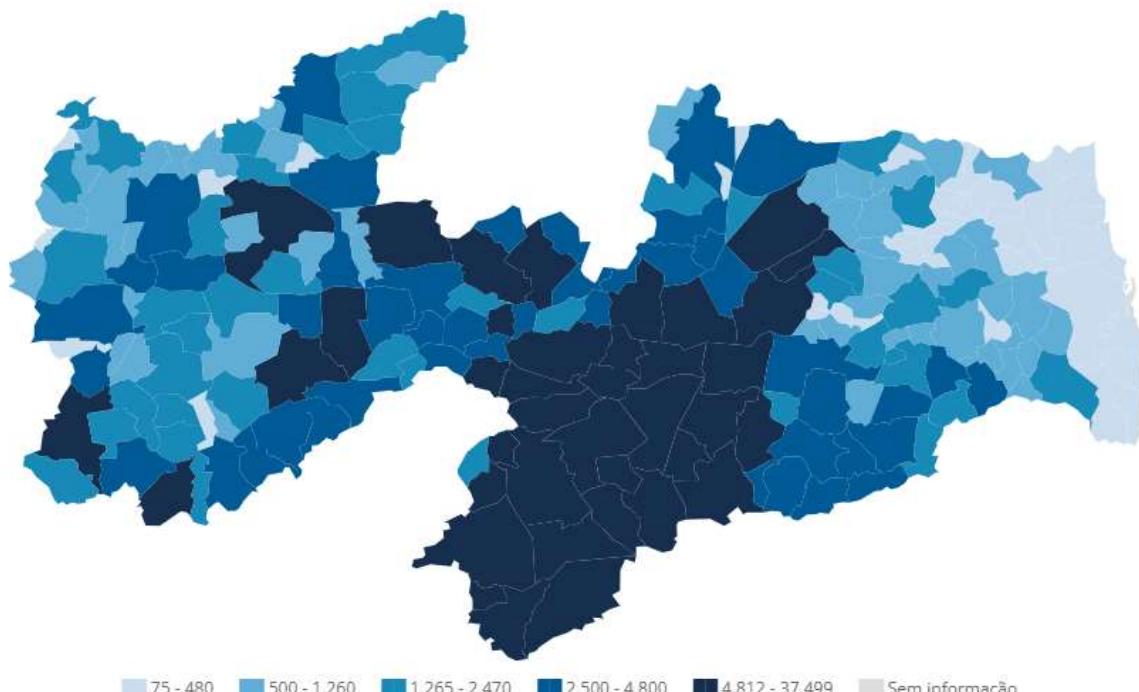
**Gráfico 2. Tamanho do rebanho de caprinos entre 2019-2023 na Paraíba**  
Série histórica (25) - Caprinos (Bodes e Cabras) - Tamanho do rebanho



Fonte: IBGE, 2024.

**Figura 3. Concentração de caprinos no estado da Paraíba em 2022**

Mapa (25) - Caprinos (Bodes e Cabras) - Tamanho do rebanho (Cabeças)

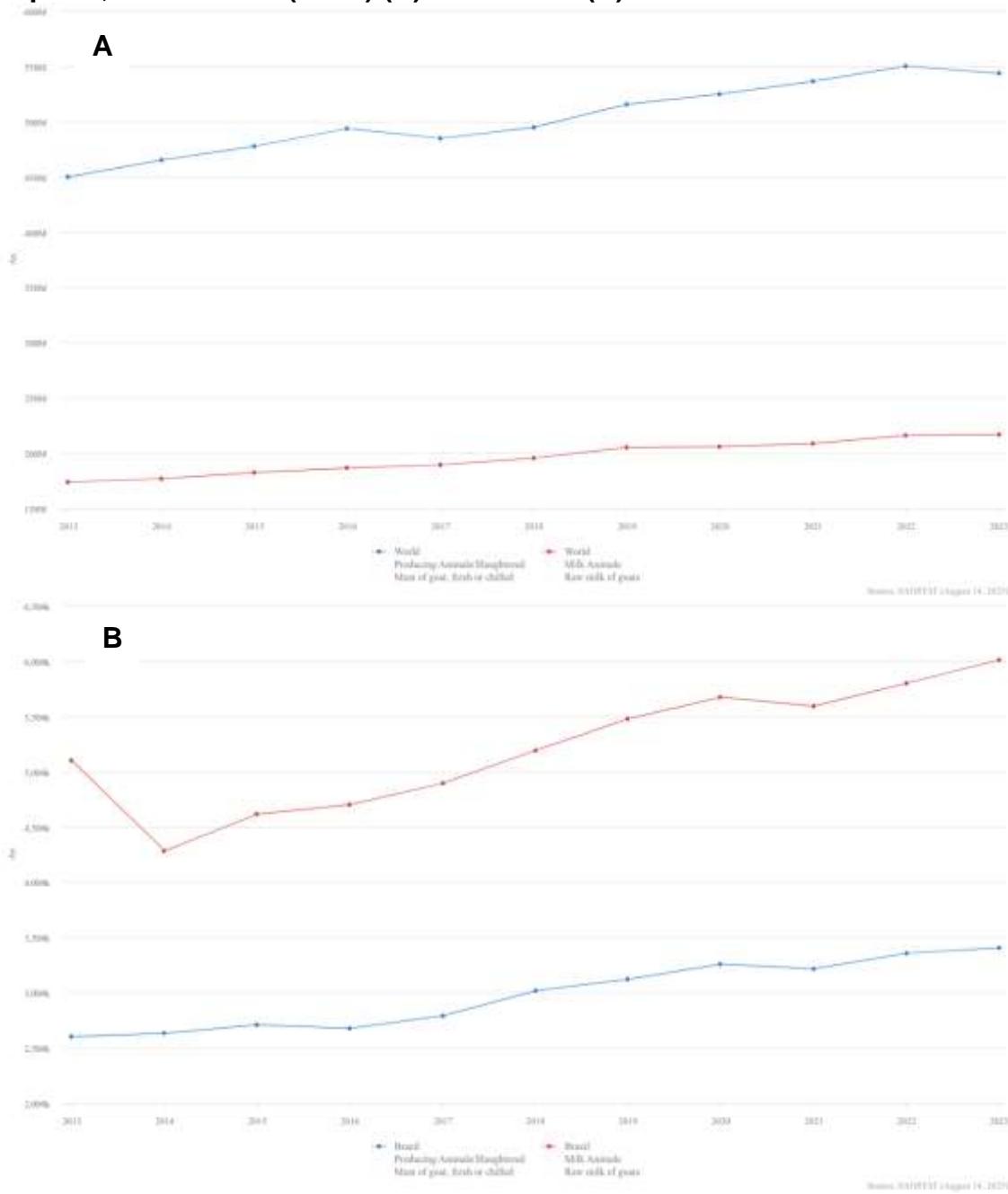


Fonte: IBGE, 2024.

Ao observar o consumo dos produtos oriundos da caprinocultura, pode-se notar um crescimento na produção (Gráfico 3) e, consequentemente, na procura desses materiais para consumo. De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a produção mundial de carne e couro chegou a 543.794.638 toneladas, cada, em 2023, o que revela um crescimento de 17,25% da produção de carne e couro dessa espécie nos últimos 10 anos. Já

no Brasil, esse valor chega a 3.403.651 toneladas em 2023, um crescimento de 23,61% em comparação com 2013.

**Gráfico 3. Quantidades de produção/rendimento de carne, leite e couro de caprino, no Mundo + (Total) (A) e no Brasil (B) de 2013 – 2023**



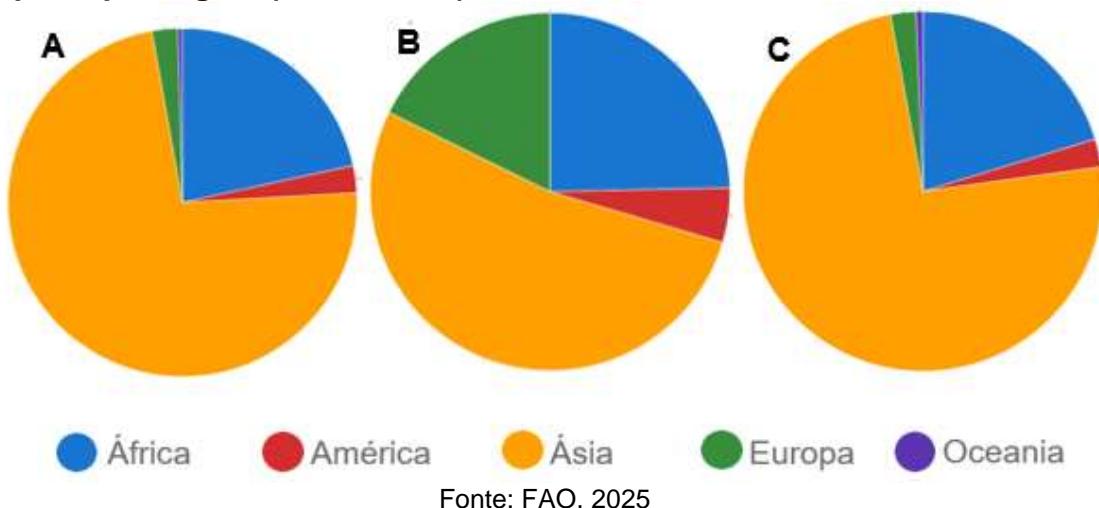
Fonte: FAO, 2025

Quanto ao leite, a produção foi de 216.717.161 toneladas, crescimento de 19,88% nos últimos 10 anos na procura deste produto. No Brasil, foram

registradas a produção de 6.010.217 toneladas em 2023, crescimento de 15,14% em comparação com 2013.

Ao observar a concentração de produção desses produtos no mundo (Gráfico 4), observa-se que eles se encontram mais presentes em regiões mais quentes do mundo e em desenvolvimento, o que está diretamente relacionada com a adaptabilidade dessa espécie a climas e condições mais quentes.

**Gráfico 4. Participação na produção de carne (A), leite (B) e couro (C) de caprino por região (2012 – 2022)**



Devido ao crescente interesse no consumo de produtos oriundos da caprinocultura (carne, leite e couro), há a necessidade de se obter animais com maior produção e melhor qualidade de carne e leite e couro, pois esses produtos podem apresentar diversas características que afetam seu valor final. Diante disso, a biotecnologia pode auxiliar na obtenção de caprinos melhorados geneticamente, além de utilizar uma inovação técnica de manejo específica para a espécie (Zamiri, 2020; Monteiro; Brisola; Vieira Filho, 2021).

A inseminação artificial (IA) é a biotécnica mais eficaz no melhoramento genético das espécies de produção, podendo ser utilizada tanto com o sêmen fresco sem diluição, com diluição ou submetido à criopreservação. Entretanto, o sêmen sem diluição e em temperatura ambiente pode diminuir a capacidade fertilizante com o tempo, devido ao aumento da atividade metabólica das células espermáticas. Posto isto, a diluição aumentaria a quantidade de doses inseminantes de um único ejaculado, como também forneceria uma fonte de energia para as células. Juntamente à redução da temperatura, pode ser um

fator positivo para a técnica, pois reduz ou cessa o metabolismo celular, preservando a capacidade fertilizante do espermatozoide. Por isso, a criopreservação alinhada a inseminação artificial é uma solução para quem deseja aumentar a quantidade de material genético armazenado sem o limite de tempo e sem a necessidade de locomoção do animal, o que encareceria a técnica e estressaria o animal (Zamiri, 2020).

### **3.3 Criopreservação de espermatozoide caprino**

A criopreservação é uma ferramenta indispensável na biotecnologia reprodutiva, pois ela consegue conservar os recursos genéticos dos animais e do homem, mesmo que algo acometa esse animal como acidentes reprodutivos, epidemias ou morte, além de auxiliar na preservação de material genético de animais em extinção (Engdawork; Belayhun; Asegued, 2024).

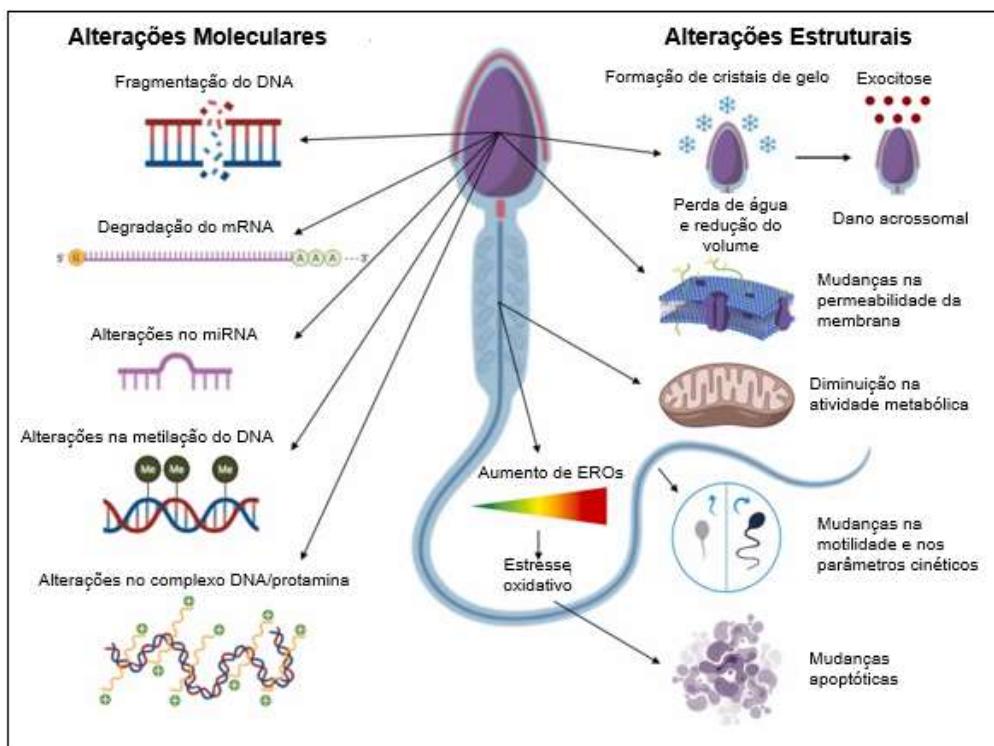
Na agropecuária, a criopreservação é amplamente utilizada para diminuir custos, pois dispensa a necessidade de se locomover o animal para que ocorra a monta natural, bem como descarta a demanda de manter um rebanho vivo para conservação de características de interesse, não precisam esperar que o macho reprodutor realize a cobertura das fêmeas e ainda podem inseminar em momentos ideais (cio). Ainda aumenta a quantidade de doses inseminantes com um único ejaculado, pois ele vai precisar ser previamente diluído (Lv *et al.*, 2019; Akhtar *et al.*, 2022).

Ainda, quando o sêmen é armazenado em temperaturas reduzidas (0-5 °C ou 10-15 °C), este fica viável por até 72 horas para utilização na inseminação, pois a queda da temperatura reduz o metabolismo celular. Também pode ser utilizado congelado, armazenado em botijão criogênico com N<sub>2</sub> (-196 °C). Assim as células podem ser mantidas indefinidamente, devido a inibição completa da atividade metabólica dos espermatozoides (Salamon; Maxwell, 2000).

Contudo, apesar de a técnica ter seus pontos positivos, por reduzir ou parar o metabolismo da célula com a diminuição da temperatura, não significa que a capacidade fertilizante tenha sido mantida. O processo de criopreservação acarreta em crioinjúrias (Figura 4) provocadas pela queda da temperatura. Esses estresses ocorrem devido a formação de cristais de gelo intra e/ou extracelular,

choque frio, estresse osmótico, como também a toxicidade química e estresse oxidativo.

**Figura 4. Danos causados pelo processo de criopreservação**



Fonte: Yáñez-Ortiz *et al.*, 2022.

### 3.4 Diluidores utilizados na criopreservação

A adição de diluidores no processo de criopreservação tem a função de proteger as células durante a queda da temperatura, como também manter um ambiente adequado para que a célula sobreviva e sirva como fonte de energia. Eles são formados por crioprotetor penetrante (para congelação), crioprotetor não penetrante, tampão, um ou mais açúcares, ácido cítrico e antibiótico (Salamon; Maxwell, 2000; Purdy, 2006).

Crioprotetores têm como objetivo proteger as células contra a desidratação excessiva, contra as modificações que ocorrem durante a queda da temperatura e aumentam o ponto de fusão da água. Os crioprotetores penetrantes são classificados como aqueles que conseguem atravessar a membrana plasmática da célula. Eles aumentam a fluidez da membrana e a desidratação do meio intracelular, diminuindo, consequentemente, a formação

de cristais de gelo no interior da célula, além de conter propriedades anticongelantes. Entretanto, em concentrações mais elevadas, se tornam tóxicos, reduzindo o potencial fertilizante da célula espermática. Os mais estudados e utilizados são o glicerol, o etilenoglicol ou o dimetilsulfóxido (DMSO) (Barbas; Mascarenhas, 2009; Sharma; Sharma, 2021; Boafo *et al.*, 2022).

Já os crioprotetores não penetrantes são aqueles que não conseguem passar pela membrana plasmática, formando uma camada protetora na membrana extracelular, como também reduzindo a formação de cristais de gelo. Os crioprotetores não penetrantes mais utilizados são a gema de ovo e o leite desnatado. Outros carboidratos também podem ser adicionados, como sacarose, trealose, lactose ou rafinose (Santos *et al.*, 2008; Yeste, 2016; Hezavehei *et al.*, 2018; Zamiri, 2020).

No entanto, a espécie caprina tem uma particularidade no plasma seminal. São encontradas enzimas que interagem negativamente com componentes da gema do ovo (enzima coaguladora da gema do ovo ou EYCE) e do leite (glicoproteína lipase de 55–60 kDa ou SBUIII). A EYCE é uma fosfolipase A que interage com a lecitina da gema do ovo, hidrolisando-a em ácidos graxos e lisolecitinas, que tem características espermicidas. Já a SBUIII é uma glicoproteína que hidrolisa os triglicerídeos presentes no leite em ácidos graxos, proporcionando a redução motilidade e danificando a membrana plasmática dos espermatozoides. Para que isso não ocorra, a centrifugação é necessária para que haja a retirada do plasma seminal, juntamente às enzimas, e ressuspensão nos diluidores próprios para que ocorra o processo de criopreservação (Purdy, 2006; Lv *et al.*, 2019).

Devido aos problemas durante o processo de criopreservação, a utilização de diluidores se torna indispensável para a sobrevivência dessas células durante a diminuição da temperatura. Entretanto, atualmente, os protocolos de criopreservação para pequenos ruminantes têm sido adaptados de outros animais de criação. Devido a esse e outros fatores, a qualidade dos espermatozoides criopreservados não melhorou, necessitando cada vez mais de mais estudos relacionado ao processo e aos componentes presentes nos diluidores para uma criopreservação mais eficaz das células espermáticas desta espécie (Yeste, 2016; Lv *et al.*, 2019).

### 3.5 Diluidores vegetais

Apesar da gema de ovo e o leite serem comumente utilizados como crioprotetores nos diluidores, eles acarretam risco de contaminação e transmissão de doenças, além de problemas com padronização e aglutinação. Para reduzir essa preocupação, crioprotetores que não sejam de origem animal vêm sendo estudados a anos para conseguir um diluidor seguro e que mantenha a célula viável durante o processo de criopreservação (Layek *et al.*, 2016; Lv *et al.*, 2019).

Um exemplo disso, são os diluidores de origem vegetal. Eles são utilizados para refrigeração e/ou congelação e já se encontram como constituintes de alguns diluidores comerciais.

A soja [*Glycine max (L.) Merr*] é uma leguminosa nativa do Leste Asiático, sendo, atualmente, cultivada em todo mundo devido ao seu alto teor de proteínas e óleos. Ela é uma das plantas mais estudadas para criopreservação de células espermáticas, se encontrando em sua composição cerca de 36-38% de proteínas, 30% de carboidratos, 19% de óleo, 9% de fibra bruta e 5% de cinzas com base no peso seco. Contudo, esse valor pode variar de acordo com a forma e local de obtenção. Ela já foi testada em forma de extrato ou um bioativo específico, encontrando bons resultados, sendo a lecitina o produto oriundo das sementes de soja mais utilizado na criopreservação (Brumm; Hurlburgh, 2002; Medic; Atkinson; Hurlburgh Junior, 2014).

Outra planta utilizada como crioprotetora é o coco (*Cocos nucifera L.*). É uma planta muito encontrada em regiões tropicais e consumida mundialmente. Seus principais produtos estão relacionados à água de coco (formada por, aproximadamente, 94% de água) e o leite de coco (contendo, aproximadamente, 50% de água). Além da água, os produtos com esses componentes contêm em sua composição açúcares, vitaminas, minerais e aminoácidos. Diante da composição e da fácil obtenção, acabou sendo foco para estudos com conservação de células espermáticas. Seu diluidor já é comercializado pela ACP Biotecnologia (Fortaleza-CE) como um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP) e utilizado na refrigeração de células espermáticas tanto de

animais de produção, como em pequenos animais (Young *et al.*, 2009; Odrada; Moreira *et al.*, 2021; Odrada; Purnamasari; Cruz, 2023).

Por fim, outra planta que vem sendo estudada na criopreservação é a *Aloe vera*. Popularmente conhecida como babosa, é uma planta de origem africana e é muito utilizada, principalmente, pela indústria devido a sua rica composição, contendo antraquinonas, carboidratos, proteínas, açúcares, vitaminas, entre outros. Na criopreservação ela vem sendo desenvolvida e testada em forma de extrato ou em pó para substituição total ou parcial dos produtos de origem animal (Moghaddasi; Res, 2011; Farias *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2020).

### **3.6 Lecitina de soja**

A lecitina de soja é formada por, principalmente, fosfatidilcolina e ácidos graxos, como ácidos esteárico, oleico e palmítico. Ela está, predominantemente, na maioria das membranas plasmáticas dos mamíferos e seu fosfolipídio com maior proporção está diretamente ligado a diversas reações metabólicas. Uma dessas funções está relacionada à estabilidade estrutural e às membranas celulares. Além disso, elas fornecem uma reserva de colina e atuam como segundo mensageiro, também é um constituinte de lipoproteínas e está presente na síntese de acetilcolina. Dada as suas características e por ser de origem vegetal, idealizou-se substituir a lipoproteína de alto peso molecular (LDL) presente na gema do ovo pela lecitina de soja (Oke; Jacob; Paliyath, 2010; Layek *et al.*, 2016; Nadri *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021).

Apesar de não ser claro o mecanismo exercido pela lecitina como crioprotetor, sugere-se que sua crioproteção está relacionada com a estabilização e/ou substituição de fosfolipídios presentes na membrana plasmática da célula espermática (Najafi *et al.*, 2014; Chelucci *et al.*, 2015).

Diversos estudos já foram feitos para observar o efeito crioprotetor da lecitina em várias espécies. Alguns trabalhos propõe a substituição dos crioprotetores provenientes de origem animal por lecitina, por observar efeitos positivos durante o processo de criopreservação, como em caninos (Dalmazzo *et al.*, 2017), caprinos (Sun *et al.*, 2020), ovinos (Molina *et al.*, 2023), coelhos (Nishijima *et al.*, 2015) e bovinos (Đuračka *et al.*, 2024). Entretanto, algumas

outras espécies não tiveram resultados promissores com a substituição, como abelhas (Dadkhah *et al.*, 2016) e suínos (Pearodwong *et al.*, 2019). Essa diferença de resultados se dá devido à heterogeneidade entre as espécies, tanto morfológicas, quanto em composição. Assim elas respondem de formas distintas quanto à composição e concentração dos componentes presentes nos diluidores (Ramón *et al.*, 2014).

Apesar dos resultados favoráveis com a substituição por lecitina na criopreservação de espermatozoides, as buscas pela melhoria de um diluidor vêm sendo sempre investigadas para que se consiga uma congelação cada vez mais eficaz e com redução de perdas celulares.

### 3.7 *Spirulina platensis*

Há séculos as microalgas são utilizadas pelo homem para consumo. Foi visto pela primeira vez em 1519, pelo espanhol Hernando Cortez e pelos conquistadores quando visitaram o Lago Texcoco, no Vale do México, onde relataram a presença da *Spirulina* ssp. (Figura 5) na mesa dos astecas. Há relatos de sua utilização por tribos indígenas, principalmente as microalgas das espécies *Spirulina platensis*, *Nostoc* e *Aphanizomenon*. Isso ocorre devido a composição das microalgas que podem variar de 70 a 230 g kg<sup>-1</sup> de lipídios, 50 a 230 g kg<sup>-1</sup> de carboidratos e 60 a 520 g kg<sup>-1</sup> de proteínas com base na matéria seca (DMB), dependendo da espécie (Lupatini *et al.*, 2017; Soni; Sudhakar; Rana, 2017).

