



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)
REALIZADO NA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -
EMBRAPA GADO DE LEITE, JUIZ DE FORA E NO LABORATÓRIO DE
BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DO DEPARTAMENTO DE
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL RICO
EM LIMONENO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

LUIZ HENRIQUE TODESCATT NOTTAR

RECIFE-PE

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)
REALIZADO NA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -
EMBRAPA GADO DE LEITE, JUIZ DE FORA E NO LABORATÓRIO DE
BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DO DEPARTAMENTO DE
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL RICO
EM LIMONENO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado como exigência parcial para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária sob a orientação do Prof. Dr. André Mariano Batista e Supervisão do Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

LUIZ HENRIQUE TODESCATT NOTTAR

RECIFE-PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N918r Nottar, Luiz Henrique Todescatt
RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO) REALIZADO NA EMPRESA
BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA GADO DE LEITE, JUIZ DE FORA E NO
LABORATÓRIO DE BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO: EFEITO DA ADIÇÃO DE
NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL RICO EM LIMONENO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE
SÊMEN CAPRINO / Luiz Henrique Todescatt Nottar. - 2024.
48 f. : il.
- Orientador: Andre Mariano Batista.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
Medicina Veterinária, Recife, 2023.
1. oócitos. 2. embrião. 3. sêmen. I. Batista, Andre Mariano, orient. II. Título



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)
REALIZADO NA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -
EMBRAPA GADO DE LEITE, JUIZ DE FORA E NO LABORATÓRIO DE
BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DO DEPARTAMENTO DE
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL RICO
EM LIMONENO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

Relatório elaborado por

LUIZ HENRIQUE TODESCATT NOTTAR

Aprovado em 15/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. André Mariano Batista

(Orientador) - UFRPE

Prof. Cláudio Coutinho Bartolomeu

(Membro) - UFRPE

Prof. Rafael Silva Júnior

(Membro) – UNIBRA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sala de aspiração do Laboratório de Reprodução Animal; A. Entrada da sala de aspiração do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite; B. Bancada da sala de aspiração do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite. Fonte: Autor (2023). 14
- Figura 2.** Entrada das salas de Fecundação *in vitro* do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite. Fonte: Autor (2023). 15
- Figura 3.** Equipamentos do Laboratório de Reprodução Animal; A. Incubadora de atmosfera controlada para a maturação dos oócitos, incubação dos gametas e cultivo de embriões; B. Capela de fluxo contínuo contendo pipetas, estereomicroscópio e placa aquecedora para manipulação de gametas e embriões. Fonte: Autor (2023). 15
- Figura 4.** Equipamentos para uso em biologia molecular; A. Termociclador; B. Cuba de eletroforese; C. Espectrofotômetro; D. Fotodocumentador (Eagle Eye II). Fonte: Autor (2023). 16
- Figura 5.** Filtragem do meio para rastreamento e classificação dos oócitos. Fonte: Autor (2023). 17
- Figura 6.** Etapas precedentes da maturação *in vitro*; A. Aspiração folicular de ovários obtido em abatedouro; B. Seleção dos oócitos obtidos na etapa de aspiração folicular; C. Complexos cumulus oócitos selecionados para maturação *in vitro*. Fonte: Autor (2023). 18
- Figura 7.** Gradiente de Percoll® após centrifugação contendo as camadas de diluidor de sêmen, Percoll® 45%, células mortas, Percoll® 90% e o pellet com espermatozoides capacitados. Fonte: Autor (2023). 19
- Figura 8.** Embriões bovinos. Fonte: Autor (2023). 19
- Figura 9.** Preparação do material genético para realização da Reação em Cadeia da Polimerase. Fonte: Autor (2023). 20
- Figura 10.** Etapas da realização da eletroforese em gel de agarose; A. Preparação de gel de agarose; B. Deposição das amostras amplificadas nos poços do gel; C. Gel pronto para realização da eletroforese com as amostras de DNA depositadas nos poços. D. Gel após a eletroforese com a separação das bandas maiores (azuis). Fonte: Autor (2023). 22
- Figura 11.** Etapas da revelação da eletroforese em gel de agarose; A. Gel de agarose após a eletroforese posicionado no Fotodocumentador para exposição à luz UV e revelação das bandas amplificadas; B. Imagem capturada pelo aparelho revelando as bandas amplificadas. Fonte: Autor (2023). 23
- Figura 12.** Coleta de fragmentos de gel de agarose contendo DNA. Fonte: Autor (2023). 23
- Figura 13.** Tração do testículo envolto pela túnica vaginal. Fonte: Autor (2023). 24
- Figura 14.** Testículo acessado após incisão na túnica vaginal parietal. Fonte: Autor (2023). 25
- Figura 15.** Fêmea caprina posicionada em tronco de contenção para coleta de embriões *in vivo*. Fonte: Autor (2023). 26
- Figura 16.** Sala de esterilização de materiais do LBR - UFRPE. Fonte: Autor (2024). 27
- Figura 17.** Sala de aspiração do LBR – UFRPE. Fonte: Autor (2024). 28