**Figura 5. *Spirulina* ssp. analisada por microscopia óptica**



A *Spirulina platensis* é conhecida como alga verde-azulada devido a um pigmento produzido por ela, chamado ficocianina. Ela é uma cianobactéria pertencente ao filo *Cyanophyta (Cyanobacteria)* e compartilha característica com plantas, por conseguir fazer fotossíntese e com bactérias primitivas por não conter parede celular vegetal. Ela também compartilha características com o reino animal, pois são encontrados açúcares complexos semelhantes ao glicogênio em sua membrana celular (Saranraj; Sivasakthi, 2014; Jung *et al.*, 2019).

Em 1974, ela foi indicada no *United Nations World Food Conference* como, possivelmente, o melhor alimento para o futuro. Já a Organização Mundial da Saúde (OMS) descreveu a *Spirulina* como o melhor produto para a saúde da humanidade devido a seus estudos com antioxidantes, fitonutrientes, probióticos e nutracêuticos (IIMSAM, 2008; Soni; Sudhakar; Rana, 2017).

Essa microalga é uma das mais visadas pela alta concentração de proteínas que são encontradas nela (460 a 630 g kg<sup>-1</sup> DMB ou 55-70%), podendo ser comparada aos valores encontrados em carnes ou na soja. Com isso, nela estão presentes todos os aminoácidos essenciais, apesar de se encontrar em menor quantidade de metionina, cistina e lisina em comparação com a carne, por exemplo. Além das proteínas que são convencionais, na *Spirulina* também são encontradas ficobiliproteínas, como a ficoeritrina, a aloficocianina e a ficocianina, sendo esta última de interesse cosmético e alimentício (Lupatini *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2019).

Há também a presença de vitaminas [B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (nicotinamida), B6 (piridoxina), B9 (ácido fólico), B12 (cianocobalamina), vitamina C, vitamina D e vitamina E], minerais (cálcio, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, selênio, sódio e zinco) e ácidos graxos essenciais [ácido γ-linolênico (36% do total de PUFAs), ácido α-linolênico (ALA), ácido linoléico (LA, 36% do total de PUFAs), ácido estearylênico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido araquidônico (AA)] (Jung *et al.*, 2019).

Ainda, foram relatados os pigmentos fotossintéticos como a clorofila α, xantofila, beta-caroteno, equinenona, mixoxantofila, zeaxantina, cantaxantina,

diatoxantina, 3-hidroxiequinenona, beta-cripto-xantina, oscilaxantina, além das ficobiliproteínas c-ficocianina e aloficocianina. A ficocianina é um pigmento azul solúvel em água. É um pigmento muito visado tanto pela sua coloração, como por ter um poderoso efeito antioxidante, eliminando radicais livres e inibindo a peroxidação lipídica. Ela está presente com cerca de 200 g kg<sup>-1</sup> das proteínas encontradas na microalga (Lupatini *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2019).

Devido ao seu conteúdo, principalmente proteico, pelo seu rápido crescimento e por ser segura para consumo, ela acabou despertando interesse, sendo amplamente utilizada para produção de alimentos e aditivos para rações na agricultura, indústria alimentícia, farmacêutica, perfumaria, medicina e ciência. Na biotecnologia, as microalgas estão sendo cada vez mais utilizadas para potencial de produção de biocombustíveis, bioestimulantes agrícolas para plantas cultivadas e tratamento de águas residuais (Saranraj; Sivasakthi, 2014; Soni; Sudhakar; Rana, 2017).

Com isso, testes na reprodução também já foram realizados utilizando essas microalgas. Estes estudos estão relacionados com a adição dessa microalga na alimentação dos animais para observar proteção ou melhoria dos órgãos reprodutores, do sêmen ou das células, como também analisada na criopreservação.

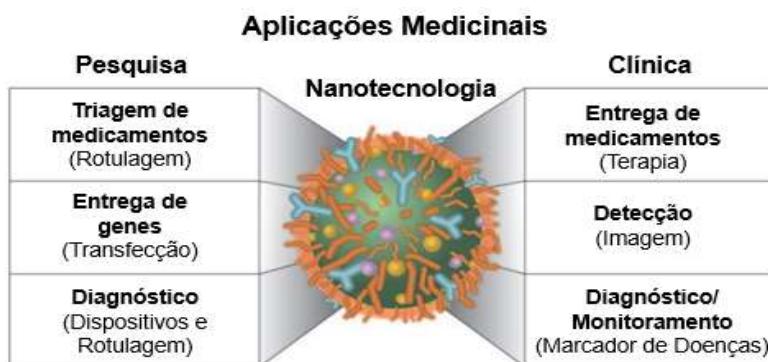
Kistanova e colaboradores (2009) observaram um aumento no volume e na motilidade dos espermatozoides de suínos quando a microalga foi adicionada à dieta destes animais. El-Desoky e colaboradores (2013) observaram que a ingestão de *Spirulina platensis* conseguiu proteger os testículos de ratos contra danos induzidos por cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>), devido a seu rico conteúdo antioxidante.

Na criopreservação, a adição de extrato de *Spirulina* ou de algum bioativo proveniente da microalga foi testado em algumas espécies como equino (Zeitoun *et al.*, 2022), bubalinos (Mizera; Kuczaj; Szul, 2018; Badr *et al.*, 2021) e ovino (Kameni *et al.*, 2022; Rahim *et al.*, 2024). Esses estudos mostram que a adição do extrato ou sua molécula bioativa influenciaram positivamente as células, tornando imprescindível o estudo com essa cianobactéria na reprodução.

### 3.8 Nanotecnologia

A nanotecnologia nada mais é do que qualquer tecnologia que seja trabalhada na escala nanométrica, contendo diversas aplicações na medicina atual (Figura 6).

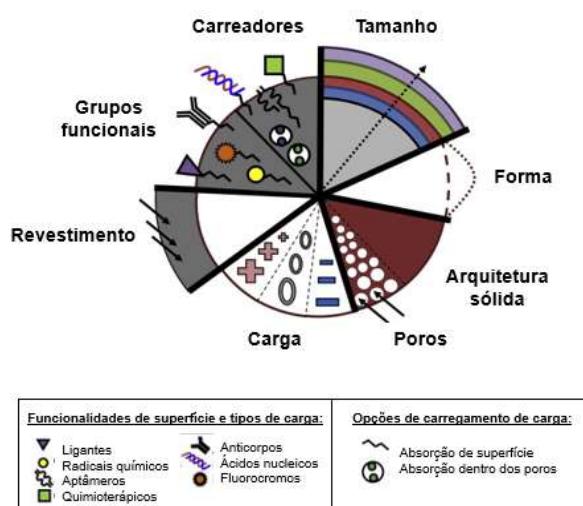
**Figura 6. Aplicações da nanotecnologia na medicina**



Fonte: McNeil, 2005.

Quando falamos de sistemas biológicos, a nanotecnologia tem a vantagem de controlar o tamanho do material em que se deseja trabalhar. Nela, átomos, moléculas e subconjuntos serão ligados por mecanossíntese, onde conseguimos unir mais de uma molécula ativa, controlando sua orientação e posição por um tempo específico e com uma quantidade de força controlada, tornando os nanomateriais altamente versáteis (Figura 7) (Kaehler, 1994; McNeil, 2005; Nasrollahzadeh *et al.*, 2019).

**Figura 7. Versatilidade dos nanomateriais**



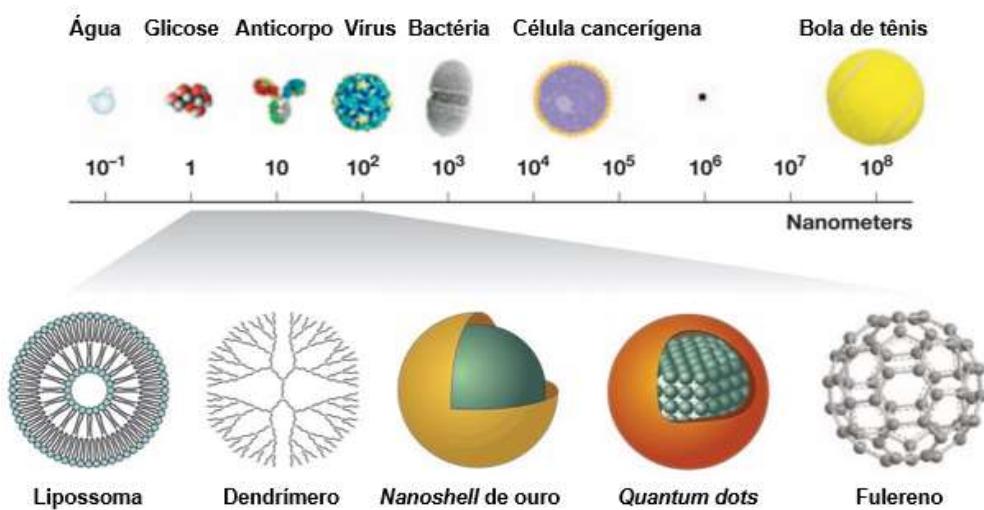
Fonte: Barkalina *et al.*, 2014.

Apesar de parecer uma tecnologia nova, há relatos da utilização dela muito antes, como no século IV d.C. com o Cálice de Licurgo. Esse cálice, desenvolvido pelos romanos, tinha uma característica peculiar: ele mudava de cor dependendo da iluminação que este recebia (verde opaco quando iluminado por fora e vermelho quando iluminado por dentro). Este fenômeno foi, posteriormente, identificado e explicado por conter uma dispersão de nanopartículas de ouro e prata presentes de forma coloidal em todo o material de vidro do cálice (Sousa *et al.*, 2018).

Já a ideia de nanotecnologia só veio a surgir numa palestra de Richard Feynman, do *California Institute of Technology*, em 1959, intitulada “Há mais espaço lá embaixo” (*There is Plenty of Room at the Bottom*). Essa foi a primeira palestra sobre tecnologia e engenharia em escala atômica, onde começa-se a ideia de manipulação de moléculas menores, embora não tenha utilizado o termo “nano” na época (Apolinário *et al.*, 2020; Shandilya *et al.*, 2020).

Tanto a nanociência como a nanotecnologia utilizam objetos ou sistemas muito pequenos. O tamanho dessas construções em nanoescala são menores que o tamanho de células humanas (10.000 a 20.000 nm de diâmetro) e organelas e semelhantes em tamanho a grandes macromoléculas biológicas, como enzimas e receptores (Figura 8).

**Figura 8. Comparação em nanoescala**



Fonte: McNeil, 2005.

Esse tamanho é essencial, pois, segundo *National Nanotechnology Initiative* (NNI), alguns materiais nanoestruturados são mais fortes ou possuem propriedades magnéticas diferentes em comparação com outras formas ou tamanhos do mesmo material. Outros são melhores na condução de calor ou eletricidade. Eles podem se tornar mais reativos quimicamente, refletir melhor a luz ou mudar de cor à medida que seu tamanho ou estrutura é alterado, conforme observado na Tabela 1 (McNeil, 2005; Apolinário *et al.*, 2020).

**Tabela 1. Principais características dos nanomateriais que favorecem a sua utilização em biomedicina**

Característica	Relevância para aplicações biomédicas
Tamanho pequeno	Comparabilidade com o tamanho das moléculas biológicas Potencial para uma integração direta em processos celulares e vias fisiológicas
Grande área de superfície	Capacidade para transportar grandes quantidades de carga biológica, incluindo transporte simultâneo de vários tipos de carga em um nanocarreador
Versatilidade	Propriedades físico-químicas ajustáveis (tamanho, forma, carga superficial e arquitetura) para maior eficácia de direcionamento  Química de superfície ajustável (adição de grupos funcionais e/ou revestimentos específicos) para a absorção covalente ou não covalente de um determinado tipo de carga útil  Opções para o “ajuste fino” da química de superfície através da adição de ligantes altamente específicos para reconhecimento molecular e maior seletividade de direcionamento
Ação direcionada	Alta sensibilidade e especificidade Diminuição dos efeitos “fora do alvo” da carga Maior precisão dos perfis de detecção para agentes de diagnóstico Aumento da biodisponibilidade e/ou diminuição da toxicidade para agentes terapêuticos
Estabilidade	Distância de ação Opções para administração sistêmica Proteção de cargas úteis “sensíveis” e biodistribuição otimizada

Fonte: Barkalina *et al.*, 2014.

A nanobiotecnologia é um termo mais recente, uma associação da nanotecnologia com a biotecnologia. Ele é a combinação da engenharia e

biologia molecular no desenvolvimento e implementação de dispositivos ou sistemas para análise biológica com melhor sensibilidade, especificidade e maior taxa de reconhecimento. Ela é atualmente utilizada para aplicações médicas, diagnósticos, terapia de gene, entrega de drogas, engenharia de tecidos, detecção de patógenos, segurança alimentar e como biossurfactantes (Fakruddin; Hossain; Afroz, 2012; Morais *et al.*, 2014).

Na reprodução, a utilização da nanotecnologia é encontrada com propósitos diversificados. Alguns estão relacionados com a detecção e/ou terapia direcionada de cânceres reprodutivos, preservação da fertilidade, transferência genética de genes e compostos biológicos mediada por espermatozoide, seleção de gametas e embriões e outros problemas clínicos associados à puberdade, menopausa, infecções sexualmente transmissíveis (IST) (Barkalina *et al.*, 2014; Shandilya *et al.*, 2020).

A nanobiotecnologia vem sendo muito estudada nos últimos anos na criopreservação de células espermáticas com o objetivo de tornar essa biotécnica cada vez mais efetiva, pois a criopreservação modifica a integridade do acrosoma e a atividade mitocondrial e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O resultado disto está na degradação do mRNA e do miRNA, além da integridade da estrutura da nucleoproteína. Com isso, há a necessidade de se estudar diluidores que interajam em nível estrutural e molecular para reduzir essas crioinjúrias (Akhtar *et al.*, 2022).

Estudos com ovinos (Hozyen; Shamy; Farghali, 2019; Luna-Orozco *et al.*, 2019), equinos (Nasiri-Foomani *et al.*, 2024), caprinos (Nadri *et al.*, 2019; Ismail *et al.*, 2020), bovinos (Khalil *et al.*, 2019; Mousavi *et al.*, 2023), bubalinos (Abdelnour *et al.*, 2023; Hozyen *et al.*, 2023) e humanos (Isaac *et al.*, 2017; Dashtestani; Ghourchian; Najafi; 2018) mostraram efeitos positivos quando utilizam a nanotecnologia para a criopreservação das células espermáticas. Isso só reforça a importância de estudos em uma área em crescimento que favorece a melhoria da técnica.

## REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR, S. A. et al. Effects of propolis-loaded nanoliposomes fortification in extender on buffalo semen cryopreservation. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.
- AKHTAR, M. F. et al. Effect of sperm cryopreservation in farm animals using nanotechnology. **Animals**, v. 12, n. 17, p. 2277, 2022.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Opening the pandora's box of nanomedicine: There is needed plenty of room at the bottom. **Quimica Nova**, v. 43, n. 2, p. 212–225, 1 fev. 2020.
- ARBIX, Glauco. Biotecnologia sem fronteiras. **Novos estudos CEBRAP**, p. 5-10, 2007.
- BADR, M. et al. Spirulina platensis extract addition to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing potentials of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 1–12, 2021.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and tissue banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.
- BARKALINA, N. et al. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 5, p. e921-e938, 2014.
- BIANCHI, C. A indústria brasileira de biotecnologia: montando o quebra-cabeça. **Revista Economia & Tecnologia**, v. 9, n. 2, p. 90-107, 2013.
- BOAFO, George Frimpong et al. The role of cryoprotective agents in liposome stabilization and preservation. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 20, p. 12487, 2022.
- BRUMM, T. J; HURBURGH, C. R. Quality Of The 2002 Soybean Crop From The United States, 2012.
- CHELUCCI, S. et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1064–1074, 1 abr. 2015.
- COSTA, B. M. G.; DA SILVA P. E.; DE MACEDO, G. R. FUNDO SETORIAL DE BIOTECNOLOGIA: A PARTICIPAÇÃO DO CENTRO-OESTE, NORTE E NORDESTE. **Revista Interdisciplinar Científica Aplicada**, v. 11, n. 2, p. 53-77, 2017.
- DADKHAH, F. et al. Preservación de espermatozoides de la abeja de la miel usando extensores de semen basados en la yema de huevo y la lecitina de soja y un protocolo de criopreservación modificado. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 4, p. 279–283, 2 nov. 2016.

- DALMAZZO, A. et al. Effects of Soy Lecithin Extender on Dog Sperm Cryopreservation. **Animal Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 174–182, 3 jul. 2018.
- DANIEL-RIBEIRO, Cláudio Tadeu; SAVINO, Wilsonq. O Instituto Oswaldo Cruz: 115 anos de ciência para a saúde da população Brasileira. **Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical**, v. 13, p. 103-109, 2014.
- DASHTESTANI, F.; GHOURCHIAN, H.; NAJAFI, A. Albumin coated copper-cysteine nanozyme for reducing oxidative stress induced during sperm cryopreservation. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 621–630, 1 out. 2018.
- ĎURAČKA, Michal et al. Comparative study: Efficacy of egg-yolk vs soy lecithin-based diluent in preservation of chilled bovine semen—Bacteriology and sperm quality. **Czech Journal of Animal Science**, v. 69, n. 10, p. 400-409, 2024.
- EL-DESOKY, G. E. et al. Improvement of Mercuric Chloride-Induced Testis Injuries and Sperm Quality Deteriorations by Spirulina platensis in Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 28 mar. 2013.
- ELFAR, O. A. et al. Advances in delivery methods of Arthrospira platensis (spirulina) for enhanced therapeutic outcomes. **Bioengineered**, v. 13, n. 6, p. 14681-14718, 2022.
- ENGDAWORK, Aweke; BELAYHUN, Teklewold; ASEGED, Tesfalem. The role of reproductive technologies and cryopreservation of genetic materials in the conservation of animal genetic resources. **Ecological Genetics and Genomics**, v. 31, p. 100250, 2024.
- FAKRUDDIN, M.D.; HOSSAIN, Z.; AFROZ, H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. **J. Nano Biotech.**, 10: 31-34, 2012.
- FALEIRO, G. F.; ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia: uma visão geral. In: FALEIRO, G. F.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. **BIOTECNOLOGIA, estado da arte e aplicações na agropecuária**. Embrapa Cerrados: Planaltina, DF. 2011.
- Farias C. F. A. et al. Estudo da eficácia da Aloe vera como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.3, p.787-794, jul./set. 2019.
- FUTINO, D. O. et al. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 214–220, abr. 2010.
- GETABALEW, Mebrate; ALEMNEH, Tewodros. The application of biotechnology on livestock feed improvement. **Arch. Biomed. Eng. Biotechnol**, v. 1, n. 5, p. 1-7, 2019.

- GUIMARÃES, V. P. et al. The future of small ruminants in Brazil: Lessons from the recent period and scenarios for the next decade. **Small Ruminant Research**, v. 209, 1 abr. 2022.
- HEZAVEHEI, M. et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive biomedicine online**, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.
- HOZYEN, H. et al. In vitro Supplementation of Nano Selenium Minimizes Freeze-Thaw Induced Damage to Ram Spermatozoa. **International Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 4 p. 249-254, 2019.
- IIMSAM (Intergovernmental Institution for the Use of Micro-Algae Spirulina Against Malnutrition). 2008. IIMSAM works. With concrete deeds. A year in review support IIMSAM support life. New York: IIMSAM.
- ISAAC, A. V. et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 494, n. 3–4, p. 656–662, 16 dez. 2017.
- ISMAIL, A. A. et al. Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen. **Cryobiology**, v. 97, p. 144–152, 1 dez. 2020.
- JUNG, F. et al. Spirulina platensis, a super food? **Journal of Cellular Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 43–54, 2019.
- JUNG, F. et al. Spirulina platensis, a super food? **Journal of Cellular Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 43–54, 2019.
- KAEHLER, T. Nanotechnology: basic concepts and definitions. **Clin Chem.** 40(9):1797–1799, 1994.
- KAFARSKI, P. Rainbow code of biotechnology. **CHEMIK**, v. 66, n. 8, p. 811–816, 2012.
- KAHI, A. K.; REWE, T. O. Biotechnology in livestock production: Overview of possibilities for Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4984–4991, 2008.
- KAMENI LEUGOUÉ, S. et al. Spirulina (*Arthrospira platensis*) Extract Promotes Motility, Microscopic, and Antioxidative Parameters of Ram Semen during Refrigerated Storage. **Black Sea Journal of Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 481–490, 1 out. 2022.
- KISTANOVA, E. et al. EFFECT OF THE Spirulina platensis INCLUDED IN THE MAIN DIET ON THE BOAR SPERM QUALITY. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, n. 6, p. 547–557, 2009.

- KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 55-76, 2011.
- LAYEK, S. S. et al. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal reproduction science**, v. 172, p. 1-9, 2016.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 113-141, 2000.
- LUNA-OROZCO et al. Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. **Iranian journal of veterinary research**, v. 20, n. 2, p. 126, 2019.
- LUPATINI, A. L. et al. Potential application of microalga Spirulina platensis as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 3, p. 724-732, 2017.
- LV, Chunrong et al. Spermatozoa cryopreservation: state of art and future in small ruminants. **Biopreservation and biobanking**, v. 17, n. 2, p. 171-182, 2019.
- MACHADO, T. M. M. História das raças caprinas no Brasil. In: DA FONSECA, J. F. et al. Produção de caprinos e ovinos de leite. Embrapa Gado de Leite, 2011.
- MAZINANI, M.; RUDE, B. Population, world production and quality of sheep and goat products. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 15, n. 4, p. 291-299, 2020.
- MCNEIL, S. E. Nanotechnology for the biologist. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 3, p. 585–594, 2005.
- MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean composition. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 91, p. 363-384, 2014.
- MIZERA, A.; KUCZAJ, M.; SZUL, A. Impact of the Spirulina maxima extract addition to semen extender on bovine sperm quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 601–607, 2019.
- MOGHADDASI, S.; KUMAR VERMA, S. Aloe vera their chemicals composition and applications: A review. **International Journal of Biological & Medical Research**, v. 2, n. 1, p. 466-71, 2011.
- MOLINA, Julio Constantino Jeri et al. Association between different soy lecithin-based extenders and freezing rates in ram semen cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 252, p. 107234, 2023.
- MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M. V.; FILHO, J. E. R. V. Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil. Texto para Discussão, 2021.

- MORAIS, Ivania Samara dos Santos Silva et al. Extraction Processes, Bioaccessibility, Antioxidant Capacity, and Potential Prebiotic Effect of Co-Product Extracts From Fruits of the Spondias Genus. **Journal of Food Science**, v. 90, n. 5, p. e70260, 2025.
- NADRI, T. et al. Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. **Theriogenology**, v. 133, p. 38–44, 15 jul. 2019.
- NAJAFI, A. et al. Cryopreservation of ram semen in extenders containing soybean lecithin as cryoprotectant and hyaluronic acid as antioxidant. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 49, n. 6, p. 934–940, 1 dez. 2014.
- NASIRI-FOOMANI, N. et al. Preparation, characterization, and ex-vivo evaluation of curcumin-loaded niosomal nanoparticles on the equine sperm quality during cooled storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 264, p. 130620, 2024.
- NASROLLAHZADEH, M. et al. An introduction to nanotechnology. In: Interface science and technology. Elsevier, 2019. p. 1-27.
- NISHIJIMA, K. et al. Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1172–1175, 15 out. 2015.
- ODRADA, P. M. S.; PURNAMASARI, L.; CRUZ, J. F. D. The Effects of Water-Based Coconut Extenders on Semen Preservation : A review. **Jurnal Sain Peternakan Indonesia**, v. 18, n. 1, p. 20–26, 31 mar. 2023.
- OKE, M.; JACOB, J. K.; PALIYATH, G. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 232–240, jan. 2010.
- PADHY, Indira et al. Role of biotechnology in pharmaceutical research: A comprehensive review. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 472-486, 2020.
- PEARODWONG, P. et al. Comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of boar sêmen. **VETERINARSKA STANICA**, v. 50, n. 6, p. 531-540, 2019.
- PEREIRA, Jonas Carlos Campos. Melhoramento genético aplicado à produção animal. FEPMVZ Editora, 2004.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small ruminant research**, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006.
- RAHIM, A. et al. Effect of C-phycocyanin purified from Spirulina platensis on cooled ram semen quality and in vivo fertility. **Theriogenology**, v. 215, p. 234-240, 2024.

- RAMÓN, M. et al. Understanding sperm heterogeneity: Biological and practical implications. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s4, p. 30–36, 2014.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.
- SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J. et al. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 3, p. 233–238, 1 set. 2017.
- SANTOS, R.R. et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 9-15, 2008.
- SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. Spirulina platensis–food for future: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 26-33, 2014.
- SENA, H. et al. Fermentado de mandioca (manihot esculenta crantz): características físico-químicas e sensoriais dos processos de desenvolvimento de bebida alcoólica tipicamente brasileira. **Revista Ciência Geográfica. JC na Escola Ciência, Tecnologia e Sociedade: Mobilizar o Conhecimento para Alimentar o Brasil** (2a ed.).
- SHANDILYA, R. et al. Nanotechnology in reproductive medicine: Opportunities for clinical translation. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 47, n. 4, p. 245–262, 2020.
- SHARMA, Yashasvi; SHARMA, Mona. Biophysics of cryopreservation. **International Journal of Thermodynamics**, v. 25, n. 1, p. 17-27, 2022.
- SINGH, S. et al. Evaluation of linolenic acid supplementation in extender for freezability and fertility of Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 89, n. 2, p. 145-151, 2019.
- SINGH, V. K.; KUMAR, R.; ATREJA, S. K. Cryo-survival, cryo-capacitation and oxidative stress assessment of buffalo spermatozoa cryopreserved in new soya milk extender. **Livestock Science**, v. 160, n. 1, p. 214–218, 2014.
- SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. Spirulina–From growth to nutritional product: A review. **Trends in food science & technology**, v. 69, p. 157-171, 2017.
- SOUSA, Cesar Romero Soares et al. Nanotecnologia e nanociênciA: considerações histórica e interdisciplinaR. **Hegemonia**, n. 25, p. 28-28, 2018.
- STEINWAND, M. A.; RONALD, P. C. Crop biotechnology and the future of food. **Nature Food**, v. 1, n. 5, p. 273-283, 2020.
- SUN, L. et al. Beneficial influence of soybean lecithin nanoparticles on rooster frozen–thawed semen quality and fertility. **Animals**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2021.

TARSO, S. G. DA S. DE; LORENA, M. H. A. DE. Caprinocultura como estratégia de preservação ambiental: como caprinos podem passar de ameaça à desertificação para agentes de recuperação ambiental no semiárido. **Revista Brasileira de Buiatria - RBB**, v. 4, n. 2, p. 28–51, 2022.

VERMULM, R. A Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior. Instituto de Estudos para o Desenvolvimento Industrial, Julho 2004.

VIDAL, A. H. et al. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 1, p. 47–51, jan. 2013.

YÁNEZ-ORTIZ, I. et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106904, 2022.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47–64, 1 jan. 2016.

YONG, J. W. H. et al. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera L.*) water. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5144-5164, 2009.

ZAMIRI, M. J. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. **Journal of Livestock Science and Technologies**, v. 8, n. 1, 2020.

ZEITOUN, M. M. et al. Spirulina supplementation to the semen extender influences the quality and antioxidant parameters of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104108, 2022.

ZEITOUN, M. M. et al. Spirulina supplementation to the semen extender influences the quality and antioxidant parameters of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104108, 2022.

**Capítulo I**  
**Produção, extração e caracterização**

## Composição química e atividade antioxidante do extrato etanólico de *Spirulina platensis* e seu potencial para a utilização na criopreservação de espermatozoides

### Introdução

A *Spirulina platensis* (SP), conhecida também por *Arthrosira platensis*, é uma microalga simbótica, sendo composta por um corpo filamentoso formado por uma única célula ou multicelular, apresentando uma forma espiral e coloração verde azulada. Ela tem uma grande importância, sendo estudada e utilizada nas áreas da saúde e pecuária por conter um alto valor nutricional e potenciais propriedades terapêuticas e do meio ambiente por apresentar um uso potencial na remoção de poluentes (Kumar *et al.*, 2022; Ai *et al.*, 2023; Eydi; Yari; Bonyadi, 2024).

Essa cianobactéria é classificada como segura para consumo pela *Food and Drug Administration* (FDA) e o comitê de especialistas em informações sobre suplementos alimentares (DSI-EC). Ela cresce naturalmente em regiões tropicais e subtropicais com ambiente alcalino e com alto teor de sal. Para a sua produção, as microalgas não necessitam de terras ou cuidados extras, quando comparado aos alimentos cultivados, além de ter um alto rendimento de biomassa por reator.

O grande interesse em torno desta microalga se dá pela composição de proteínas, que pode chegar a 70% do peso seco, além de sua composição de aminoácidos, ácidos graxos (ácido oleico, ácido linoleico, ácido gama-linolênico, ácido docosahexaenoico (DHA), sulfolipídios, glicolipídios, ômega-3 e ômega-6), vitaminas (pró-vitamina A, vitamina E, vitamina K e várias vitaminas do complexo B, principalmente B12), polissacarídeos e pigmentos que conferem coloração e ação antioxidante (Ramírez-Rodrigues *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2022; El-Shall *et al.*, 2023).

Existem muitos estudos acerca da utilização da microalga na dieta de animais ou de extratos e bioativos da *Spirulina* na criopreservação de espermatozoides de animais ou humanos, seja congelação ou refrigeração, ou em etapas específicas do processo. A depender da concentração utilizada do

extrato, observa-se uma melhora nos parâmetros espermáticos devido a uma possível ação dos componentes presentes nesses extratos, atuando tanto na proteção ou ajuste da membrana plasmática, melhora na motilidade, suporte energético ou ação contra espécies reativas de oxigênio (EROs). Ou seja, a principal função desses extratos é de suporte, como agentes crioprotetores, implementados para melhorar a qualidade das células após a criopreservação. (Ros-Santaella; Pintus, 2021).

Apesar do processo de criopreservação ser realizado de forma eficaz, considerando a espécie bovina, que mantém as células espermáticas viáveis após a mudança de temperatura, essa biotécnica ainda gera danos com a mudança de temperatura, conhecida como crioinjúrias. Essas lesões celulares estão relacionadas à formação de cristais de gelo intra ou extracelular, mudanças na composição da membrana plasmática, estresse osmótico ou espécies reativas do oxigênio (ERO). Além disso, algumas espécies de animais apresentam células espermáticas com menor tolerância à criopreservação (Hungerford; Bakos; Aitken, 2022; Ozimic; Ban-Frangez; Stimpfel, 2023).

Em suma, a escolha do extrato estará diretamente relacionada com sua composição e a necessidade de proteção para a célula específica a ser submetida a criopreservação. Com isso, devido a forma de produção e composição presente na *Spirulina*, que acarreta o interesse em sua utilização das mais variadas formas e fins em indústrias farmacêuticas, nutracêuticas e alimentícias, faz-se necessário estudos da caracterização do extrato da *Spirulina platensis* para observar o seu potencial na criopreservação de células espermáticas.

## **Material e Métodos**

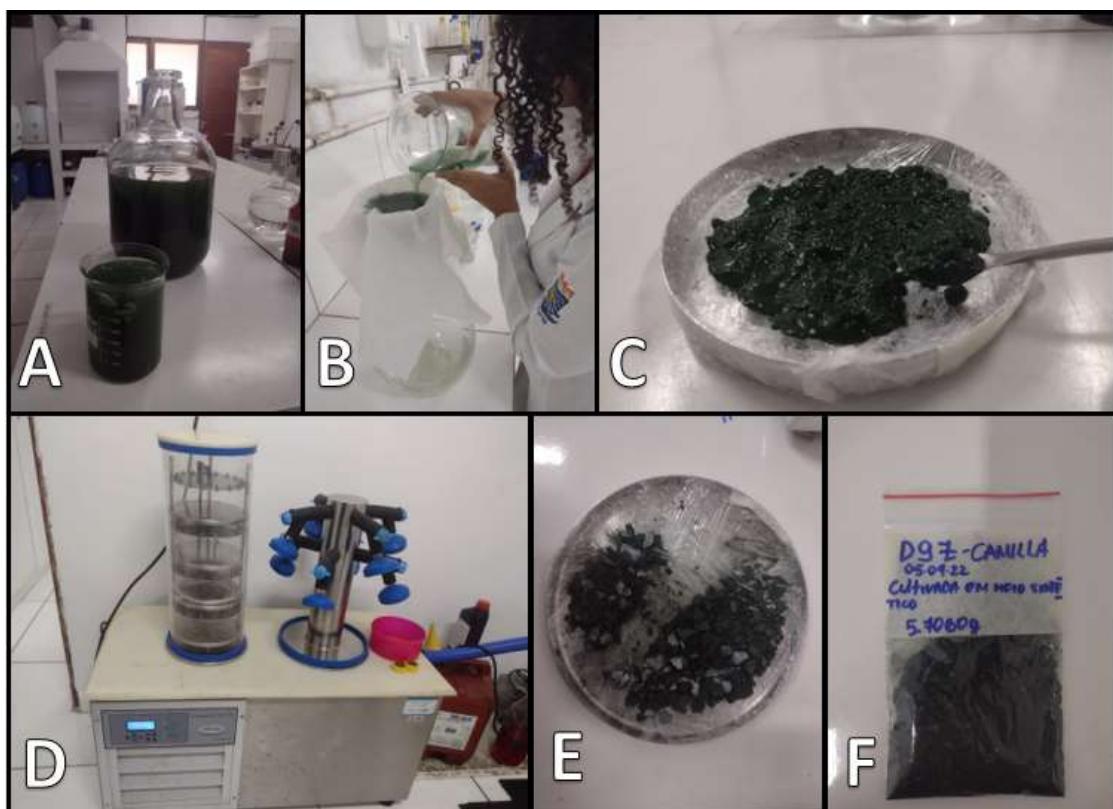
### **Produção do Diluidor**

#### **Obtenção da microalga *Spirulina platensis***

As microalgas *Spirulina platensis* (D9Z) foram obtidas no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas - LARBIM/CCEN/UFPB.

Inicialmente, para a produção da biomassa, as células foram colocadas para crescer em balão volumétrico de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura sintético Zarrouk (Zarrouk, 1966; Apêndice A) e mantidos em câmara de cultura a 25 °C com sistema de iluminação por lâmpadas fluorescentes e fotoperíodo ajustado para 12 horas. O crescimento foi acompanhado até que o meio chegassem a fase estacionária, não mostrando mais crescimento celular.

**Figura 1. Etapas da produção de biomassa de *Spirulina platensis* (D9Z)**



Posteriormente, esse concentrado foi vertido em balão de seis litros (Figura 1A) contendo cinco litros do meio de cultura e colocado na câmara de crescimento até chegar a fase estacionária. Com isso, o meio foi filtrado (Figura 1B) em malha de poliamida de 20 micras de abertura, obtendo-se um filtrado pastoso (Figura 1C).

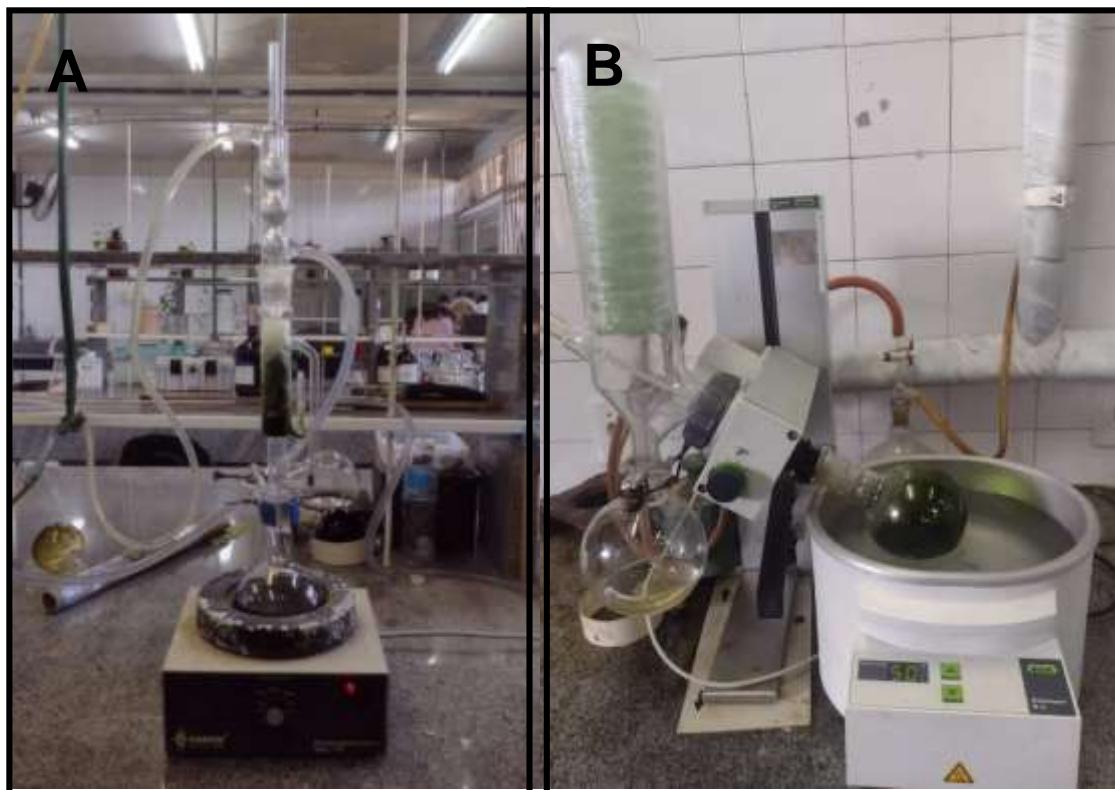
Essa biomassa foi armazenada congelada em *ultrafreezer* (-30° C) e em seguida liofilizada (Figura 1D; E), pesada e acondicionada em sacos plásticos identificados (Figura 1F) até sua utilização.

### Produção do extrato da *Spirulina platensis*

Após a obtenção, elas foram separadas para obtenção do extrato etanólico na proporção 1:20 de Spirulina:Etanol (15 g de SP e 300 mL de etanol) e submetida a extração pelo método Soxlet (Figura 2A) com o auxílio de filtro de papel por 2 horas e 30 minutos nas temperaturas de 50 °C.

Posteriormente os balões com os extratos foram colocados em um rotaevaporador para evaporação dos extractores (Figura 2B).

**Figura 2. Extração por Soxlet (A) e evaporação dos extractores (B)**



### Caracterização

#### Teor de Fenólicos Totais (TPC)

O estudo do conteúdo dos compostos fenólicos totais de cada extrato foi realizado no Laboratório de Análise Físico-Química (CTDR/UFPB) e seguiu o método descrito por Slinkard e Singleton (1977), com modificações. Uma alíquota de 300 µL de cada extrato foi transferida para tubo de ensaio, em seguida adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%, e homogeneizar em agitador de tubos e descansar dois minutos. Posteriormente foram adicionados 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%), agitada e incubada por 15 minutos em

banho-maria resguardada da luz. As leituras das absorbâncias das amostras foram medidas a 760 nm. O ácido gálico é usado para realização da curva padrão (0,001-0,020 mg/mL em etanol) e os resultados são expressos em equivalente ao ácido gálico (mg EAG/g extrato).

### **Atividade Antioxidante**

As análises de atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Análise Físico-Química (CTDR/UFPB).

#### *Atividade de Eliminação de Radicais Livres do DPPH*

A atividade de eliminação de radicais livres dos extratos foi determinada com base no método DPPH (Rufino *et al.*, 2007a), com modificações. Uma alíquota de 30 µL de cada extrato foi misturada a 3 mL da solução de DPPH<sup>•</sup>, agitada e incubada durante 30 min ao abrigo da luz, e a absorbância medida a 515 nm. A curva padrão foi realizada com Trolox (50-2000 µmol/L em etanol) e os resultados foram expressos em µmol equivalente Trolox (TE)/g extrato.

#### *FRAP – Poder Antioxidante Redutor Férrico*

A capacidade antioxidante de redução do ferro foi determinada pelo método FRAP (Rufino *et al.*, 2006), com adaptações. Sob condições de ausência da luz, foi preparado o reagente FRAP através da combinação de solução tampão acetato (300 mmol/L), solução de 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (10 mmol/L) diluído em HCl (40 mmol/L) e solução aquosa de FeCl<sub>3</sub> (20 mmol/L). Em seguida, uma alíquota de 90 µL de cada extrato foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 270 µL de água ultrapura e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi então agitada e mantida no banho maria durante 30 min a 37 °C, resfriados até a temperatura ambiente e lidos a 595 nm. A curva padrão foi construída com Trolox e os resultados foram expressos em µmol equivalente ao Trolox (ET)/g extrato.

#### *Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre ABTS\**

Essa determinação da atividade antioxidante se baseia na capacidade de diferentes substâncias de eliminar o cátion radical 2, 2'-azino-bis

(etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS.+)) (Rufino *et al.*, 2007b). O cátion radical foi preparado misturando 7 mM de solução estoque de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio e deixando a mistura por 4-16h. O ensaio fotométrico foi realizado adicionando uma alíquota de 30 µL do extrato com 3 mL de radical ABTS, homogeneizados em agitador e incubados por seis minutos. Em seguida, foi realizada a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm e a curva padrão foi construída com Trolox e os resultados foram expressos em µmol equivalente ao Trolox (ET)/g extrato.

### **Determinação do teor de açúcares redutores**

A determinação dos açúcares redutores foi realizada no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/Cbiotec/UFPB) com o extrato de *Spirulina platensis*, onde utilizou-se o método DNS (ácido 3,5- dinitro salicílico), proposta por Miller (1959), baseado na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Foi realizada uma diluição de 1:1 do extrato de *S. platensis* e água destilada e previamente homogeneizada em um vórtex (Warmnest, Araucária). Posteriormente, metade foi filtrada por uma membrana de esterilização (0,22 µm) e acondicionados em tubos Falcons de 15,0 mL. A curva padrão foi obtida pelo teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de frutose e glicose a 1 g/L. Tomou-se 0,5 mL das soluções e adicionou-se 2,5 mL do reagente DNS, em triplicata. Os tubos foram aquecidos a 100 °C por dez minutos e refrigerados em banho de gelo por cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 3,0 mL de água destilada, homogeneizados e realizada a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION, Kleve) a 540 nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, consequentemente, determinar a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/g amostra). Com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração.

### **Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Para se observar o perfil químico dos grupos funcionais presentes foi

realizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA/UFPB) uma espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com Reflectância Total Atenuada (ATR). Os extratos foram alocados sobre o leitor do espectrômetro modelo Cary 630 (*Agilent*) para a análise. Os dados foram gerados em comprimento de onda de 650 a 4000 cm<sup>-1</sup> através do software *MicroLab* e analisados através do programa *GraphPad Prism*.

### **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz) foram obtidos no LMCA/UFPB em um espectrômetro Bruker ASCEND de 500 MHz (Bruker, Coventry, Reino Unido). Para as aquisições, aproximadamente 8 mg da amostra foram solubilizados em solvente deuterado (MeOD e D<sub>2</sub>O) e os espectros foram referenciados pelo sinal do solvente ( $\delta$ H 3,30 ppm e  $\delta$ C 49 ppm).

### **Perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa (CG)**

A amostra foi derivatizada com sililação com agente sililante BSTFA (N,O-Bistrifluoroacetamida) (Sigma Aldrich). Para a reação de sililação foi preparada uma solução contendo a amostra com 200  $\mu$ L de BSTFA e aguardando por 15 min., a temperatura ambiente até que a reação ocorresse. A amostra derivatizada (10  $\mu$ L) foi diluída em 990  $\mu$ L de n-hexano grau HPLC (Biograde - Bio Scie).

Para a análise da amostra derivatizada foi utilizado um instrumento de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM), modelo SHIMADZU QP2000-PLUS-A, nas seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida, modelo RTX-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25  $\mu$ m de espessura do filme) (Shimadzu, Japão), com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> de hélio como gás de arraste; split 1:50; a temperatura inicial do forno foi de 40 °C por 2 min, mantendo uma rampa de temperatura de 10°C. min<sup>-1</sup> até 100 °C, subindo até 250 °C a 20 °C. min<sup>-1</sup> permanecendo nessa temperatura por 10 min.

As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente. Os compostos voláteis foram identificados por comparação

com os registros da biblioteca computacional disponíveis no software do equipamento, NIST08s.lib e Wiley9.lib.

## Resultados

### Compostos Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante dos Extratos

Foi observada que a extração utilizando o solvente etanólico em Soxlet conseguiu obter quantidades de fenólicos (19,04 mg GAE. g<sup>-1</sup>) e antioxidantes (DPPH: 133,10 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>; FRAP: 143,59 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>; ABTS: 136,02 µmol Trolox. g<sup>-1</sup>), além de açúcares redutores (DNS: 0,25 mg/mL) como observada na tabela 1. Devido à complexidade do extrato, são utilizadas diferentes técnicas de atividades antioxidantes. As diferentes concentrações entre as técnicas se deve às diferentes interações entre os compostos presentes na microalga e os compostos utilizados nas medições da capacidade antioxidante.

**Tabela 1.** Fenólicos totais (TPC), capacidade antioxidante e quantidade de açúcares redutores de extrato etanólico de *Spirulina platensis* por Soxlet.

Extrato	Métodos Antioxidantes			Açúcar redutor	
	TPC (mg GAE. g <sup>-1</sup> )	DPPH (µmol Trolox. g <sup>-1</sup> )	FRAP (µmol Trolox. g <sup>-1</sup> )	ABTS	DNS (mg/mL)
<i>Spirulina platensis</i>	19,04 ± 0,91	133,10 ± 22,91	143,59 ± 11,19	136,02 ± 1,68	0,25 ± 0,06

GAE: Equivalente de Ácido Gálico.

### Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise espectroscópica por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada a fim de identificar grupos funcionais majoritários e inferir os principais grupos de metabólitos presentes no extrato.

O espectro FT-IR do extrato de *S. platensis* apresenta bandas características em regiões atribuídas a grupos funcionais amplamente relatados na literatura para extratos de *Spirulina* (Figura 3). A Tabela 2 apresenta as

principais bandas observadas, suas respectivas atribuições e comparação com dados de referência (Soni *et al.* 2021, Prabakaran *et al.* 2020, Venkatesan *et al.* 2012, Schram; Kroes *et al.*, 1971).

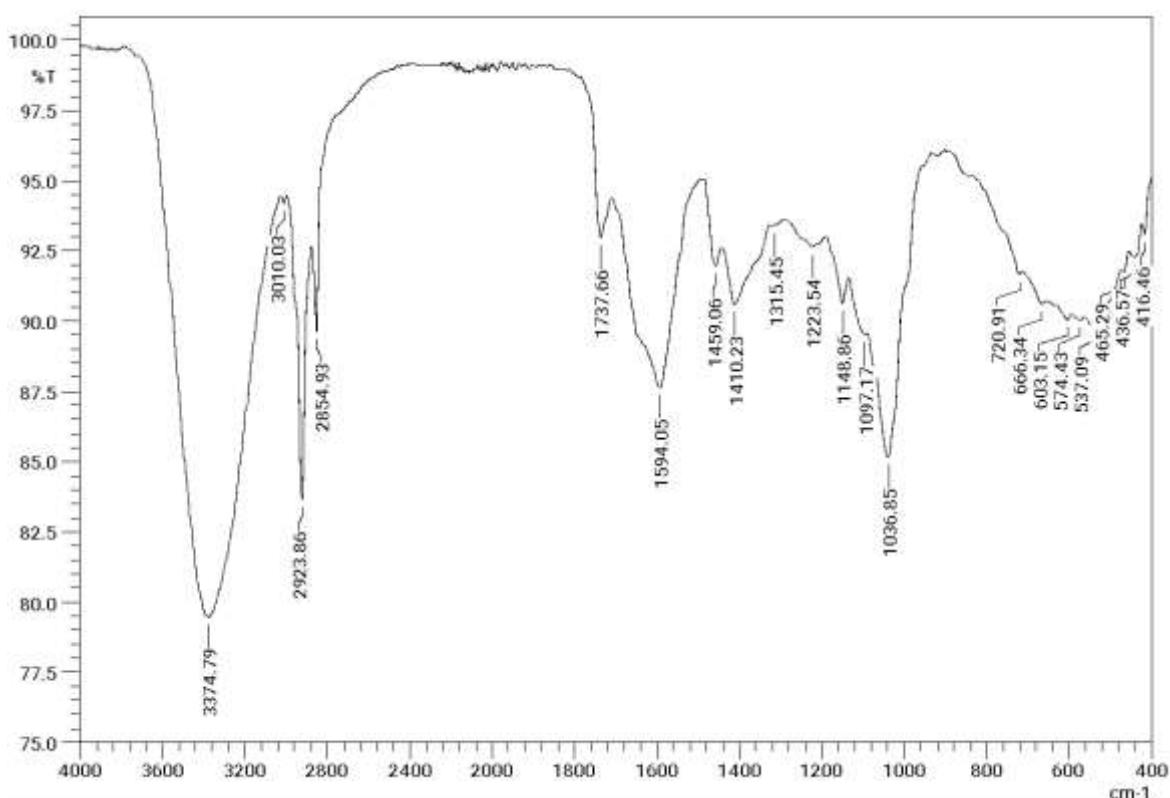
**Tabela 2. Frequências de FTIR e os grupos funcionais atribuídos presentes no extrato metanólico bruto de *Spirulina platensis***

Nº onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição Espectral	Grupo Funcional	Composto provável
<b>3374.79</b>	Estiramento O-H (largo)	Hidroxilas (-OH)	Polissacarídeos, fenóis, aminoácidos
<b>3010.03</b>	Estiramento =C–H	Alcenos aromáticos	/ Ácidos graxos insaturados
<b>2923.86/</b> <b>2854.93</b>	Estiramendos assimétrico e simétrico C–H	–CH <sub>2</sub> , –CH <sub>3</sub>	Cadeias alifáticas de ácidos graxos
<b>1737.66</b>	Estiramento C=O (forte)	Carbonilas	Ésteres, pigmentos carotenóides
<b>1594.05</b>	Estiramento C=C / deformação N–H	Aromáticos amidas	ou Proteínas, ficolipoproteínas
<b>1459.06/</b> <b>1410.23</b>	Deformações C–H e C=C	CH <sub>2</sub> , aromáticos	Lipídios, aminoácidos
<b>1315.45/</b> <b>1222.54</b>	Estiramento C–N ou C–O	Ésteres, aminas, fenóis	Pigmentos, aminoácidos
<b>1148.86/</b> <b>1097.17/</b> <b>1036.85</b>	Estiramento C–O–C e C–O	Polissacarídeos, éteres	Exopolissacarídeos
<b>720.91</b>	CH <sub>2</sub> (cadeias longas)	–(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> –	Ácidos graxos saturados

**600–400** Região de Dobramentos e Pigmentos, clorofila, impressão digital vibrações metais complexas

---

**Figura 3. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do extrato etanólico de *Spirulina platensis***



### Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  indica que o extrato etanólico de *Spirulina platensis* contém uma mistura complexa de metabólitos (Figura 4).

A composição química observada é consistente com a literatura sobre extratos de *Spirulina platensis* (Prabakaran *et al.* 2020), que comumente contém aminoácidos livres e peptídeos curtos (sinais intensos em 2.8–4.5 ppm), carboidratos e polióis (região rica em sinais de 3.2–4.2 ppm), ácidos graxos e lipídeos insaturados (sinais alifáticos de 0.8–2.5 ppm), compostos fenólicos (sinais discretos na faixa aromática entre 6–8 ppm), pigmentos como ficocianina ou  $\beta$ -caroteno (indício de insaturações entre 5–6 ppm e traços aromáticos). As regiões do espectro com seus relativos deslocamentos químicos foram

analisadas e interpretadas e uma tabela elaborada com base nas informações espetrais (Tabela 3).

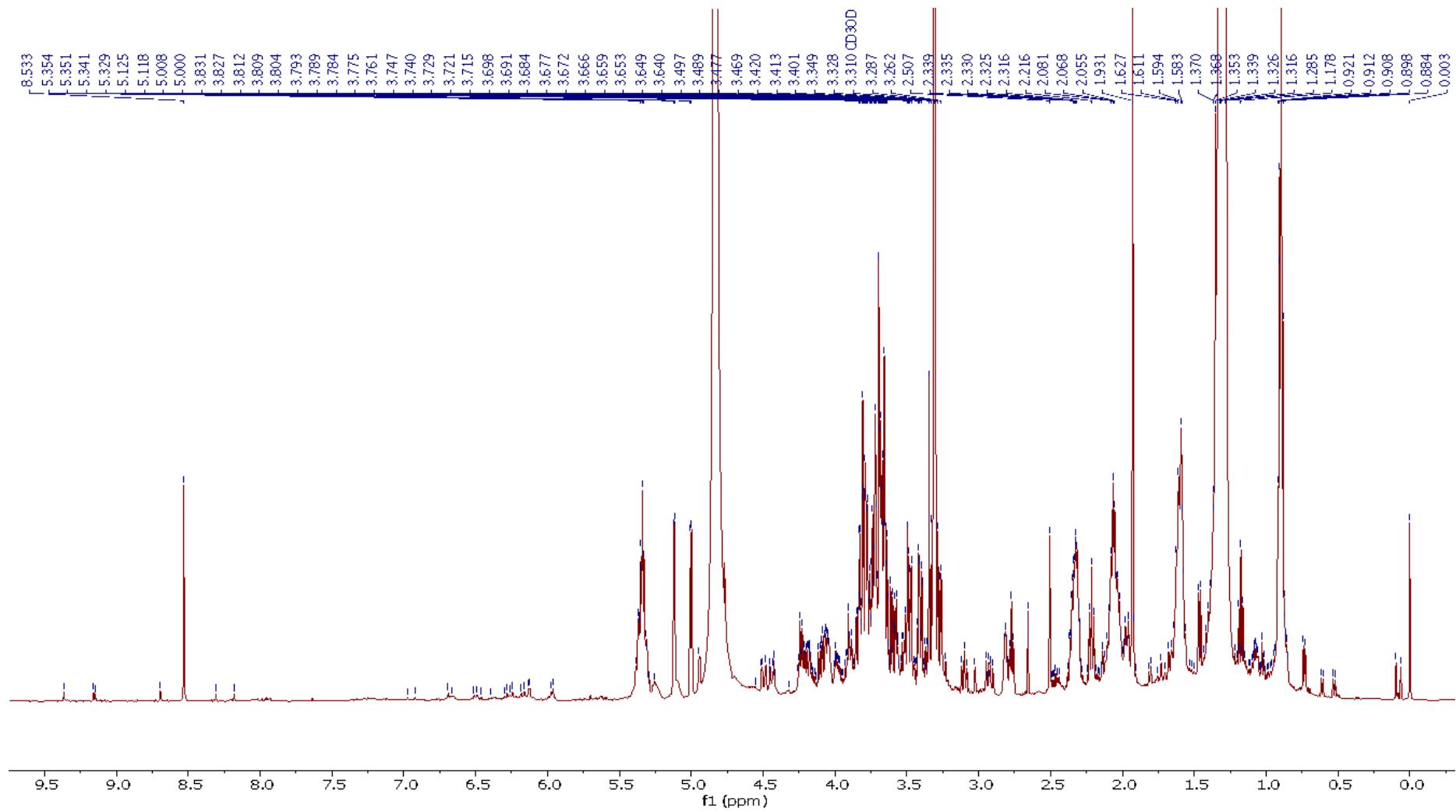
O espectro revela forte presença de aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e sinais aromáticos discretos, compatíveis com um extrato bruto de *Spirulina*. A presença de sinais especialmente em regiões aromáticas e vinílicas, indicam a presença de pigmentos bilínicos (ficocianobilina e ficocianina), sendo necessária sua purificação ou ao menos um rápido fracionamento do extrato para confirmação.

Além disso, como o extrato foi feito em etanol e sem purificação, sinais proteicos podem estar parcialmente trocados ou diluídos e falta de definição clara e sobreposição com aminoácidos e açúcares sugere concentração relativamente baixa de pigmentos e novamente a necessidade de fracionamento.

### **Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)**

Conseguimos observar (figura 5) e identificar (tabela 4) a presença de alguns compostos que conseguiram ser extraídos pelo etanol, como o ácido D-lático (8.372), ácido butanedioico ou ácido succínico (11.214), L-prolina (12.887), pentadecano (13.936), ácido palmitelaídico (15.769), ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (15.856), ácido linolênico (16.621) e o ácido 9-12-octadecadienoico ou ácido linoleico (16.701). Além do nonacosano (19.426), tetracosano (20.145) e triacontano (22.31).

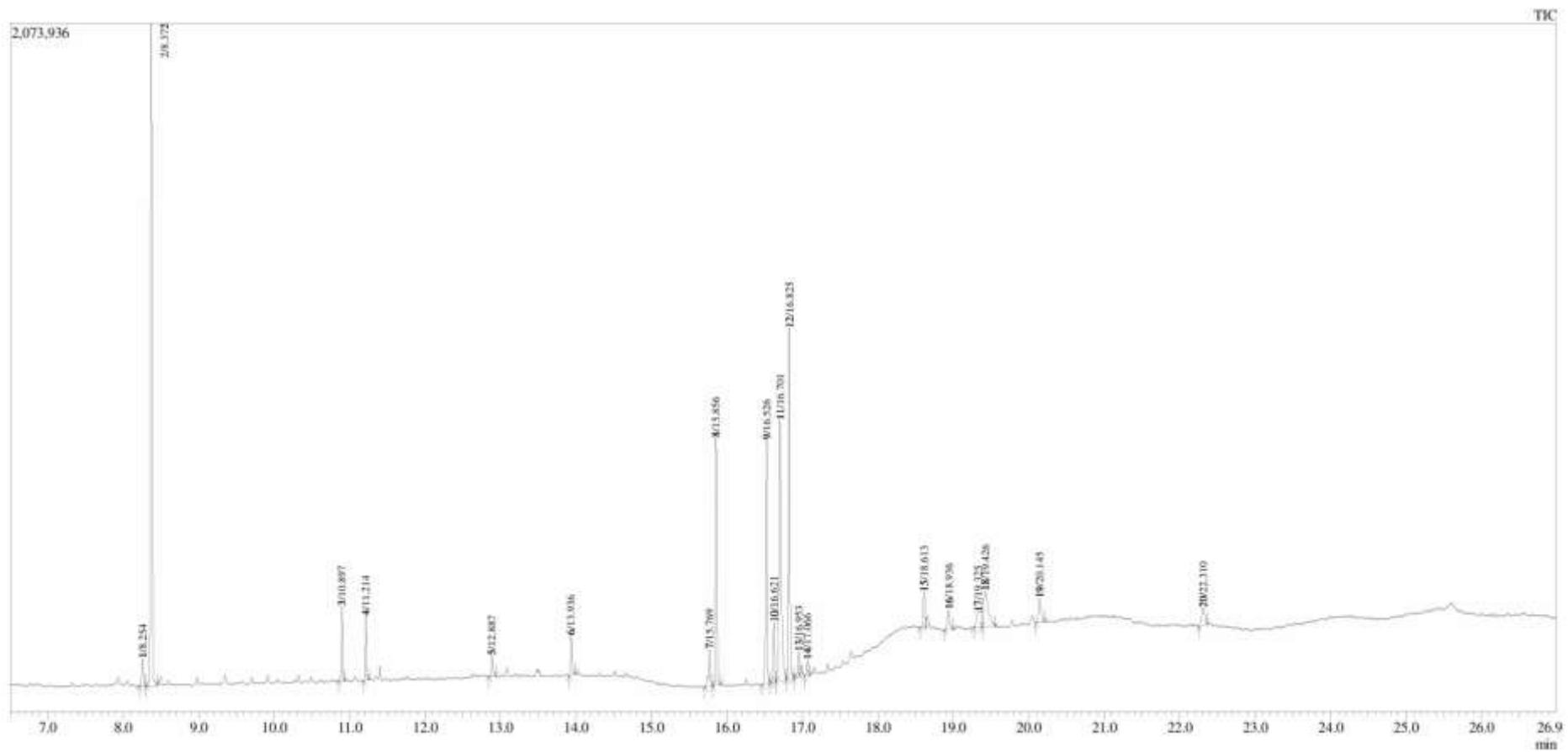
Figura 4. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do extrato etanólico bruto de *Spirulina platensis* (500 MHz, MeOD).



**Tabela 3.** Regiões do espectro de  $^1\text{H}$  RMN com seus relativos deslocamentos químicos (ppm), tipo de próton e possível atribuição

Região (ppm)	Tipo de próton	Possível atribuição
0.5–1.5	$\text{CH}_3$ e $\text{CH}_2$ alifáticos	Lipídios e ácidos graxos. Sobreposição de sinais comum em extratos brutos
1.5–2.5	Prótons $\alpha$ a carbonilas/insaturados	Cadeias lipídicas, aminoácidos
2.5–3.5	Prótons ligados a N ou O	Aminoácidos livres, N- acetilados, açúcares reduzidos. Região importante na comparação com espectro de ficocianina isolada
3.5–4.5	Prótons ligados a carbonos hidroxilados e anoméricos	Polissacarídeos e polióis abundantes em <i>Spirulina</i>
4.6–5.5	Prótons vinílicos (-C=C-) / anoméricos	Insaturações de pigmentos ou hidrogênios de açúcares
6.0–8.0	Prótons aromáticos	Compostos fenólicos, sinais discretos de aminoácidos aromáticos
~9 ppm	Aldeídicos / formil	Possível presença de aldeídos ou grupamentos formil (-CHO)

**Figura 5.** Cromatograma do extrato etanólico (derivatizado) de *Spirulina platensis* obtido na análise por CG-EM



**Tabela 4.** Compostos identificados pela biblioteca do CG-EM no extrato etanólico (derivatizado) de *Spirulina platensis* e comparados com a literatura

Nº do pico	Tempo de retenção (r.t.)	Área (%)	Nome	Referência
1	8.254	1.18	N,N-Diethyl(trimethylsilyl)carbamate	Agente derivatizante
2	8.372	27.3	D-Lactic Acid-DITMS	Werlang et al. 2020
4	11.214	2.2	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	Pratama et al. 2022
5	12.887	0.88	L-Proline, 5-oxo-1-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl	Hegazi et al. 2024
6	13.936	1.53	Pentadecane (CAS)	Hegazi et al. 2024
7	15.769	1.77	Palmitelaidic Acid 1TMS	Hegazi et al. 2024
8	15.856	8.73	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	Hamad et al. 2023
10	16.621	2.18	Linolenic acid, trimethylsilyl ester	Ronda et al. 2008
11	16.701	15.24	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, trimethylsilyl ester	Kata et al 2018
18	19.426	4.77	Nonacosane <n->	Ramasamy et al 2013
19	20.145	1.57	Tetracosane <n->	Ramasamy et al 2013
20	22.31	1.57	Triacontane <n->	Ramasamy et al 2013

## Discussão

A *Spirulina* já é muito comercializada e consumida devido ao seu alto teor de proteínas (50-70%), que superam outras fontes de proteínas, como a soja. Além disso, observa-se em sua composição a presença de lipídeos, majoritariamente por ácidos

graxos essenciais, como ácido linoleico e  $\gamma$ -linolênico, aminoácidos, polissacarídeos, compostos fenólicos e antioxidantes. A presença desses compostos e sua proporção no extrato se devem ao tipo de extração e ao solvente utilizado. Extratos etanólicos costumam concentrar uma grande variedade de compostos. Em relação ao antioxidante, ele consegue obter um maior teor de fenólicos, flavonoides e carotenoides (Stunda-Zujeva *et al.*, 2023; Babashpour-Asl; Eghlima, 2025).

A utilização da *Spirulina* ou de algum de seus bioativos está relacionada a vários estudos devido a sua rica composição. Na reprodução, pesquisas envolvendo a suplementação desta microalga na dieta de algumas espécies de animais, como carneiros (Assar *et al.*, 2023), coelhos (El-Ratel; Gabr, 2020) e ratos (Biswas, 2025) mostraram uma relação positiva da ingestão da microalga com alguns parâmetros seminais, como o aumento do volume do sêmen, concentração celular, quantidade de células vivas, além de diminuir a proporção de células anormais e a peroxidação lipídica no plasma seminal.

Na criopreservação, a *Spirulina* vem sendo utilizada com o intuito de melhorar a congelandabilidade das células espermáticas. Espécies como búfalos (Badr *et al.*, 2021), ovinos (Leugoué *et al.*, 2022; Moula *et al.*, 2024; Rahim *et al.*, 2024), equinos (Zeitoun *et al.*, 2022), bovinos (Mizera; Kuczaj; Szul; 2019; Su *et al.*, 2025) e caninos (Gaikwad *et al.*, 2023) obtiveram resultados positivos com a suplementação dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de *Spirulina* ou de seus bioativos para a criopreservação, a depender da espécie.

Nossos resultados de RMN mostraram a complexidade do extrato etanólico da *Spirulina platensis*, com picos que remetem a alguns constituintes importantes e que conseguem auxiliar as células espermáticas na queda da temperatura, como lipídios, ácidos graxos, polissacarídeos, compostos fenólicos e pigmentos que podem promover efeito antioxidante.

Um dos fatores negativos da criopreservação é a desregulação na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em comparação com a capacidade antioxidante presente nas células e no meio. Elas podem gerar danos celulares, inviabilizando as células para a fecundação. Esse estresse oxidativo está relacionado, principalmente, à peroxidação lipídica. O peróxido tende a procurar se equilibrar na membrana, alterando sua conformação e, consequentemente, a função da membrana, comprometendo a motilidade celular, o metabolismo, morfologia e, com isso, o potencial da célula de fertilizar o óvulo (Badr *et al.*, 2021).

Em nossos resultados, obtivemos resultados de teor de fenólicos totais e de atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS. Isso nos mostra que nosso extrato contém compostos que atuam na manutenção da concentração de ERO, podendo reduzir o risco de danos às células.

Badr e colaboradores (2021) observaram, em sêmen de búfalo, que a adição de até 10 µg/mL no diluidor conseguiu promover resultados crescentes de atividade antioxidante total (TAC), superóxido dismutase (SOD) e glutationa redutase (GSH), como também reduziu a peroxidação lipídica. Isso comprova a ação antioxidante presente no extrato da *Spirulina*. Além disso, segundo Leugoué e colaboradores (2022), o extrato de *Spirulina* consegue controlar a quantidade de ERO por conter componentes bioativos que inibem a enzima monoamina oxidase (MAO). As MAO são flavoenzimas que estão localizadas na membrana externa mitocondrial, catalisando a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, produzindo peróxido de hidrogênio, aldeídos e amônia, o que pode provocar uma disfunção mitocondrial, além de se concentrar na matriz e citosol (Deshwal *et al.*, 2017; Leugoué *et al.*, 2022).

Ainda, na região 3.5–4.5 ppm do RMN, pode-se observar picos relacionados a polissacarídeos e polióis. Os polissacarídeos da *Spirulina* são amplamente estudados por conter diversas atividades biológicas importantes, como ação antioxidante.

Su e colaboradores (2025) observaram, em espermatozoides bovino, que a adição de polissacarídeos presentes na *Spirulina* aumentou a sobrevivência, a motilidade, a integridade da membrana, a integridade acrossômica e a integridade da membrana mitocondrial das células, principalmente na concentração de 10 mg/L. Além disso, notaram uma redução nos níveis de ERO dos espermatozoides pós-descongelados, além de um aumento a capacidade antioxidante total (TAC) e nas atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), assim como reduziu o nível de malondialdeído (MDA). Ainda, observaram que não houve diferença entre os níveis de fosforilação das proteínas ATP2B4 (bomba de íons de cálcio) e PKA entre o sêmen fresco e os grupos tratados com os polissacarídeos. Isso sugere que esses compostos podem influenciar as vias de sinalização de AMPc e as vias de sinalização relacionadas ao cálcio, afetando as mudanças energéticas da célula durante a criopreservação.

Outra região presente no RMN são as que podem ser relacionadas à presença de pigmentos bilínicos. Estes, devido às propriedades bioativas, são visadas pelas indústrias cosmética, farmacêutica e nutracêutica. Dentre estas, a ficocianina se

destaca por ser uma ficobiliproteína solúvel em água (PBP), de coloração azul. Ela tem grande importância por conta da sua multifuncionalidade, como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores, além de se destacar por não exercer efeito citotóxico (Usai *et al.*, 2024; Arslan *et al.*, 2025).

Rahim e colaboradores (2024) testaram a C-ficocianina purificada em sêmen de ovino refrigerado e observaram que a concentração de 2,4 µg/mL de ficocianina conseguiu atenuar os efeitos deletérios causados pela queda de temperatura. Esse resultado se deve pela atividade da ficocianina de eliminar vários tipos de radicais livres, como radicais alcoxi, hidroxila e peroxila. Além do controle desses radicais livres, ele também consegue reduzir a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) como dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), peroxinitrito (ONOO<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO), suprimir a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Por fim, ela também consegue controlar ativação de enzimas relacionadas com atividade antioxidante, como a SOD, GPx, glutationa redutase (GR), glutationa-S-transferase (GST) e CAT (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2024).

Além dos antioxidantes, observamos a presença de ácidos graxos no extrato, devido sua relevância para as células espermáticas. Eles estão relacionados com o movimento celular, suporte energético e a capacidade de fertilização do mesmo, como também está diretamente relacionada com a “congelabilidade” dos espermatozoides (Xu *et al.*, 2022).

Em seus estudos, Li e colaboradores (2024) observaram a presença de níveis mais altos de ácido linoleico em espermatozoides frescos em relação aos espermatozoides criopreservados. Observou também a presença de ácido α-linolênico. Esse ácido graxo pode estar relacionado com a produção energia a partir da β-oxidação e como potencial antioxidante ao influenciar no aumento da atividade de algumas enzimas antioxidantes.

Alguns estudos utilizando a adição de ácidos graxos ao meio mostraram resultados positivos. Ejaz e colaboradores (2020) observaram que a adição de 10 ng/mL de ácido linoleico melhorou a motilidade e a integridade de espermatozoides de búfalos após a criopreservação, podendo estar atrelada ao aumento da proporção desses ácidos graxos na membrana do espermatozoide, aumentando a fluidez da mesma.

Fadl e colaboradores (2022) notaram o efeito antioxidante do ácido linolênico na concentração de 50 µmol em espermatozoides de coelho, melhorando parâmetros,

como motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, além de redução de células anormais. Ainda, observaram o aumento de atividade antioxidante da SOD, GSH e CAT e, consequentemente, a redução de MDA. Singh e colaboradores (2019) também observaram melhora nos parâmetros espermáticos e na fertilidade *in vivo* de espermatozoide de búfalo com 5 ng/mL de ácido linolênico acrescido no diluidor.

Em um estudo para observar o papel energético dos ácidos oleico e palmítico em espermatozoides de javali, Zhu e colaboradores (2020) relataram melhora nos parâmetros de motilidade espermática, integridade da membrana e a integridade acrossomal, além da diminuição da apoptose. Ainda, observaram que houve uma diminuição da concentração dos ácidos graxos após 3, 5 e 7 dias de armazenamento. Essa diminuição pode ser explicada pela redução de glicose presente no meio. Isso faz com que as células troquem a via metabólica energética da glicólise para a fosforilação oxidativa mitocondrial. Tal mudança metabólica pode contribuir para o aumento da duração da motilidade linear (Zhu *et al.*, 2019). Isso reforça a utilização e importância desses ácidos graxos no metabolismo energético para produção ATP das células espermáticas.

Contudo, apesar dos resultados positivos acerca da utilização do extrato da *Spirulina platensis* ou de seus componentes, deve-se atentar a concentração a qual se utiliza e a espécie de estudo. Os trabalhos de Mizera, Kuczaj e Szul (2019), Badr e colaboradores (2021) e Su e colaboradores (2025) observaram que os resultados são dose dependente, além de estar ligada a espécie, pois há diferenças estruturais e na composição dos componentes, como a composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides das espécies (Ejaz *et al.*, 2025). Assim, as altas concentrações geraram o efeito contrário, diminuindo a viabilidade espermática e outros parâmetros.

## Conclusão

O extrato etanólico da *Spirulina platensis* é complexo, com a presença de picos representando a presença de possíveis aminoácidos livres e peptídeos curtos, carboidratos e polióis, ácidos graxos e lipídeos insaturados, compostos fenólicos, pigmentos como ficocianina ou β-caroteno. Além de observar a atividade.

Os compostos com atividade antioxidante podem auxiliar durante a queda de temperatura, ao proteger as células das ERO e favorecer a atividade de enzimas antioxidantes. Ainda, a presença de ácidos graxos pode melhorar a fluidez da membrana e auxiliar na atividade antioxidante. Contudo, estabelecer a quantidade para adição ao diluidor de criopreservação é essencial para o efeito antioxidante esperado.

## Referências

- AI, Xiaopeng et al. Polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction methods, structural features and bioactivities diversity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 231, p. 123211, 2023.
- ARSLAN, Nazli Pinar et al. Algal and Fungal Antioxidants Alleviate Oxidative Stress-Induced Reproductive Defects. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 5, p. e70301, 2025.
- ASSAR, D. et al. *Spirulina platensis* algae enhances endogenous antioxidant status, modulates hemato-biochemical parameters, and improves semen quality of growing ram lambs. *Adv Anim Vet Sci*, v. 11, n. 4, p. 595-605, 2023.
- BABASHPOUR-ASL, Marzieh; EGHLIMA, Ghasem. Detection of proximate, phytochemical compositions, phycocyanin and antioxidant activity of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). **Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 178-189, 2025.
- BADR, Magdy et al. *Spirulina platensis* extract addition to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing potentials of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 18, n. 2, p. e20200520, 2021.
- BISWAS, Deepak. Role Of Dietary *Spirulina* in Reproductive Potential in Male Albino Rats. *Journal of Pharmaceutical Research and Integrated Medical Sciences (JPRIMS)*, v. 2, n. 5, p. 28-39, 2025.
- DESHWAL, Soni et al. Emerging role of monoamine oxidase as a therapeutic target for cardiovascular disease. **Current opinion in pharmacology**, v. 33, p. 64-69, 2017.
- EJAZ, R. et al. In vitro supplementation of linoleic acid improves quality of cryopreserved buffalo semen. **Indian Journal of Animal Research**, v. 1, p. 5, 2020.
- EL-RATEL, Ibrahim Talat. Potential impact of *Spirulina* Alga as an antioxidant on improving semen production and oxidative stress in blood and seminal plasma of rabbit bucks. **Egyptian Poultry Science Journal**, v. 40, n. 1, p. 209-224, 2020.
- EL-SHALL, Nahed A. et al. Potential of *Spirulina platensis* as a feed supplement for poultry to enhance growth performance and immune modulation. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1072787, 2023.
- EYDI GABRABAD, Mohaddeseh; YARI, Mohammadreza; BONYADI, Ziaeddin. Using *Spirulina platensis* as a natural biocoagulant for polystyrene removal from aqueous medium: performance, optimization, and modeling. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 2506, 2024.

- FADL, Aya Mohamed; EL-SHAHAT, Khaled Hafez; ABDELNABY, Elshymaa Ahmed. Influence of alpha linolenic acid on the motility, viability, antioxidant activity and fertility of frozen-thawed New Zealand white rabbit buck semen. **World Rabbit Science**, v. 30, n. 3, p. 219-226, 2022.
- FERNÁNDEZ-ROJAS, Berenice et al. C-phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. **Food & function**, v. 5, n. 3, p. 480-490, 2014.
- GAIKWAD, S. M. et al. Effect of Spirulina and Coenzyme Q-10 Addition to Extenders on Canine Spermogram. **Acta Scientific Veterinary Sciences (ISSN: 2582-3183)**, v. 5, n. 8, 2023.
- HAMAD, Gamal M. et al. Volatile compounds, fatty acids constituents, and antimicrobial activity of cultured Spirulina (*Arthrospira fusiformis*) isolated from Lake Mariout in Egypt. **The Scientific World Journal**, v. 2023, n. 1, p. 9919814, 2023.
- HEGAZI, Nesrine et al. A multiplex metabolomic approach for quality control of Spirulina supplement and its allied microalgae (*Amphora* & *Chlorella*) assisted by chemometrics and molecular networking. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 2809, 2024.
- HUNGERFORD, Alena; BAKOS, Hassan W.;AITKEN, Robert John. Sperm cryopreservation: Current status and future developments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 35, n. 3, p. 265-281, 2022.
- KATA, Faris S. et al. Therapeutic effect of the alkaloid extract of the cyanobacterium *Spirulina platensis* on the lipid profile of hypercholesterolemic male rabbits. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 20, p. 19635-19642, 2018.
- KUMAR, Agam et al. Antioxidant and phytonutrient activities of *Spirulina platensis*. **Energy Nexus**, v. 6, p. 100070, 2022.
- LEUGOUÉ, Serge Kameni et al. Spirulina (*Arthrospira platensis*) Extract Promotes Motility, Microscopic, and Antioxidative Parameters of Ram Semen during Refrigerated Storage. **Black Sea Journal of Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 481-490.
- LI, Chunyan et al. Revisiting the injury mechanism of goat sperm caused by the cryopreservation process from a perspective of sperm metabolite profiles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 16, p. 9112, 2024.
- MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-429, 1959.
- MIZERA, Alicja; KUCZAJ, Marian; SZUL, Anna. Impact of the *Spirulina maxima* extract addition to semen extender on bovine sperm quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 601-607, 2019.
- MOULA, Anass et al. Enhancing cryopreserved ram sperm quality at- 80° C with *Spirulina platensis* and *Salvia verbenaca* extracts. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 72, n. 2, p. 125-132, 2024.

- OZIMIC, Sanja; BAN-FRANGEZ, Helena; STIMPFEL, Martin. Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 6, p. 4716-4734, 2023.
- PRABAKARAN, Gopal et al. Extraction and characterization of phycocyanin from Spirulina platensis and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. **International journal of biological macromolecules**, v. 153, p. 256-263, 2020.
- PRATAMA, Adriyanus Ivan et al. Umami compounds present in umami fraction of acid-hydrolyzed Spirulina (Spirulina platensis). **Algal Research**, v. 66, p. 102764, 2022.
- RAHIM, Abdellatif et al. Effect of C-phycocyanin purified from Spirulina platensis on cooled ram semen quality and in vivo fertility. **Theriogenology**, v. 215, p. 234-240, 2024.
- RAMASAMY, Vasanth. Chemical composition of Spirulina by gas chromatography coupled with mass spectrophotometer (GC-MS). **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 3, n. 3, 2014.
- RAMÍREZ-RODRIGUES, Milena M. et al. Spirulina platensis protein as sustainable ingredient for nutritional food products development. **Sustainability**, v. 13, n. 12, p. 6849, 2021.
- RONDA, Srinivasa Reddy; LELE, S. S. Culture Conditions stimulating high  $\gamma$ -Linolenic Acid accumulation by Spirulina platensis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 693-697, 2008.
- ROS-SANTAELLA, José Luis; PINTUS, Eliana. Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 772, 2021.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Comunicado Técnico, v. 128, 2007b.
- RUFINO, M. S. M. et al. Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)–Metodologia científica. **EMBRAPA**. p. 1679-6535, 2006.
- RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical DPPH. **Embrapa**. Comunicado Técnico, v. 128, 2007a.
- SCHRAM, Bernard L.; KROES, Hanno H. Structure of phycocyanobilin. **European Journal of Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 581-594, 1971.
- SLINKARD, Karen; SINGLETON, Vernon L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American journal of enology and viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.
- SONI, Ruma; SUDHAKAR, K.; RANA, R. Biochemical and thermal analysis of spirulina biomass through FTIR, TGA, CHN. **Energy Engineering: Journal of the Association of Energy Engineers**, v. 118, n. 4, p. 1045, 2021.

STUNDA-ZUJEVA, Agnese et al. Comparison of antioxidant activity in various spirulina containing products and factors affecting it. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4529, 2023.

SU, Guanghua et al. Spirulina polysaccharides improve postthaw sperm quality in bulls by inhibiting the activation of pathways related to protein kinase A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 296, p. 139796, 2025.

USAII, Luca et al. Recent Advancements in Production and Extraction Methods of Phycobiliprotein C-phycocyanin by Arthrospira (Spirulina) platensis: A Mini Review. **Current Microbiology**, v. 81, n. 12, p. 428, 2024.

VENKATESAN, S. et al. Fourier transform infrared (FT-IR) spectoroscopic analysis of Spirulina. **Int. J. Pharm. Biol. Arch**, v. 3, n. 4, p. 969-972, 2012.

WANG, Lu et al. C-phycocyanin improves the developmental potential of cryopreserved human oocytes by minimizing ROS production and cell apoptosis. **Plos one**, v. 19, n. 4, p. e0300538, 2024.

WERLANG, Eliana Betina et al. d-lactate production from Spirulina (Arthrospira platensis) biomass using lactogenic Escherichia coli. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100598, 2020.

XU, Bingbing et al. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, p. 1004683, 2022.

ZEITOUN, Moustafa M. et al. Spirulina supplementation to the semen extender influences the quality and antioxidant parameters of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104108, 2022.

ZHU, Zhendong et al. Exogenous oleic acid and palmitic acid improve boar sperm motility via enhancing mitochondrial  $\beta$ -oxidation for ATP generation. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 591, 2020.

ZHU, Zhendong et al. Gene expression and protein synthesis in mitochondria enhance the duration of high-speed linear motility in boar sperm. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 252, 2019.

## **Capítulo II**

### **Nanoformulações, caracterização e criopreservação das células espermáticas**

## Utilização de nanoformulações para a criopreservação de espermatozoides caprino

### Introdução

A criopreservação de células reprodutivas é uma biotécnica fundamental e que facilita processos relacionados à reprodução assistida, principalmente relacionada a inseminação artificial (IA). Entretanto, essa biotécnica acarreta em danos ocasionados pela redução de temperatura, como o potencial de gerar cristais de gelo, mudanças na osmolaridade do meio, alteração na funcionalidade e na integridade das membranas, além de promover a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem promover danos à membrana celular, citoesqueleto, DNA e mitocôndrias (Khalil *et al.*, 2019; Saadeldin *et al.*, 2020).

Em consideração a isso, a utilização de crioprotetores é indispensável para o sucesso desta biotécnica, uma vez que eles estão relacionados com a maior sobrevivência e a redução de perda de função e qualidade das células após a flutuação da temperatura acarretada pelo processo de criopreservação, pois manter a funcionalidade e a integridade das células espermáticas é de suma importância para que ocorra o processo de fecundação do óvulo (Khalil *et al.*, 2019; Saadeldin *et al.*, 2020).

Esses crioprotetores são classificados como penetrantes e não penetrantes. Dentre os crioprotetores não penetrantes estão presentes a gema de ovo e o leite desnatado. A gema de ovo contém lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que vão interagir com a bicamada lipídica da membrana plasmática do espermatozoide formando uma proteção contra criodanos. Já o leite desnatado contém proteínas, como a caseína que, diferentemente da gema de ovo, reduzem a interação das proteínas do plasma, envolvendo-as, com a célula espermática, reduzindo a perda de lipídios da membrana plasmática durante a criopreservação (Akhtar *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2022).

Contudo, devido a variabilidade na composição e a prospecção de contaminação acarretada pela gema do ovo e o leite desnatado, pesquisas buscam alternativas para substituir componentes presentes nesses crioprotetores que diminuam esses obstáculos, tornando-os mais seguros, sem comprometer a qualidade das células após a criopreservação. Diante disso, estudos utilizando lecitina de soja foram desenvolvidas como um uso potencial às LDL, sem modificar o

mecanismo de ação destas, devido a presença da fração fosfolipídica composta por, principalmente, fosfatidilcolina, além da presença de ácidos graxos (Mousavi *et al.*, 2019; Akhtar *et al.*, 2022).

Apesar do potencial crioprotetor do LDL, outros compostos, como extratos ou bioativos presente nela, são adicionados aos estudos a fim de potencializar o sucesso da criopreservação. A incorporação desses componentes ao diluidor está relacionado com a alta capacidade antioxidante, auxiliando na redução dos efeitos deletérios ocasionados pelo estresse oxidativo, bem como o potencial antimicrobiano e/ou antifúngico presentes nos compostos naturais. A *Spirulina platensis* é muito utilizada em diversas áreas devido a sua rica composição, principalmente formado por proteínas. Para a criopreservação, a principal característica encontrada nessa microalga é a presença de um pigmento azul encontrado em cianobactérias com alto potencial antioxidante, a ficocianina. Além disso, existem outros componentes presentes nesta microalga que podem auxiliar no suporte energético, aumentar a atividade de diversas enzimas antioxidantes e conter efeito microbiano (Ros-Santaella; Pintus, 2021; Abdel-Moneim *et al.*, 2022; Ai *et al.*, 2023).

Atrelado a isso, a nanotecnologia vem sendo utilizada nas pesquisas para formulação de diluidores para a criopreservação, pois a diminuição da partícula acarreta numa maior interação com a célula devido a proporcionar uma maior absorção, reatividade, área de superfície e biodisponibilidade de ativos funcionais, além de poder controlar a carga de superfície e propriedades de ligação e conter propriedades antioxidantes. Com isso, essas características são interessantes pois permite uma melhor interação ou revestimento entre as nanopartículas e os espermatozoides. Ademais, a junção de componentes, como a adição de extratos, vem complementando esses diluidores em razão a presença de outros compostos bioativos, como antioxidantes e açúcares, que contribuem na viabilidade das células durante a criopreservação (Mousavi *et al.*, 2019; Nadri *et al.*, 2019; Saadeldin *et al.*, 2020).

Diante disso, o objetivo do trabalho é elaborar nanoformulações para serem utilizadas na criopreservação, a fim de avaliar o potencial crioprotetor da fosfatidilcolina (Lipoid S-100) e do extrato da *Spirulina platensis* em células espermáticas caprina.

## Material e métodos

### Formulação das nanoemulsões

Foram realizadas, no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (Biotecfarm/UFPB), formulações com o extrato etanólico para teste nas células espermáticas, como observado na tabela 1, e submetidas ao Sonicador Ultrassônico utilizando uma sonda média com amplitude de 70% por 15 m. Por fim, todas as amostras foram avaliadas quanto ao tamanho, zeta e índice de polidispersão (PDI).

**Tabela 1.** Nanoformulações para os diluidores de criopreservação de sêmen caprino

Formulação	Fosfatidilcolina g (%)	Extrato mg/mL	MCT g (%)	Polaxamer g (%)	Tris mL
<b>MC</b>	0,200 (2)	-----	-----	-----	9,80
<b>NE1</b>	0,100 (1)	0,050	-----	-----	9,90
<b>NE2</b>	0,100 (1)	-----	0,100 (1)	-----	9,80
<b>NE3</b>	0,100 (1)	0,050	0,100 (1)	-----	9,80
<b>NE4</b>	0,100 (1)	0,050	-----	0,100 (1)	9,90
<b>NE5</b>	0,100 (1)	-----	0,100 (1)	0,100 (1)	9,70
<b>NE6</b>	0,100 (1)	0,050	0,100 (1)	0,100 (1)	9,70

MC: micela; NE: nanoemulsão

### Tamanho de partícula hidrodinâmica

O diâmetro médio hidrodinâmico e a distribuição de tamanho das dispersões das nanopartículas foram determinados por espalhamento de luz quase-elástico usando um *Zetasizer Nano ZS90* (*Malvern Instruments Ltd*, Orsay, França). O ângulo de espalhamento foi fixado em 90° e a temperatura em 25 °C. Antes da análise, as amostras foram diluídas 1:100 em água Milli-Q®. As medições foram realizadas em triplicatas e o resultado obtido é dado pela média em nanômetro (nm) (Xavier-Junior *et al.*, 2018).

### Potencial Zeta

O potencial Zeta das nanopartículas foi obtido a partir da determinação da mobilidade eletroforética por *Eletroforese Laser Doppler* no *Zetasizer Nano ZS90* (*Malvern Instruments Ltd*, Orsay, França). Antes da análise, as amostras foram

diluídas 1:100 com NaCl a 1 mmol/L. As medições foram realizadas em triplicatas e o resultado é dado pela média (Xavier-Junior *et al.*, 2018).

### **Delineamento Experimental para Congelação Espermática**

O experimento foi desenvolvido em parceria com os laboratórios de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/CBiotec/UFPB), Laboratório de Reprodução Animal (LARA/CCHSA/UFPB) e o Laboratório de Andrologia (ANDROLAB/Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE/Recife).

### **Colheita seminal**

Foram utilizados quatro reprodutores caprinos (dois da raça Saanen e dois da raça Pardo Alpina) saudáveis para as colheitas de sêmen no LARA/CCHSA/UFPB. As colheitas foram realizadas com o auxílio de uma vagina artificial e uma fêmea como manequim (Figura 1) e efetuadas de duas a três vezes por semana, com intervalo de 72 horas entre as colheitas, totalizando seis colheitas ( $n=6$ ) por animal.

**Figura 1.** Coleta dos ejaculados



Fonte: autora.

### **Sêmen fresco**

O sêmen fresco passou por análises macroscópicas e microscópicas para aprovação dos ejaculados, segundo o Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (turbilhonamento  $\geq 3$ ; motilidade  $\geq 70\%$ ; CBRA, 2013).

### Diluidor de congelação do sêmen

O diluidor foi preparado a partir de uma junção entre as nanoformulações, citados na tabela 1.

**GC:** 95% MC + 5% glicerol

**G1:** 47,5% MC + 47,5% NE1 + 5% glicerol

**G2:** 47,5% MC + 47,5% NE2 + 5% glicerol

**G3:** 47,5% MC + 47,5% NE3 + 5% glicerol

**G4:** 47,5% MC + 47,5% NE4 + 5% glicerol

**G5:** 47,5% MC + 47,5% NE5 + 5% glicerol

**G6:** 47,5% MC + 47,5% NE6 + 5% glicerol

Após as análises, os ejaculados aprovados foram agrupados para formação de um *pool* das amostras dos reprodutores, divididas em sete alíquotas com o mesmo volume, sem prévia centrifugação, para posterior diluição nas nanoformulações.

Quatro palhetas de 0,25 mL foram congeladas para cada grupo experimental na dose inseminante de  $50 \times 10^6$  espermatozoides por palheta, seguindo a norma do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Por fim, as palhetas foram submetidas à curva de refrigeração na geladeira. As palhetas foram colocadas em sacolas plásticas e, posteriormente, submergidas em água em recipiente plástico. A queda da temperatura foi acompanhada, com o auxílio de um termômetro digital com sensor externo, por duas horas, até atingir 5 °C. Em seguida, manteve-se as palhetas por mais uma hora, obtendo-se um total de três horas de curva de refrigeração.

Passado o tempo da refrigeração, as palhetas foram retiradas da geladeira e estabelecidas de forma horizontal em uma caixa térmica de isopor contendo nitrogênio líquido ( $N_2$ ) a uma distância de 5 cm da lâmina de  $N_2$  durante 15 minutos. Após este tempo, as palhetas foram imersas no  $N_2$  (-196 °C) e, por fim, acondicionadas em racks identificadas e estocadas no botijão de nitrogênio líquido para posterior descongelação e avaliação.

### Osmolaridade

A análise das nanoformulações utilizadas para criopreservação foram

realizadas no ANDROLAB/UFRPE através do osmômetro de pressão de vapor (modelo 5600, Wescor, Logan, UT, U.S.A.). Foram colocados 10 microlitros de cada diluidor em uma membrana semipermeável e realizada a leitura em milímoles por quilograma (mOsmol/kg).

### **Teste de viscosidade (Ensaio reológico)**

As viscosidades das nanoformulações utilizadas para criopreservação foram determinadas no Laboratório de Petróleo (LaPet/UFPB) através do reômetro (Brookfield LVDVIII Ultra, São Paulo), localizado no Laboratório de Petróleo do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Campus I. Quinhentos microlitros da amostra foram colocados no recipiente do reômetro e submetidos a um torque suficiente para manter a rotação do *spindle* CP52 imerso na amostra nas temperaturas 5 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C. Foram obtidos 30 pontos de cada amostra e realizada a média da viscosidade dada em centipoise (cP). Este estudo foi realizado para verificar a viscosidade das diferentes nanoformulações em função da variação de temperatura.

### **Microbiológico**

O microbiológico foi elaborado no Laboratório de Análise Físico-Química (CTDR/UFPB).

### **Microrganismos**

Foram utilizadas as cepas padrões de bactérias *Bacillus cereus* CCT 098, *Salmonella* spp 565, *Enterococcus faecalis* NewPro 0012, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Candida albicans* NewPro 0031, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR/ UFPB), no qual as análises foram desenvolvidas.

### **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *Spirulina platensis* e nanoformulações para criopreservação**

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado com base nos métodos de referência para testes de microdiluição em caldo para bactérias (M7-A6) (NCCLS, 2003) e levedura (M27-A2) (NCCLS, 2002), com adaptações.

Os microrganismos foram semeados em tubos contendo 5 mL de caldo BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm, a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 500 µL de solução NaCl (0,85%) e ajustadas para a escala McFarland em nível 0,5 (OD 630 nm a 0,10, correspondente a  $3 \times 10^8$  UFC/mL) para bactérias e nível 4 (OD 630 nm a 0,8, correspondente a  $12 \times 10^8$  UFC/mL) para *C. albicans*.

A montagem da placa de 96 poços para a microdiluição foi realizada adicionando alíquotas de 50 µL de caldo Muller Hinton (Kasvi) em todos os poços da placa. Foram adicionados 50 µL de extrato vegetal (0,025 mg/mL) ou nanoformulação com concentração de 0,025 mg/mL do extrato até a coluna 9. As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas como controles: a coluna 10, não contendo extrato, foi utilizada como controle positivo; a coluna 11, contendo somente meio de cultura e solução NaCl (0,85%) foi utilizada como controle negativo; e a coluna 12 como controle antimicrobiano, onde foram depositadas alíquotas de 50 µL de antibiótico amoxicilina (500 mg/mL) ou fluconazol (100 mg/mL).

Foram adicionadas alíquotas de 10 µL das suspensões microbianas testes nos poços das colunas 1 a 10 e 12, em triplicata para cada extrato avaliado. As placas foram vedadas com paraffilme e incubadas a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica.

Foram feitas leituras de absorbância a 630 nm com leitor de microplaca Elisa (Berthold 960, Alemanha). Posteriormente, adicionou-se alíquotas de 10 µL de resazurina a 0,1% em todos os poços da placa, que foi incubada novamente em estufa bacteriológica por três horas. Verificou-se mudança, ou não, de coloração de azul para rosa, indicando o crescimento de microrganismos.

### **Confirmação da atividade bactericida ou bacteriostática**

Para confirmar se houve efeito bactericida ou bacteriostático, homogeneizou-se o líquido nos poços sem indicativo de crescimento microbiano e alíquotas de 10 µL foram diluídas a ( $10^{-6}$ ), inoculadas em ágar Muller Hinton e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Foi observado o crescimento ou não dos microrganismos avaliados e colônias visíveis foram contadas e expressas em log UFC/mL.

## Avaliação pós-descongelação

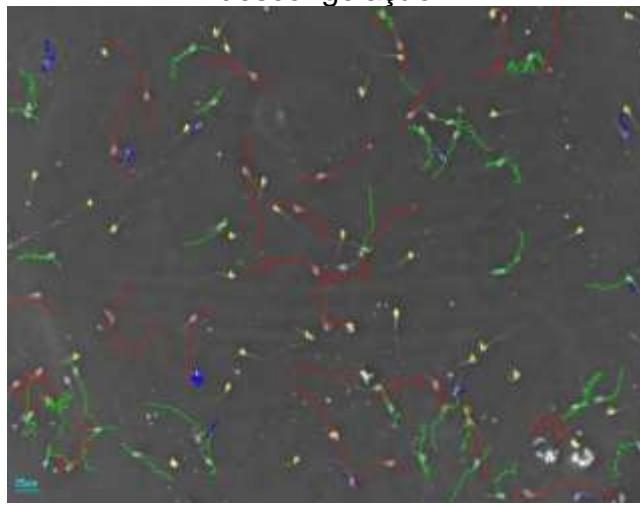
As avaliações pós-descongelação foram realizadas no ANDROLAB/UFRPE.

## Avaliação dos parâmetros cinéticos

A cinética espermática foi analisada através do sistema computadorizado de análise espermática (Sperm Class Analyzer - SCA™ software, Microptics, v. 5.1, S.L., Barcelona, Espanha). Uma alíquota (5 µL) 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 TM H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie™ A312FC, Ahrensburg, Alemanha). Para cada amostra foram analisados cinco campos (Figura 2), selecionados aleatoriamente.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilinear (VCL; µm/s), velocidade em linha reta (VSL; µm/s), velocidade média do percurso (VAP; µm/s), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %), amplitude lateral da cabeça espermática (ALH, µm) e batimento cruzado flagelar (BCF, Hz).

**Figura 2.** Campo de avaliação da motilidade espermática de sêmen caprino pós-descongelação



Fonte: imagem gerada pelo CASA com a amostra da autora.

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 µm<sup>2</sup>; VAP: lentos 10 µ/s < médios 45 µ/s < rápidos 90 µm/s; progressividade, 75% STR, 50% LIN (Verstegen; Iguer-Ouada; Onclin, 2002).

### Avaliação da integridade da membrana plasmática (iMP)

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática utilizou-se 5 µL de Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; 0,46 mg/mL em DMSO) e 5 µL de Iodeto de Propídio (IP; 0,5 mg/mL em PBS). As sondas foram adicionadas em cada amostra, contendo 10 µL, e incubados por sete minutos, a 37 °C sob agitação e ao abrigo de luz (Araújo Silva *et al.*, 2019).

Após o tempo de reação, as amostras foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência utilizando filtros de excitação DBP 485/520 nm e filtro de emissão de 580–630 nm. Os espermatozoides com fluorescência verde indicam membrana intacta e os que com fluorescência vermelha são considerados como membrana danificada (Figura 3).

**Figura 3.** Integridade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos pós-descongelação



Fonte: imagem gerada pelo microscópio de fluorescência com a amostra da autora.

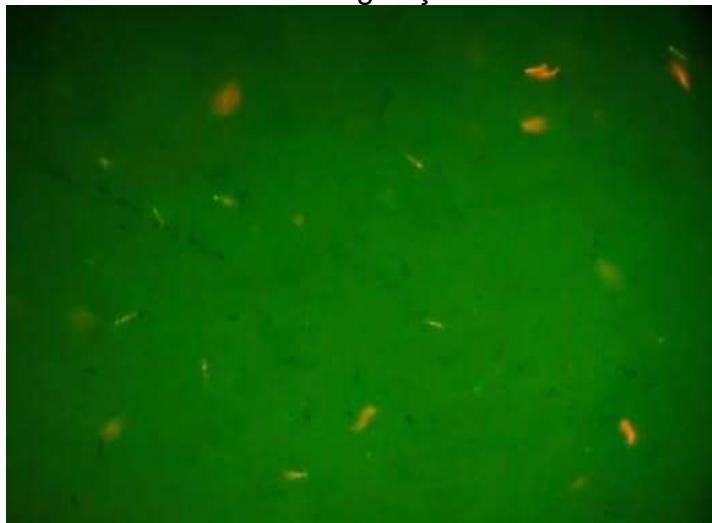
### Avaliação do potencial da membrana mitocondrial (PMM)

Para a avaliação do potencial da membrana mitocondrial utilizou-se 5 µL de iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1; 153 µM). As sondas foram adicionadas em cada amostra, contendo 10 µL, e incubados por sete minutos, a 37 °C sob agitação e ao abrigo de luz (Araújo Silva *et al.*, 2019).

Após o tempo de reação, as amostras foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência utilizando filtros de excitação DBP 485/520 nm e filtro de emissão de 580–630 nm (Figura 4). As células coradas em laranja foram classificadas com alto

potencial de membrana mitocondrial (formação de dímeros J agregados, 590 nm) enquanto as coradas em verde são classificadas com baixo potencial (monômeros a 530 nm).

**Figura 4.** Potencial da membrana mitocondrial de espermatozoides caprinos pós-descongelação



Fonte: imagem gerada pelo microscópio de fluorescência com a amostra da autora.

### Análise estatística

Para os dados estatísticos foi utilizado o pacote PAST (Paleontological Statistics, Versão 4.0, Oslo, Noruega). Os dados foram submetidos inicialmente ao teste Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos dados. Para comparação entre tratamentos utilizou-se ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Todos os testes foram realizados com nível de 5% de significância. Os dados foram expressos na forma de média e desvio-padrão.

## Resultados

### Tamanho de partícula hidrodinâmica, PDI e potencial zeta das nanoemulsões teste

Na tabela 2 podemos observar os dados para tamanho das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta. A micela (MC) conseguiu obter um tamanho de 211,6 nm, enquanto as nanoemulsões tiveram uma média entre 172,0 nm (NE6) e 211,8 nm (NE2).

A micela apresentou também um PDI de 0,3960, enquanto as nanoemulsões variaram entre 0,1687 (NE3) e 0,4123 (NE4). No zeta, as partículas apresentaram

majoritariamente o potencial elétrico negativo, variando entre -10,12 mV (NE6) e -17,89 mV (NE1), enquanto a micela obteve -16,13 mV.

**Tabela 2.** Valores (média ± desvio padrão) do tamanho de partícula hidrodinâmica, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes nanoformulações com lecitina, MCT e extrato de *Spirulina platensis*

Grupos	Tamanho nanômetro (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)	Potencial Zeta milivolts (mV)
<b>MC</b>	211,6 ± 3,05 A	0,3960 ± 0,02 A	-16,13 ± 0,32 ABC
<b>NE1</b>	198,9 ± 6,50 B	0,3422 ± 0,02 AD	-17,89 ± 0,36 AC
<b>NE2</b>	211,8 ± 2,65 A	0,2307 ± 0,01 B	-12,81 ± 0,49 BCD
<b>NE3</b>	209,8 ± 4,86 AB	0,1687 ± 0,01 C	-13,86 ± 0,18 C
<b>NE4</b>	204,1 ± 5,25 AB	0,4123 ± 0,02 A	-13,19 ± 0,87 BCD
<b>NE5</b>	179,9 ± 0,17 C	0,3153 ± 0,04 D	-11,33 ± 0,54 D
<b>NE6</b>	172,0 ± 1,21 AB	0,3382 ± 0,01 D	-10,12 ± 0,23 D

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos.

### Osmolaridade das nanoformulações

Foram observados (tabela 3) valores que variam de 1034 (G1) a 1137 (G6). Os valores dos grupos com a presença de pluronic foram ligeiramente maiores do que os demais grupos sem o pluronic (G1, G2 e G3) e o grupo controle.

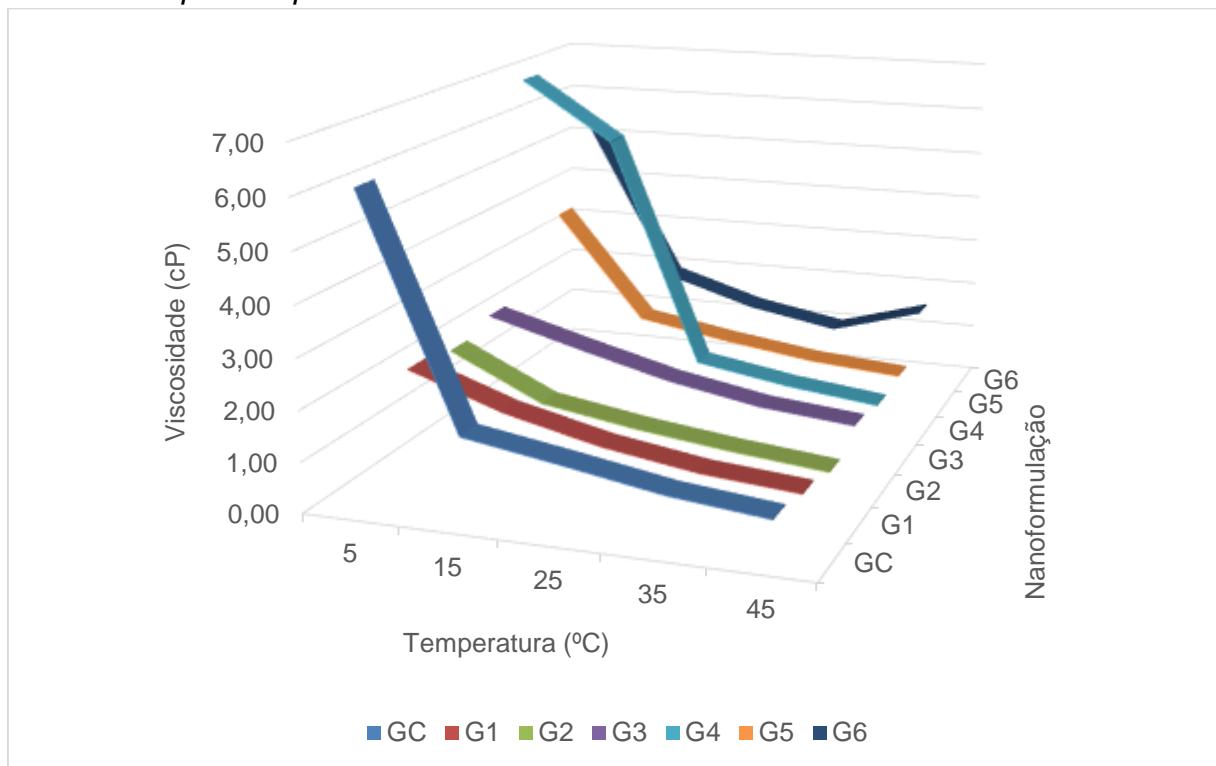
**Tabela 3.** Valores da osmolaridade (mOsmol/kg) das nanoformulações com lecitina, MCT e extrato de *Spirulina platensis*

Osmolaridade (mOsmol/kg)						
GC	G1	G2	G3	G4	G5	G6
1053	1034	1104	1049	1063	1129	1137

### Viscosidade das nanoformulações

Quando analisamos os dados do reômetro (Gráfico 1), observamos um aumento da viscosidade com a queda da temperatura nos grupos com a presença de polaxamer 188 (G4, G5 e G6) de forma mais proeminente em comparação com os grupos sem o polaxamer (G1, G2 e G3). Esse aumento também foi observado no grupo apenas com a fosfatidilcolina (GC).

**Gráfico 1.** Valores da viscosidade (cP) das nanoformulações com lecitina, MCT e extrato de *Spirulina platensis*

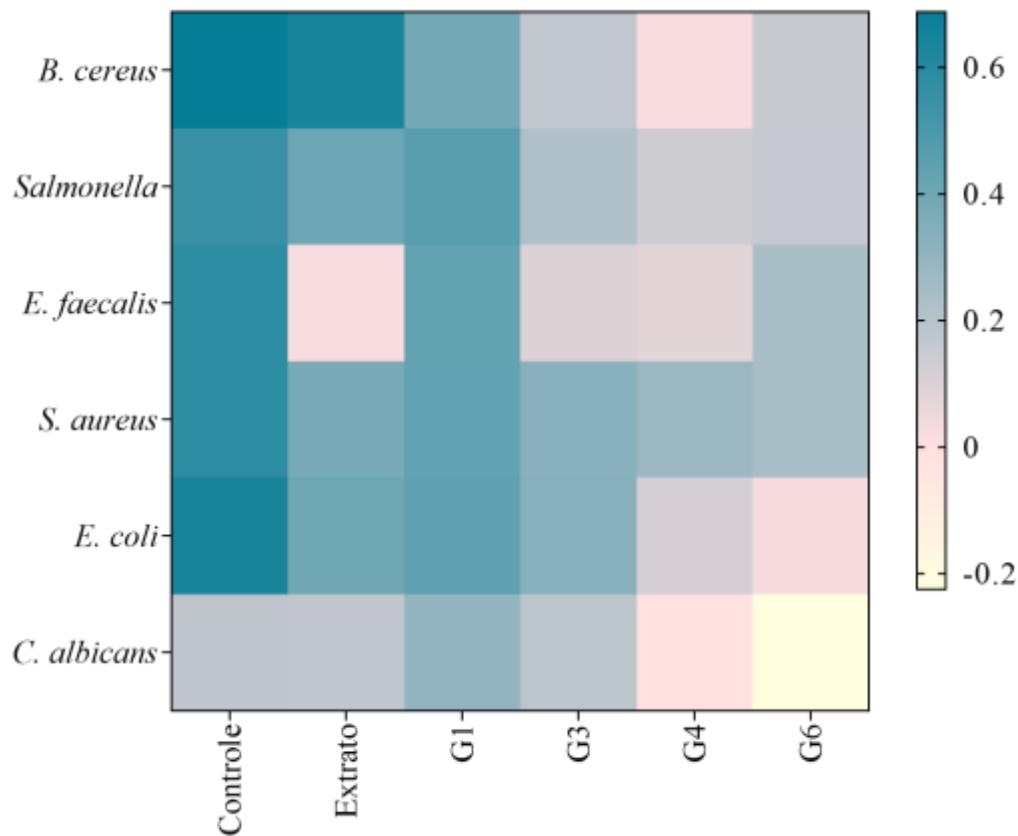


### Atividade microbiana do extrato e das nanoformulações

O extrato inibiu o crescimento de *C. albicans*, sem formação de colônias visíveis em placas após incubação, o que sugere um efeito antifúngico para esse extrato. Além disso, para *E. faecalis*, apesar de não apresentar indicativo de atividade metabólica, e apresentar redução no crescimento, observou-se desenvolvimento microbiano após contagem em placas (~7,5 log UFC/mL). desta forma, é possível que o extrato apresente efeito bacteriostático sobre essa bactéria.

O grupo G1 conseguiu inibir o crescimento de *B. cereus* (ausência de colônias visíveis após cultivo em placas). Para *C. albicans*, apesar da baixa atividade metabólica indicada pela resazurina (redução mínima da coloração), observou-se o crescimento de ~8,39 log UFC/mL.

**Figura 5.** Mapa de calor da atividade antimicrobiana de nanoformulações e extrato de *Spirulina platensis* frente a diferentes microrganismos patogênicos, com base em leituras de absorbância



No G3, apesar da baixa absorbância observada, o teste com resazurina indicou presença de microrganismos metabolicamente ativos (mudança de coloração do indicador).

O G4 inibiu o crescimento de *B. cereus* e *C. albicans*, corroborando as baixas leituras de absorbância. Para *Salmonella*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*, apesar das baixas leituras de absorbância, a resazurina e a contagem de placas confirmaram crescimento microbiano (~8 log UFC/mL).

Por fim, o G6 conseguiu inibir o crescimento de *C. albicans*, sem indicativos de atividade metabólica ou crescimento em placa. Para os demais microrganismos, verificou-se atividade e crescimento variando entre 8 a 9 log UFC/mL (*B. cereus* e *Salmonella*, respectivamente).

De modo geral, a análise de absorbância indicou que a maioria dos tratamentos promoveu, em algum grau, a inibição do crescimento microbiano. Dessa forma, a utilização do ensaio com resazurina mostrou-se fundamental para a detecção de microrganismos metabolicamente ativos, evidenciada pela alteração da coloração do indicador (de azul para rosa ou incolor). Adicionalmente, as contagens em placa foram essenciais para a distinção entre os efeitos bactericidas/fungicidas ou

bacteriostáticos/fungistáticos, permitindo uma avaliação mais abrangente da eficácia dos tratamentos.

### Motilidade Total e Progressiva

Na motilidade total (Tabela 4), observamos que o G5 foi significativamente ( $p<0,05$ ) menor que os demais grupos avaliados no momento 0h, entretanto, após duas horas o G5 só diferiu ( $p<0,05$ ) dos grupos GC e G1.

Já na motilidade progressiva (tabela 4), foi observada que os grupos G5 e G6 diferiram significativamente ( $p<0,05$ ) dos grupos GC, G1, G2, G3 e G4. Contudo, após duas horas, não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre eles.

Ao avaliar entre os tempos, nota-se uma redução significativa na motilidade total após duas horas nos grupos G3 e G6, não observada nos demais grupos. Entretanto, essa queda na motilidade progressiva ( $p<0,05$ ) só foi observada no grupo G3.

**Tabela 4.** Valores (média  $\pm$  desvio padrão) da motilidade total e progressiva dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

Grupos	Motilidade Total (%)		Motilidade Progressiva (%)	
	0h	2h	0h	2h
Tempos				
<b>GC</b>	$35,8 \pm 9,5^A$	$23,6 \pm 21,1^A$	$9,1 \pm 6,4^A$	$3,9 \pm 4,5^A$
<b>G1</b>	$37,2 \pm 14,3^A$	$21,1 \pm 16,7^A$	$9,6 \pm 6,1^A$	$3,1 \pm 4,1^A$
<b>G2</b>	$29,2 \pm 15,7^A$	$14,9 \pm 12,2^{AB}$	$7,6 \pm 7,1^A$	$2,9 \pm 3,7^A$
<b>G3</b>	$32,3 \pm 8,0^{Aa}$	$14,6 \pm 8,8^{ABb}$	$8,2 \pm 3,7^{Aa}$	$2,4 \pm 2,4^{Ab}$
<b>G4</b>	$33,9 \pm 14,4^A$	$16,2 \pm 15,8^{AB}$	$8,1 \pm 5,9^A$	$3,4 \pm 4,8^A$
<b>G5</b>	$3,3 \pm 4,3^B$	$1,0 \pm 1,8^B$	$0,3 \pm 0,5^B$	$0,0 \pm 0,0^A$
<b>G6</b>	$22,8 \pm 10,5^{Aa}$	$4,9 \pm 5,1^{ABb}$	$5,4 \pm 3,7^{AB}$	$0,1 \pm 0,1^A$

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

### Cinética espermática

Nos resultados de cinética espermática, obtivemos resultados significativos ( $P<0,05$ ) com relação ao tempo para VCL (Tabela 5), VSL (Tabela 6) e VAP (Tabela 12).

Na velocidade curvilínea (tabela 5), nota-se que houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre o G5 e os grupos GC, G2, G3 e G4 no tempo 0 horas, não sendo observada no tempo duas horas. Em relação aos tempos, apenas o grupo GC diferiu

significativamente ( $p<0,05$ ) do momento pós-congelamento e após duas horas. Os demais grupos não diferiram significativamente ( $p>0,05$ ) entre os tempos.

**Tabela 5.** Valores (média ± desvio padrão) da velocidade curvilínea (VCL) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

Grupos	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	
	0h	2h
Tempos		
<b>GC</b>	71,5 ± 17,5 <sup>Aa</sup>	43,1 ± 24,0 <sup>Ab</sup>
<b>G1</b>	74,9 ± 14,6 <sup>AB</sup>	44,4 ± 26,8 <sup>A</sup>
<b>G2</b>	68,0 ± 13,5 <sup>A</sup>	49,4 ± 25,3 <sup>A</sup>
<b>G3</b>	69,3 ± 13,8 <sup>A</sup>	47,2 ± 26,4 <sup>A</sup>
<b>G4</b>	68,1 ± 22,1 <sup>A</sup>	43,0 ± 25,5 <sup>A</sup>
<b>G5</b>	30,9 ± 29,9 <sup>B</sup>	15,9 ± 27,6 <sup>A</sup>
<b>G6</b>	63,0 ± 20,1 <sup>AB</sup>	23,8 ± 24,7 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

Referente a velocidade linear (tabela 6), foi observada diferença significativa entre o grupo G5 em relação aos grupos GC, G1, G2, G3 e G4 no momento 0 horas. Após duas horas, não obtivemos diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos. Já entre os tempos, observa-se uma queda significativa ( $p<0,05$ ) após duas horas nos grupos GC, G1, G3, G4 e G6.

**Tabela 6.** Valores (média ± desvio padrão) da velocidade linear progressiva (VSL) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

Grupos	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	
	0h	2h
Tempos		
<b>GC</b>	40,7 ± 13,1 <sup>Aa</sup>	19,8 ± 13,9 <sup>Ab</sup>
<b>G1</b>	39,5 ± 14,9 <sup>Aa</sup>	18,7 ± 11,5 <sup>Ab</sup>
<b>G2</b>	33,5 ± 11,1 <sup>A</sup>	20,2 ± 11,8 <sup>A</sup>
<b>G3</b>	35,8 ± 8,0 <sup>Aa</sup>	20,6 ± 10,8 <sup>Ab</sup>
<b>G4</b>	38,5 ± 14,3 <sup>Aa</sup>	21,6 ± 15,6 <sup>A</sup>
<b>G5</b>	12,1 ± 12,6 <sup>B</sup>	5,2 ± 10,2 <sup>A</sup>
<b>G6</b>	29,4 ± 10,8 <sup>ABa</sup>	6,5 ± 7,4 <sup>Ab</sup>

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

Observou-se uma diferença significativa ( $p<0,05$ ) do grupo G5 em relação aos demais grupos pós-descongelamento em relação a velocidade média do trajeto (Tabela 7), o que não foi observado ( $p>0,05$ ) após duas horas incubado. Ao analisar entre os tempos, nota-se uma redução significativa ( $p<0,05$ ) nos grupos GC, G1, G3 e G6.

**Tabela 7.** Valores (média ± desvio padrão) da velocidade média da trajetória (VAP) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>VAP (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>Tempos</b>		
<b>GC</b>	58,7 ± 15,8 <sup>Aa</sup>	30,1 ± 19,3 <sup>Ab</sup>
<b>G1</b>	56,1 ± 17,4 <sup>Aa</sup>	27,0 ± 15,4 <sup>Ab</sup>
<b>G2</b>	48,4 ± 14,1 <sup>A</sup>	29,0 ± 16,0 <sup>A</sup>
<b>G3</b>	51,1 ± 10,9 <sup>Aa</sup>	28,7 ± 15,3 <sup>Ab</sup>
<b>G4</b>	54,1 ± 19,8 <sup>A</sup>	30,7 ± 20,1 <sup>A</sup>
<b>G5</b>	17,1 ± 17,4 <sup>B</sup>	7,6 ± 13,9 <sup>A</sup>
<b>G6</b>	42,0 ± 15,9 <sup>ABa</sup>	10,8 ± 11,0 <sup>Ab</sup>

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

A linearidade (tabela 8), retilinearidade (tabela 14) e o índice de oscilação (tabela 14) também demonstraram resultados significativos ( $p'<0,05$ ).

Após descongelação foi observada diferença significativa ( $p<0,05$ ) na linearidade (tabela 8) entre o grupo G5 e os grupos GC, G1, G2, G3 e G4. Após duas horas, essa diferença foi observada entre o G5 e o GC, G1, G3 e G4. Ao analisar entre os tempos, os grupos GC, G3 e G6 demonstraram uma redução significativa ( $p<0,05$ ) com o passar do tempo.

**Tabela 8.** Valores (média ± desvio padrão) percentuais da linearidade (LIN) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>LIN (%)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>Tempos</b>		
<b>GC</b>	57,1 ± 11,8 <sup>Aa</sup>	36,9 ± 23,6 <sup>Ab</sup>
<b>G1</b>	51,8 ± 11,7 <sup>A</sup>	37,6 ± 20,1 <sup>A</sup>
<b>G2</b>	48,7 ± 9,3 <sup>A</sup>	34,4 ± 18,0 <sup>AB</sup>
<b>G3</b>	52,9 ± 7,4 <sup>Aa</sup>	38,5 ± 18,2 <sup>Ab</sup>
<b>G4</b>	56,4 ± 7,9 <sup>A</sup>	41,4 ± 22,6 <sup>A</sup>
<b>G5</b>	22,2 ± 22,1 <sup>B</sup>	8,9 ± 16,3 <sup>B</sup>
<b>G6</b>	45,6 ± 4,9 <sup>ABa</sup>	15,5 ± 17,1 <sup>ABb</sup>

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

Na retilinearidade (tabela 9) não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos após descongelação, entretanto, após duas horas, o grupo G5 diferiu

significativamente ( $p<0,05$ ) com os grupos G1, G2, G3 e G4. Contudo, apenas o grupo G6 reduziu de forma significativa ( $p<0,05$ ) durante o tempo.

**Tabela 9.** Valores (média ± desvio padrão) percentuais da retilinearidade (STR) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>STR (%)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>Tempos</b>		
<b>GC</b>	$70,2 \pm 13,8^A$	$51,8 \pm 29,7^{AB}$
<b>G1</b>	$70,0 \pm 9,5^A$	$59,3 \pm 27,7^A$
<b>G2</b>	$69,6 \pm 10,4^A$	$58,7 \pm 27,1^A$
<b>G3</b>	$70,8 \pm 9,6^A$	$62,0 \pm 27,7^A$
<b>G4</b>	$72,3 \pm 9,3^A$	$58,2 \pm 28,6^A$
<b>G5</b>	$40,0 \pm 37,5^A$	$18,8 \pm 32,7^B$
<b>G6</b>	$69,9 \pm 4,0^{Aa}$	$32,8 \pm 33,9^{ABb}$

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

Pós-descongelação, a oscilação teve uma diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre o G5 e os demais grupos. Já após duas horas, observa-se uma diferença significativa entre o G5 e o GC, G1, G2, G3 e G4. Além disso, o G6 diferiu apenas do grupo G4. Entre os tempos foi observado que apenas os grupos GC, G2, G3 e G6 reduziram após duas horas.

**Tabela 10.** Valores (média ± desvio padrão) percentuais do índice de oscilação (WOB) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>WOB (%)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>Tempos</b>		
<b>GC</b>	$81,4 \pm 4,6^{Aa}$	$57,3 \pm 29,2^{ACb}$
<b>G1</b>	$73,6 \pm 9,5^A$	$53,5 \pm 25,1^{AC}$
<b>G2</b>	$70,0 \pm 8,0^{Aa}$	$49,8 \pm 24,4^{ACb}$
<b>G3</b>	$74,7 \pm 2,9^{Aa}$	$53,0 \pm 24,3^{ACb}$
<b>G4</b>	$78,2 \pm 6,2^A$	$60,0 \pm 28,2^A$
<b>G5</b>	$31,4 \pm 30,6^B$	$13,2 \pm 23,1^B$
<b>G6</b>	$65,3 \pm 6,1^{Aa}$	$26,0 \pm 24,9^{BCb}$

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

No deslocamento lateral da cabeça (tabela 11) o grupo G5 diferiu significativamente ( $p<0,05$ ) dos demais grupos pós descongelação. Após duas horas,

essa diferença do G5 foi observada apenas entre os grupos G1, G2, G3 e G4. Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os tempos.

**Tabela 11.** Valores (média ± desvio padrão) da amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>ALH (μm)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>GC</b>	$2,2 \pm 0,3^{\text{A}}$	$1,3 \pm 1,1^{\text{AB}}$
<b>G1</b>	$2,6 \pm 0,4^{\text{A}}$	$1,8 \pm 1,7^{\text{A}}$
<b>G2</b>	$2,3 \pm 0,6^{\text{A}}$	$1,7 \pm 1,2^{\text{A}}$
<b>G3</b>	$2,8 \pm 0,3^{\text{A}}$	$1,7 \pm 1,3^{\text{A}}$
<b>G4</b>	$2,3 \pm 0,5^{\text{A}}$	$1,2 \pm 1,0^{\text{A}}$
<b>G5</b>	$0,6 \pm 0,8^{\text{B}}$	$0,0 \pm 0,0^{\text{B}}$
<b>G6</b>	$2,2 \pm 1,0^{\text{A}}$	$0,2 \pm 0,3^{\text{B}}$

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos.

Após a descongelação, o grupo G5 apenas não teve diferença significativa ( $p>0,05$ ) no batimento cruzado flagelar (tabela 12) com o grupo GC. Entretanto, após duas horas, essa diferença ( $p<0,05$ ) só foi observada entre o grupo G5 e os grupos G1, G2 e G3. Com relação entre os tempos, só foi observada uma redução significativa ( $p<0,05$ ) no grupo G6.

**Tabela 12.** Valores (média ± desvio padrão) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) fornecidos pelo sistema CASA dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>BCF (Hz)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>GC</b>	$7,3 \pm 1,4^{\text{AB}}$	$4,7 \pm 4,0^{\text{AB}}$
<b>G1</b>	$9,2 \pm 1,0^{\text{A}}$	$6,0 \pm 5,2^{\text{A}}$
<b>G2</b>	$9,0 \pm 2,8^{\text{A}}$	$7,2 \pm 5,4^{\text{A}}$
<b>G3</b>	$9,6 \pm 0,7^{\text{A}}$	$7,7 \pm 5,3^{\text{A}}$
<b>G4</b>	$8,4 \pm 2,4^{\text{A}}$	$4,7 \pm 4,1^{\text{AB}}$
<b>G5</b>	$2,5 \pm 3,2^{\text{B}}$	$0,0 \pm 0,0^{\text{B}}$
<b>G6</b>	$9,1 \pm 3,6^{\text{Aa}}$	$1,0 \pm 1,7^{\text{Bb}}$

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

### Integridade da Membrana Plasmática

Foram observados resultados significativos no tempo zero horas na tabela de integridade da membrana plasmática (tabela 13) entre o grupo G5 e os grupos GC,

G1, G2, G3 e G4, além do grupo G6 em relação ao G1. A diferença entre os tempos só foi observada no grupo G1.

**Tabela 13.** Valores (média ± desvio padrão) do teste de integridade da membrana plasmática (iMP) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>iMP (%)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>Tempos</b>		
<b>GC</b>	42,1 ± 16,6 <sup>AC</sup>	33,7 ± 13,6 <sup>A</sup>
<b>G1</b>	43,8 ± 11,8 <sup>Aa</sup>	25,5 ± 9,0 <sup>Ab</sup>
<b>G2</b>	34,4 ± 9,8 <sup>AC</sup>	26,1 ± 13,6 <sup>A</sup>
<b>G3</b>	32,7 ± 16,0 <sup>AC</sup>	26,0 ± 16,1 <sup>A</sup>
<b>G4</b>	34,9 ± 13,5 <sup>AC</sup>	25,6 ± 12,6 <sup>A</sup>
<b>G5</b>	5,3 ± 6,6 <sup>B</sup>	2,9 ± 3,8 <sup>B</sup>
<b>G6</b>	21,9 ± 15,6 <sup>BC</sup>	13,4 ± 10,4 <sup>AB</sup>

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

### Potencial da Membrana Mitocondrial

Foram observados resultados significativos ( $p<0,05$ ) no potencial da membrana mitocondrial (Tabela 14) em relação ao grupo G5 e os grupos GC, G1, G2, G3 e G4 pós-descongelação. Já após duas horas, não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre o G5 e G6, entretanto eles diferiram ( $p<0,05$ ) dos demais grupos. A diferença entre os tempos ( $p<0,05$ ) só foi observada no grupo G6.

**Tabela 14.** Valores (média ± desvio padrão) do teste de potencial da membrana mitocondrial (PMM) dos grupos criopreservados com o diluidor de nanolecitina e dos diluidores com diferentes formulações com MCT e extrato de *Spirulina platensis*

<b>Grupos</b>	<b>PMM (%)</b>	
	<b>0h</b>	<b>2h</b>
<b>Tempos</b>		
<b>GC</b>	76,3 ± 14,9 <sup>A</sup>	82,4 ± 12,5 <sup>A</sup>
<b>G1</b>	72,3 ± 24,9 <sup>A</sup>	61,8 ± 35,1 <sup>A</sup>
<b>G2</b>	56,5 ± 39,6 <sup>A</sup>	56,3 ± 41,1 <sup>A</sup>
<b>G3</b>	74,3 ± 37,8 <sup>A</sup>	51,0 ± 41,6 <sup>A</sup>
<b>G4</b>	73,8 ± 15,2 <sup>A</sup>	54,4 ± 29,0 <sup>A</sup>
<b>G5</b>	3,5 ± 8,6 <sup>B</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>B</sup>
<b>G6</b>	47,7 ± 49,9 <sup>ABa</sup>	1,5 ± 2,5 <sup>Bb</sup>

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença entre os tempos do mesmo grupo.

## Discussão

A nanobiotecnologia vem desenvolvendo um avanço e melhora em várias áreas e isso não seria diferente na reprodução animal, onde ela consegue refinar os processos, reduzir fatores que poderiam gerar um resultado negativo, além de potencializar o efeito de componentes utilizados no diluidor (Kumar *et al.*, 2025).

Em nosso trabalho, as formulações variaram de tamanho, PDI e zeta. Os parâmetros recomendados para nanoformulações é conter um tamanho <500 nm, PDI de até 0,3 são aceitáveis e potenciais zeta maiores de +30 mV ou menos de -30 mV são considerados estáveis (Bruxel *et al.*, 2012; Joudeh; Linke, 2022). Apesar de encontrarmos valores de PDI de até 0,4 e potencial zeta <-30 mV, não foi observada agregação ou desestabilização das formulações durante a criopreservação.

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria amplamente estudada, rica em proteínas, ácidos graxos, polissacarídeos, pigmentos e compostos fenólicos. O extrato etanólico favorece a presença de substâncias de diferentes polaridades, desde metabólitos pouco polares até metabólitos mais polares (Do *et al.*, 2014).

Quando observamos a ação desse extrato em microorganismos, bem como de suas nanoformulações, a concentração do extrato foi suficiente para observar efeito microbicida ou microbiostático na concentração utilizada em nosso trabalho. G1 e G3 confirmaram efeito bactericida consistente nos três métodos para *Bacillus cereus*. Tanto o extrato quanto as nanoformulações contribuíram para o efeito bacteriostático da *E. faecalis*. Já o extrato e G6 apresentaram efeito fungicida sob a *C. albicans* confirmado nos três métodos, com G4 mostrando efeito parcial.

Trabalhos com diferentes concentrações do extrato de *Spirulina* foram testadas a fim de observar o efeito dos componentes e da dose implantada. Martelli e colaboradores observaram que 250 mg/mL consegue exercer ação sob *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*. Para *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, doses como 50 mg/mL (Elshouny *et al.*, 2017) foram suficientes para obter efeito. Já a concentração de 1 mg/mL (Pianta *et al.*, 2025) conseguiu ser eficaz contra alguns microrganismos, como *S. aureus* e *C. albicans*.

De acordo com Elshouny e colaboradores (2017), o potencial bioativo com essa atividade pode estar relacionada com compostos que contêm cadeia alifática. Segundo o trabalho, os resultados de UV, IV, RMN de  $^1\text{H}$  e dados do espectrômetro de massas indicaram que a presença do ácido n-hexadecanoico pode ser um dos

ativos. Assim, a presença de lipídeos e ácidos graxos, principalmente os PUFAs, podem ter influenciado os resultados antimicrobianos, pois eles podem estar relacionados com a lise da membrana celular de bactérias, fungos e leveduras, além de conseguirem inibir os sistemas de transporte de elétrons, a produção de ATP e outras enzimas bacterianas e induzem reações peroxidativas, como resultado da oxidação da clorofila e dos ácidos graxos livres (Elshouny *et al.*, 2017; Ilieva *et al.*, 2024).

Esses estudos mostram que a ação antimicrobiana está associada com a concentração dos extratos, deixando os microorganismos mais expostos a alguns componentes, como terpenóis, esteróis, polissacarídeos, dibutenolídeos, peptídeos e proteínas, que atuam reduzindo ou eliminando o crescimento dos mesmos. Esses achados são importantes, pois mostram a atividade de amplo espectro que o extrato de *Spirulina platensis* contém, com potencial de desenvolvimento de novos tratamentos contra patógenos resistentes (Elshouny *et al.*, 2017; Pianta *et al.*, 2025).

Na criopreservação, a *Spirulina* vem sendo utilizada com o intuito de melhorar a congelabilidade das células espermáticas. Espécies como búfalos (Badr *et al.*, 2021), ovinos (Leugoué *et al.*, 2022; Moula *et al.*, 2024; Rahim *et al.*, 2024), equinos (Zeitoun *et al.*, 2022), bovinos (Mizera; Kuczaj; Szul; 2019; Su *et al.*, 2025) e caninos (Gaikwad *et al.*, 2023) obtiveram resultados positivos com a suplementação dos diluidores com diferentes concentrações do extrato de *Spirulina* ou de seus bioativos para a criopreservação, a depender da espécie.

Em nosso trabalho, a utilização do extrato da *Spirulina* não mostrou diferenças significativas nos parâmetros de motilidade entre os grupos GC, G1, G3, G4 e G6, apesar de ser observada uma redução numérica no grupo G6. Essa observação pode estar relacionada com a variação entre as repetições que gerou um desvio entre as criopreservações. Essa variação está atrelada à mudança na temperatura ambiente e a técnica de refrigeração. Apesar de ser uma técnica comumente utilizada por ser de baixo custo, a utilização de geladeira como sistema de refrigeração gera dificuldade de padronização de uma curva de refrigeração, ocasionando a variação dos resultados (Almeida; Marques Junior; Resende, 2023).

Independente disso, a retirada de 50% das micelas e a adição de 50% das nanoemulsões não interferiu negativamente na motilidade total, com relação ao grupo apenas com as micelas de fosfatidilconila. Quando avaliados após duas horas, nota-

se que o grupo G1 foi o mais próximo, numericamente do GC, enquanto os demais grupos obtiveram um decréscimo na motilidade total.

Quando observamos a motilidade progressiva, a cinética espermática, a integridade da membrana plasmática e o potencial mitocondrial, o mesmo resultado se repete. Contudo, apesar de não ter diferença estatística após duas horas, os grupos G5 e G6 foram inferiores em comparação com os demais grupos. Essa particularidade se repete em todos os dados de avaliação das células espermáticas.

Durante o processo de criopreservação, os componentes lipídicos de membrana plasmática tendem a se rearranjar, causando perda na funcionalidade e, consequentemente na homeostase da célula, diminuição da motilidade, como também a morte celular. Um dos principais fosfolipídios encontrados na membrana plasmática do espermatozoide caprino é a fosfatidilcolina. A utilização de fosfatidilcolina para a congelação está relacionada à característica anfipática da molécula, encontrando-se com uma parte polar e apolar. A presença dessa região apolar pode influenciar a sua incorporação na membrana plasmática, aumentando a fluidez da membrana e reduzindo esses criodanos gerados pela queda da temperatura e mantendo os espermatozoides viáveis para a fecundação (Del Valle et al., 2013; Vireque et al., 2016; Xu et al., 2022).

Apesar de promissor a utilização do fosfolipídeo, os diluidores a base de gema de ovo conferem, além de fosfatidilcolina que irá interagir apenas com a membrana plasmática, outros insumos às células que acarretam num melhor desempenho pós-descongelação (Del Valle et al., 2013).

Na criopreservação, a observação de nanopartículas com a adição de extrato de *Spirulina platensis* foi realizada por Hassan e colaboradores (2023). Nesse estudo, eles notaram uma melhora significativa nos parâmetros de motilidade e integridade da membrana plasmática, além de observar diminuição nos danos a cromatina e do MDA e aumento de biomarcadores relacionados à antioxidantes (TAC e SOD), mostrando o efeito protetor da *Spirulina* em sêmen de bovino. Além disso, em estudo com oócito, Roy e colaboradores (2021) observaram que nanopartículas com pectina de *Spirulina platensis* modificada reduz o estresse oxidativo, além de melhorar a capacidade de desenvolvimento deles após partenogênese e transferência nuclear de células somáticas.

Esses estudos nos mostram o potencial da *Spirulina* na reprodução, utilizando a nanotecnologia para favorecer os componentes presentes, melhorando seu efeito

nas células. Isso pode ser observado em nosso estudo, onde conseguimos reduzir a quantidade de fosfatidilcolina com a adição de nanoformulações contendo extrato de *Spirulina*. Com isso, conseguimos obter um resultado semelhante ao encontrado apenas no grupo com maior concentração de fosfatidilcolina.

Ainda, os trabalhos de Mizera, Kuczaj e Szul (2019), Badr e colaboradores (2021) e Su e colaboradores (2025) observaram que os resultados são dose dependente, além de estar ligada a espécie, pois há diferenças estruturais e na composição dos componentes, como a composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides das espécies (Ejaz et al., 2025). Apesar da redução da fosfatidilcolina e de não ser observada diferença estatística, a presença de outros componentes conseguiu manter os mesmos parâmetros, com exceção do grupo G5 0h e 2h e do grupo G6 após 2h. Decerto, uma concentração maior do extrato na nanoemulsão pode proporcionar um efeito superior ao encontrado em nosso trabalho.

Ainda que tenhamos conseguido manter o mesmo parâmetro em alguns grupos, podemos observar uma diferença significativa no grupo contendo a adição do MCT (G5), com exceção da retilinearidade que não foi observada resultado significativo, porém observa-se uma redução numérica em comparação com os outros grupos. Ainda, apesar de não observar diferenças estatísticas, nota-se uma diminuição numérica nos outros grupos contendo o MCT.

O MCT é composto pelos ácidos caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0). Os ácidos graxos saturados presentes no MCT podem ser associados como biomarcadores relacionados à função reprodutiva. Esses triglicerídeos foram encontrados no fluido epididimário de cães e em maior concentração na cauda do epidídimo e podem estar relacionados a atividade energética e proteção das células espermáticas (Angrimani et al., 2017; Mogielnicka-Brzozowska; Cichowska, 2024).

O ácido cáprico foi avaliado por Zang e colaboradores (2025). Inicialmente estes autores observaram a redução da expressão de ácido cáprico após a criopreservação e, concomitantemente, observaram uma alteração no metabolismo energético das células. Com isso, eles testaram a adição de diferentes concentrações dele no diluidor e verificaram um aumento na motilidade espermática com 500 µM de ácido cáprico. Contudo, a concentração de 1000 µM reduziu a motilidade, mostrando que há um efeito benéfico e importante desse ácido graxo, entretanto ela é dose dependente.

Já o ácido caprílico é um ácido graxo saturado monocarboxílico, podendo ser utilizado pela mitocôndria através da  $\beta$ -oxidação, gerando energia celular. Além disso, ele pode ser precursor do ácido alfa-lipoico, sendo um potente antioxidante (Hassan *et al.*, 2022).

Ambos os ácidos carboxílicos são altamente lipossolúveis. Por serem ácidos fracos e conseguirem passar de forma passiva pela membrana podem reduzir o pH citosólico. Para neutralizar o aumento da acidificação citoplasmática, a atividade da H<sup>+</sup>–ATPase é ativada, aumentando a produção de ATP. Seja pela mudança de pH ou pela atividade da H<sup>+</sup>–ATPase, esses ácidos aumentam a fluidez da membrana plasmática. Isso é importante pois, em condições normais, a membrana encontra-se em fase fluida, contudo no processo de criopreservação a fluidez da membrana pode diminuir, alterando as funções da membrana ou causando rompimento celular (Alexandre; Mathieu; Charpentier, 1996; Liu *et al.*, 2003; Ozimic; Ban-Frangez; Stimpfel, 2023; Zang *et al.*, 2025).

Ainda, uma região em que está presente a ATPase é o acrossoma, conhecidas como H<sup>+</sup>–ATPases do tipo vacuolar (V-ATPases). Em espermatozoides maduros, há a presença da isoforma E<sub>1</sub> da subunidade E da V-ATPase, sendo a responsável pela acidificação acrossomal. Como consequência a mudança de pH, ativa canais de Ca<sup>+</sup> dependentes de voltagem gerando o influxo de cálcio e a fusão da membrana acrossônica, liberando enzimas hidrolíticas acrossônicas. Quando isso ocorre de forma prematura, acaba inviabilizando as células espermáticas para fecundação (Sun-Wada *et al.*, 2002; Takei, 2024).

Com isso, a concentração utilizada de MCT pode ter influenciado negativamente nos grupos acrescidos deste óleo, mesmo que em menores proporções, como no G2 e G3, apesar de não se observar uma redução significativa. E isso pode estar relacionado ao aumento da fluidez, além do benéfico para a célula espermática, modificando sua seletividade. Como também, o MCT pode ter influenciado a acidificação do acrossoma, gerando uma capacitação prematura das células.

Como observamos nos dados, o tratamento G5 foi inferior aos outros, até mesmo que o G2, onde a única diferença é a presença do poloxâmer 188 (Pluronic F-68). O Pluronic® é um poloxâmero composto de triblocos de poli(óxido de etileno) (PEO)–poli(óxido de propileno) (PPO)–poli(óxido de etileno) (PEO). O interesse presente na adição desse polaxamer é a formação da estrutura micelar e a

subsequente gelificação, sendo fenômenos dependentes da concentração e/ou temperatura. No caso do poloxâmer 188, ele se apresenta como uma solução aquosa à temperatura ambiente e se altera em uma estrutura micelar, tornando gel com a queda da temperatura (Khaliq *et al.*, 2023). Esse processo de geleificação, com a queda da temperatura, pode ser observado na análise do reômetro, onde notamos uma maior viscosidade com a queda da temperatura.

Estudos como o de Anaya e colaboradores (2014) observam que o aumento da viscosidade conferida se mostrou promissor para as células espermáticas durante a criopreservação, já que conseguiram observar a melhora de parâmetros, como a integridade da membrana plasmática e redução de danos ao acrossoma. Esses resultados positivos são devido a melhor adaptabilidade dos espermatozoides à queda de temperatura, aproveitando melhor os bioativos presentes no meio para reduzir as crioinjúrias, além de controlar a produção de cristais de gelo que podem danificar a membrana plasmática da célula. Já existem componentes presentes no diluidor, como açúcares e glicerol, que têm a capacidade de substituir a molécula de água nos grupos polares, ajudando, assim, na estabilização da membrana plasmática durante o processo de criopreservação e reduzindo a cristalização do meio, além de auxiliar na estabilização da membrana e de moléculas (Sathe, 2021).

O poloxâmer 188 já foi utilizado em estudos para avaliar seu efeito na criopreservação de sêmen de galinha. Mehdipour e colaboradores (2020) conseguiram observar uma melhora nos parâmetros e na fertilização ao utilizar esse poloxâmer, como também conseguiu reduzir a quantidade de glicerol, observando um efeito sinérgico com menores concentrações de glicerol. Najafi e colaboradores (2021) também observaram o efeito protetor do poloxâmer 188 a 1% em junção com 5% de HES, observando melhora nos parâmetros da criopreservação, como também uma melhora acentuada na fertilidade após a IA.

Diante disso, o poloxâmer 188 pode ter favorecido o efeito negativo do MCT na concentração utilizada no trabalho. Como também, uma diminuição desses grupos pode estar relacionada à concentração de glicerol em junção com o poloxâmer 188 que podem ter potencializado o efeito negativo do MCT.

Além disso, os menores tamanhos foram encontrados nos grupos NE5 ( $179,9 \pm 0,17$ ) e NE6 ( $172,0 \pm 1,21$ ), como também mostraram o menor zeta ( $-11,33 \pm 0,54$  e  $-10,12 \pm 0,23$ , respectivamente). Tamanhos menores de partículas podem proporcionar maior contato com as células. Ainda, cargas positivas também

aumentarão a interação das partículas com a membrana celular. Isso indica que esses grupos podem ter potencializado a interação com as células espermáticas, aumentando o efeito dos componentes presentes.

Todavia, o extrato da *Spirulina platensis*, presente no grupo G6, conseguiu reduzir esses efeitos deletérios do MCT observados de forma significativa na motilidade total, WOB, ALH e BCF, e de forma numérica nos demais parâmetros no momento 0h. Isso pode estar relacionado com o poder antioxidante, presente no extrato e observado em nossos estudos através das análises de atividade antioxidante e em outros estudos como os de Badr e colaboradores (2021), Fadl e colaboradores (2022) e Su e colaboradores (2025), reduzindo a capacitação prematura da célula.

Entretanto, após duas horas, observou-se um decréscimo significativo na motilidade total, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, BCF e PMM, além da diminuição numérica na motilidade progressiva, VCL e ALH. Isso corrobora com a observação do efeito deletério da presença da quantidade utilizada de MCT nos grupos com o polaxamer. Apesar da presença do extrato ter reduzido o efeito negativo, não foi o suficiente para manter a viabilidade das células por mais tempo.

Esses achados nos mostram que os componentes presentes nas nanoformulações contém efeitos favoráveis e promissores para a conservação da viabilidade das células espermáticas após a queda da temperatura, contudo essas concentrações necessitam ser revisadas a fim de acarretar em um efeito benéfico para essas células, reduzindo o risco de criodanos e de uma capacitação prematura.

## Conclusão

A concentração de extrato utilizada no trabalho apresenta efeito antibacteriano e antifúngico, reduzindo a necessidade de antibiótico. Ainda, essa concentração pode ter efeito benéfico nas células espermáticas após a criopreservação, mantendo os parâmetros em relação ao grupo com uma maior quantidade de fosfatidilcolina.

Entretanto, O MCT, na concentração utilizada neste trabalho, não apresenta efeito benéfico nas células espermáticas pós-congelamento. A adição do polaxamer 188 à nanoformulação potencializa o efeito negativo do MCT.

Ainda assim, o extrato da *Spirulina platensis* consegue reduzir o efeito negativo causado pelo MCT, nos grupos com a adição do polaxamer 188.

Novos estudos precisam ser realizados para adaptar a concentração dos compostos a fim de melhorar ou potencializar a atividade do extrato da microalga na criopreservação de espermatozoides caprinos.

## Referências

- ABDEL-MONEIM, Abdel-Moneim Eid et al. Antioxidant and antimicrobial activities of Spirulina platensis extracts and biogenic selenium nanoparticles against selected pathogenic bacteria and fungi. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 1197-1209, 2022.
- AI, Xiaopeng et al. Polysaccharides from Spirulina platensis: Extraction methods, structural features and bioactivities diversity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 231, p. 123211, 2023.
- AKHTAR, M. F. et al. Effect of sperm cryopreservation in farm animals using nanotechnology. **Animals**, v. 12, n. 17, p. 2277, 2022.
- ALEXANDRE, Herve; MATHIEU, Bruno; CHARPENTIER, Claudine. Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. **Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 469-475, 1996.
- ALMEIDA, Jaci; JUNIOR, Antônio de Pinho Marques; RESENDE, Osvaldo Almeida. Sêmen refrigerado—estado da arte em diferentes espécies. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 1, p. 3-21, 2023.
- ANAYA, Maria Cruz Gil et al. Increasing extender viscosity improves the quality of cooled boar semen. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 3, p. 12, 2014.
- ANGRIMANI, Daniel S. et al. Fatty acid content in epididymal fluid and spermatozoa during sperm maturation in dogs. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 18, 2017.
- 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.
- BADR, M. et al. Spirulina platensis extract addition to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing potentials of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 1–12, 2021.
- BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, p. 1827-1840, 2012.
- DEL VALLE, I. et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 33, n. 4, p. 717-725, 2012.

DO, Quy Diem et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. **Journal of food and drug analysis**, v. 22, n. 3, p. 296-302, 2014.

EJAZ, R. et al. In vitro supplementation of linoleic acid improves quality of cryopreserved buffalo semen. **Indian Journal of Animal Research**, v. 1, p. 5, 2020.

ELSHOUNY, Wagih Abd El-Fattah et al. Antimicrobial activity of Spirulina platensis against aquatic bacterial isolates. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 5, p. 1203, 2017.

FADL, Aya Mohamed; EL-SHAHAT, Khaled Hafez; ABDELNABY, Elshymaa Ahmed. Influence of alpha linolenic acid on the motility, viability, antioxidant activity and fertility of frozen-thawed New Zealand white rabbit buck semen. **World Rabbit Science**, v. 30, n. 3, p. 219-226, 2022.

GAIKWAD, S. M. et al. Effect of Spirulina and Coenzyme Q-10 Addition to Extenders on Canine Spermogram. **Acta Scientific Veterinary Sciences (ISSN: 2582-3183)**, v. 5, n. 8, 2023.

HASSAN, Mahmoud AE et al. Effect of Spirulina Nanoparticles or Selenium-Coated Spirulina Nanoparticles Supplemented to Freezing Extender on Bull Sperm Freezability. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 43, n. 4, 2023.

ILIEVA, Yana et al. Antimicrobial activity of Arthospira (former Spirulina) and Dunaliella related to recognized antimicrobial bioactive compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 10, p. 5548, 2024.

JOUDEH, Nadeem; LINKE, Dirk. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. **Journal of nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 262, 2022.

KHALIL, W. A. et al. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 126, p. 121–127, 1 mar. 2019.

KHALIQ, Nisar UI et al. Pluronic F-68 and F-127 based nanomedicines for advancing combination cancer therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2102, 2023.

KUMAR, Amit et al. On the Evolution and Applications of Nanoparticles in Livestock Reproductive Biotechnology: A Comprehensive Review. **BioNanoScience**, v. 15, n. 3, p. 385, 2025.

LEUGOUÉ, S. et al. Spirulina (Arthospira platensis) Extract Promotes Motility, Microscopic, and Antioxidative Parameters of Ram Semen during Refrigerated Storage. **Black Sea Journal of Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 481–490, 1 out. 2022.

LIU, Ping et al. Membrane stress caused by octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 3239-3251, 2013.

MEHDIPOUR, Mahdieh; KIA, Hossein Daghish; MARTÍNEZ-PASTOR, Felipe. Poloxamer 188 exerts a cryoprotective effect on rooster sperm and allows decreasing glycerol concentration in the freezing extender. **Poultry science**, v. 99, n. 11, p. 6212-6220, 2020.

MIZERA, A.; KUCZAJ, M.; SZUL, A. Impact of the *Spirulina maxima* extract addition to semen extender on bovine sperm quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 18, n. 1, p. 601–607, 2019.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, Marzena; CICHOWSKA, Aleksandra Wiktoria. Molecular Biomarkers of Canine Reproductive Functions. **Current issues in molecular biology**, v. 46, n. 6, p. 6139-6168, 2024.

MOULA, Anass et al. Enhancing cryopreserved ram sperm quality at- 80° C with *Spirulina platensis* and *Salvia verbenaca* extracts. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 72, n. 2, p. 125-132, 2024.

MOUSAVID, S. M. et al. Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 209, 1 out. 2019.

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

NAJAFI, Abouzar; DAGHIGH-KIA, Hossein; MARTÍNEZ-PASTOR, Felipe. Poloxamer 188 and hydroxyethyl starch have a cryoprotective synergic effect improving post-thawing quality and fertility of rooster spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 228, p. 106738, 2021.

OZIMIC, Sanja; BAN-FRANGEZ, Helena; STIMPFEL, Martin. Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 6, p. 4716-4734, 2023.

PIANTA, Elisa et al. In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of an *Arthrospira platensis* (syn.: *spirulina platensis*) Extract. **Natural Product Communications**, v. 20, n. 1, p. 1934578X251314702, 2025.

RAHIM, A. et al. Effect of C-phycocyanin purified from *Spirulina platensis* on cooled ram semen quality and in vivo fertility. **Theriogenology**, v. 215, p. 234-240, 2024.

ROS-SANTAELLA, José Luis; PINTUS, Eliana. Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 772, 2021.

ROY, Pantu-Kumar et al. Modified *Spirulina maxima* pectin nanoparticles improve the developmental competence of in vitro matured porcine oocytes. **Animals**, v. 11, n. 9, p. 2483, 2021.

SAADELDIN, Islam M. et al. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2281, 2020.

SATHE, Swanand. Cryopreservation of semen. *Bovine reproduction*, p. 986-999, 2021.

SOUZA, Jerônimo Hugo et al. Chemically defined diluent based on Tris-casein in freezing goat semen. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e66111234093-e66111234093, 2022.

SU, Guanghua et al. Spirulina polysaccharides improve postthaw sperm quality in bulls by inhibiting the activation of pathways related to protein kinase A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 296, p. 139796, 2025.

SUN-WADA, Ge-Hong et al. A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 18098-18105, 2002.

TAKEI, Gen L. Molecular mechanisms of mammalian sperm capacitation, and its regulation by sodium-dependent secondary active transporters. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 23, n. 1, p. e12614, 2024.

VIREQUE, Alessandra A. et al. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm. **Fertility and sterility**, v. 106, n. 2, p. 273-283. e6, 2016.

XAVIER-JUNIOR, F. H. et al. Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 251–258, 5 jan. 2018.

XU, Bingbing et al. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, p. 1004683, 2022.

ZANG, Shengqin et al. Abnormalities in mitochondrial energy metabolism induced by cryopreservation negatively affect goat sperm motility. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, p. 1514362, 2025.

ZEITOUN, M. M. et al. Spirulina supplementation to the semen extender influences the quality and antioxidant parameters of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104108, 2022.

## Considerações finais

A formulação de um produto que não utilize componentes de origem animal e com potencial antimicrobiano se torna interessante para a utilização na reprodução, a fim de controlar os componentes presentes no diluidor e, ainda, reduzir o risco de contaminação.

Nanoformulações contendo extrato da *Spirulina platensis* podem ser uma alternativa para potencializar diluidores contendo lecitina, devido a presença de ácidos graxos e compostos antioxidantes. Como também, o MCT e o Pluronic F-68 podem auxiliar na estabilização e função dessa nanoformulação.

Entretanto, novos estudos precisam ser realizados a fim de reduzir os efeitos citotóxicos referentes a concentração dos compostos utilizados na formulação das nanoemulsões para que consigam potencializar o efeito do extrato da *Spirulina platensis* e se obter resultados satisfatórios na criopreservação de espermatozoides caprinos.

## APÊNDICE A – Meio Zarrouk

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade (g) diluída em água destilada</b>
1. KNO <sub>3</sub>	15,0 em 200 mL
2. NaCl	33,0 em 200 mL
3. MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 em 200 mL
4. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 em 200 mL
5. CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,58 em 200 mL
6. Na <sub>2</sub> EDTA	6,4 em 100 mL
7. FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 em 100 mL
8. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,142 em 100 mL
9. Solução mista	*Dissolver os cinco sais abaixo (g) em 100 mL de água destilada
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049 g (pode ser substituído por CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O ou CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,144 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,882 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0157 g
MoO <sub>3</sub>	0,071 g (pode ser substituído por NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)

---

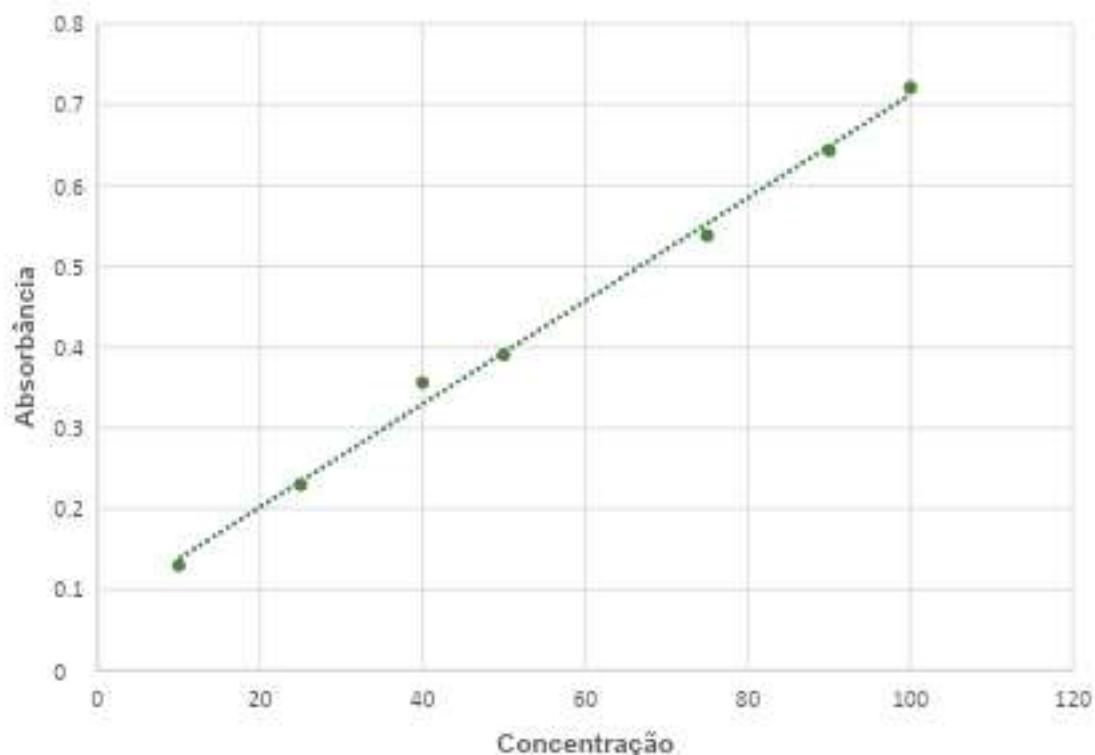
### **Etapas para o preparo de 1,0 litro de meio de cultura (água destilada)**

---

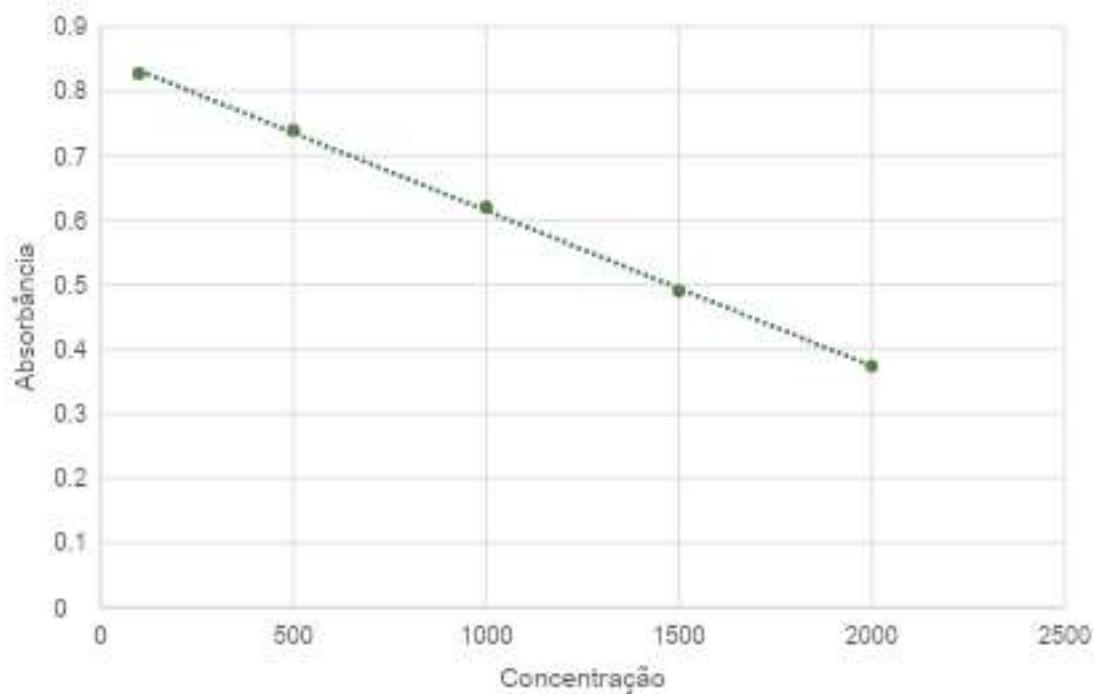
- A - Dissolver em 600 mL de água destilada 15,0 g de NaHCO<sub>3</sub>;
  - B - Na solução anterior, dissolver 2,0 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;
  - C - Acrescentar 10,0 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 5;
  - D - Acrescentar 1,0 mL das soluções 6, 7, 8 e 9;
  - E - Completar o volume a 1.000 mL e autoclaravar.
-

**APÊNDICE B – Formulação do TRIS**

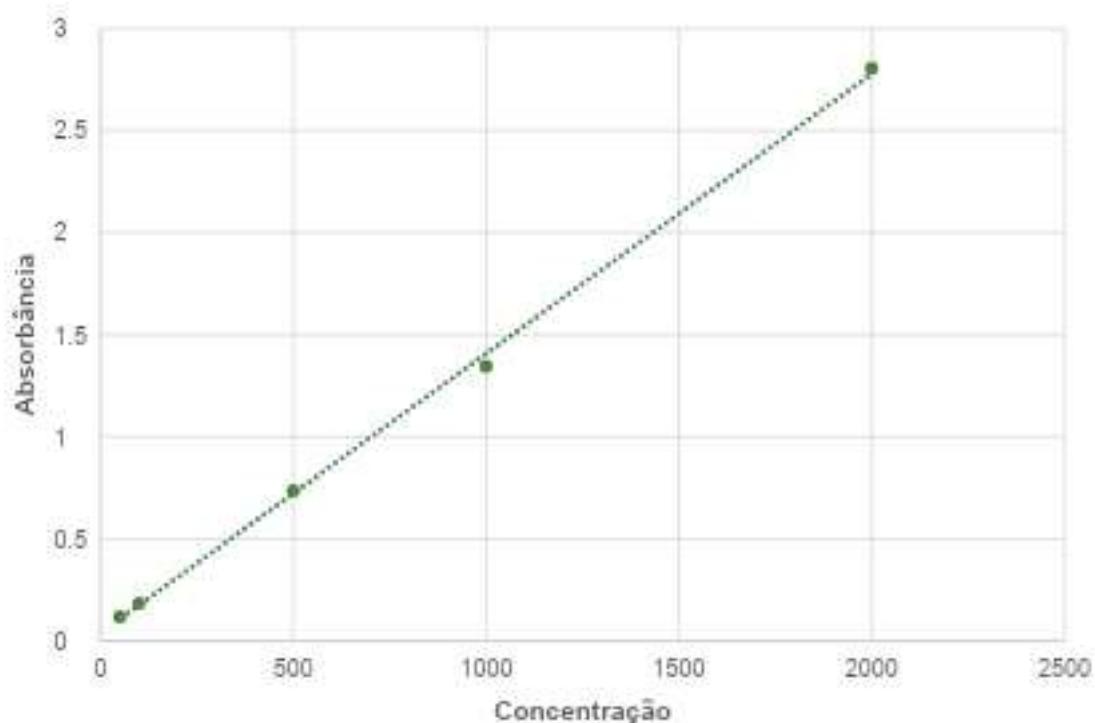
<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade (g)</b>
1. Tris-hidroximetil-aminometano	3,605 g
2. Ácido cítrico	2,024 g
3. Frutose	1,488 g
Diluir em 100 mL de água destilada	

**APÊNDICE C – Curva padrão do Teor de Fenólicos Totais (TPC)**

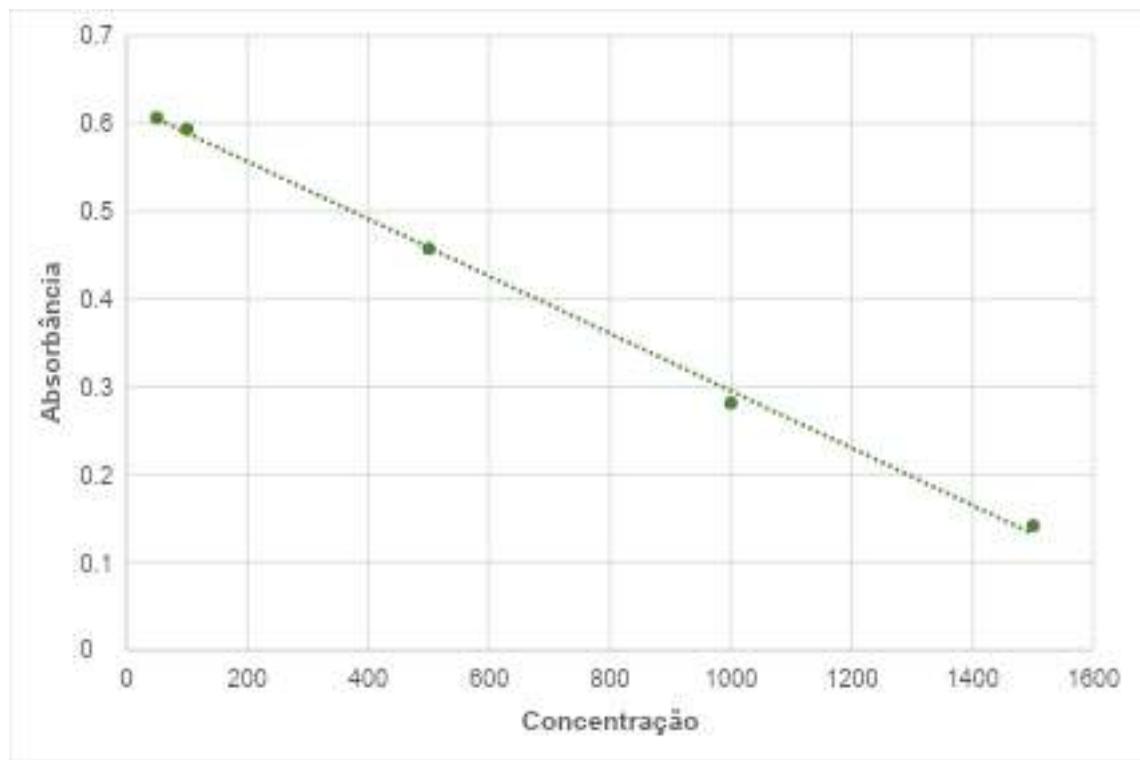
**Apêndice D - Curva padrão da Atividade de Eliminação de Radicais Livres do DPPH**



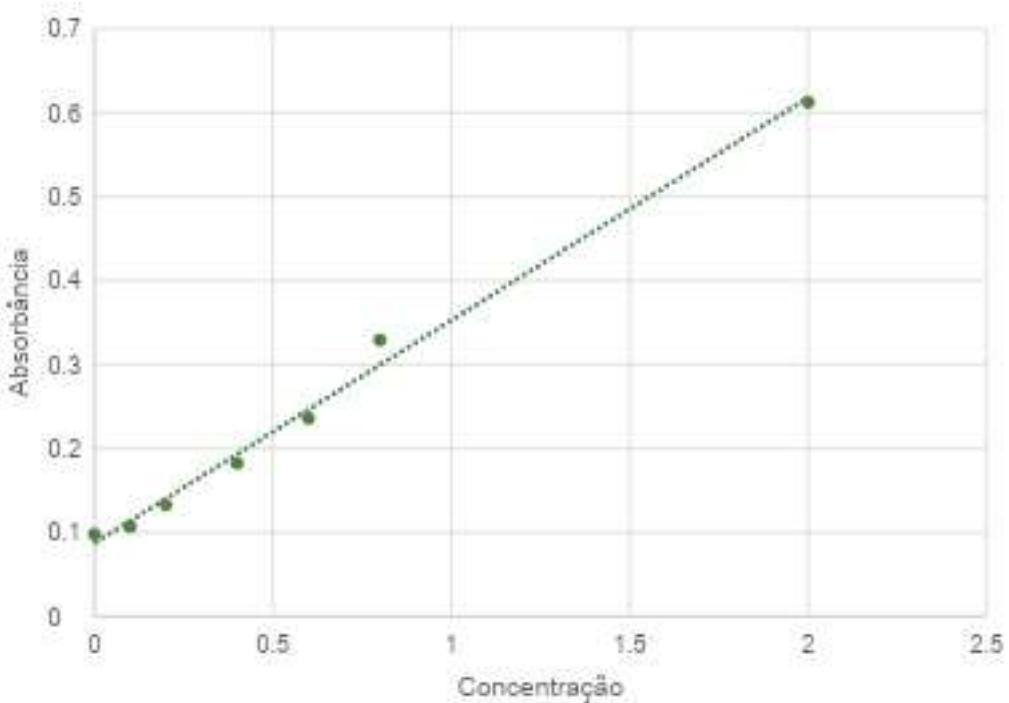
**Apêndice E - Curva padrão do Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)**



**Apêndice F - Curva padrão da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical Livre ABTS\***



**Apêndice G - Curva padrão da Determinação do teor de açúcares redutores pelo método DNS**



## Anexo A. Comprovante da CEUA



UNIVERSIDADE  
FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de óleos essenciais com atividades antioxidantes no diluente de criopreservação de sêmen caprino e ovino", protocolada sob o CEUA nº 4140210624 (ID 002059), sob a responsabilidade de **Maria Madalena Pessoa Guerra e equipe; Aline Saraiva de Oliveira; Aline Francelina de Queiros; Eliana Nunes Pereira; Pabyton Gonçalves Cadena; Lucas Facundo Moura Tobal; Maria Madalena Pessoa Guerra; Gustavo Ferrer Carneiro ; Ellen Cordeiro Bento da Silva ; Diogo Ribeiro Camara ; Sildivane Valcácia Silva; Dáfnni Layla Arcanjo Silva do Nascimento** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 11/09/2024.

We certify that the proposal "Use of essential oils with antioxidant activities in goat and ram semen cryopreservation diluent", utilizing 18 Caprines (males and females), 18 Ovines (males and females), protocol number CEUA 4140210624 (ID 002059), under the responsibility of **Maria Madalena Pessoa Guerra and team; Aline Saraiva de Oliveira; Aline Francelina de Queiros; Eliana Nunes Pereira; Pabyton Gonçalves Cadena; Lucas Facundo Moura Tobal; Maria Madalena Pessoa Guerra; Gustavo Ferrer Carneiro ; Ellen Cordeiro Bento da Silva ; Diogo Ribeiro Camara ; Sildivane Valcácia Silva; Dáfnni Layla Arcanjo Silva do Nascimento** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 09/11/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2024 a 08/2028 Área: Medicina Veterinária

Origem:	Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina		
Espécie:	Caprinos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 01 a 06 anos Quantidade: 18
Linhagem:	Variadas		Peso: 15 a 30 kg
Origem:	Biotério / Laboratório de Pesquisa com Ruminantes II		
Espécie:	Ovinos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 01 a 06 anos Quantidade: 18
Linhagem:	Variadas		Peso: 20 a 40 kg

Recife, 14 de novembro de 2024

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal Rural de Pernambuco



## Anexo B. Patente BR 10 2025 002457 8



870250010164

07/02/2025

11:27



29409162330706967

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

Número do Processo: BR 10 2025 002457 8

---

### Dados do Depositante (71)

---

#### Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24098477000110

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Cidade Universitária

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58059-900

**País:** Brasil

**Telefone:** (83) 32167558

**Fax:**

**Email:** inova@reitoria.ufpb.br