Figura 18. Incubadora de atmosfera controlada. Fonte: Autor (2024).	28
Figura 19. Capela de fluxo laminar equipada com esteromicroscópio, placa aquedora e pipetas. Fonte: Autor (2024).	29
Figura 20. Lavagem dos oócitos em gotas de PBS. Fonte: Autor (2024).	30
Figura 21. Espermatozoides caprinos corados com eosina-nigrosina para avaliação de viabilidade e patologias espermáticas. Fonte: Autor (2023).	36
Figura 22. Espermatozoides caprinos com membrana plasmática integras (verde) e com membrana plasmática não integras (vermelho). Fonte: Autor (2023).	38
Figura 23. Espermatozoides caprinos com alto potencial de membrana mitocondrial (laranja) e baixo potencial de membrana mitocondrial (verde). Fonte: Autor (2023).	39
Figura 24. Espermatozoides caprinos com acrossomas íntegros (seta preta) e acrossomas reagidos (seta branca). Fonte: Autor (2023).	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados por 2h em diluidor de refrigeração suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados por 24h em diluidor de refrigeração suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados por 48h em diluidor de refrigeração suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Tabela 4 – Percentuais de espermatozoides caprino com membrana plasmática íntegras, alto potencial de membrana mitocondrial e acrossomas íntegros, após 2 horas (t₂) de refrigeração utilizando diluidor suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Tabela 5 – Percentuais de espermatozoides caprino com membrana plasmática íntegras, alto potencial de membrana mitocondrial e acrossomas íntegros, após 24 horas (t₂₄) de refrigeração utilizando diluidor suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Tabela 6 – Percentuais de espermatozoides caprino com membrana plasmática íntegras, alto potencial de membrana mitocondrial e acrossomas íntegros, após 48 horas (t₄₈) de refrigeração utilizando diluidor suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALH – Deslocamento lateral da cabeça
- ATP – Adenosina trifosfato
- BCF – Frequência de batimento cruzado
- CASA - Sistema de Análise Espermática Assistida por Computador
- CIV – Cultivo *in vitro*
- COC – Complexo *cumulus*-oócitos
- DCF – Diacetato de carboxifluoresceína
- DMV – Departamento de Medicina Veterinária
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ESO – Estágio Supervisionado Obrigatório
- FIV – Fertilização *in vitro*
- FTIC – Isotiocianato de Fluoresceína
- IA – Inseminação Artificial
- iAc – Integridade de Membrana Acrossomal
- IMP – Integridade de Membrana Plasmática
- IP – Iodeto de propídio
- LBR – Laboratório de Biotécnicas aplicadas à Reprodução
- LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
- LIN – Linearidade
- MIV – Maturação *in vitro*
- MP – Motilidade Progressiva
- MT – Motilidade Total
- NELS – Nanoemulsão de laranja selvagem
- PBS – *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PIVE – Produção *in vitro* de embriões
- PMM – Potencial de Membrana Mitocondrial
- PNA – *Peannut agglutinin* (Agglutinina de amendoim)
- SOF – *Synthetic Oviductal Fluid* (Fluido sintético de oviduto)
- STR – Retilinearidade

TCC – Trabalho de conclusão de curso

TRIS – Hidroximetil aminometano

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

UV – Ultravioleta

VAP – Velocidade média da trajetória

VCL – Velocidade curvilínea

WOB – Índice de oscilação

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo relatar as atividades executadas em cumprimento da disciplina 08525 – Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), do Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária, realizadas entre os dias 02 de outubro de 2023 e 28 de novembro de 2023 na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), na unidade Gado de Leite no município de Juiz de Fora – MG e entre os dias 02 de janeiro e 19 de janeiro de 2024 no Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução (LBR) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As atividades executadas proporcionaram aprofundamento nas técnicas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) voltados à pesquisa, incluindo aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouros, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV). Também foram executadas atividades na área de biologia molecular envolvendo extração e amplificação de DNA através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No segundo capítulo do presente trabalho, foi realizado um estudo com objetivo de avaliar o efeito da adição de nanoemulsão a base do óleo essencial rico em limoneno extraído da casca da laranja selvagem (NELS) ao diluente de refrigeração de sêmen de reprodutores caprinos. Para realização da pesquisa foram utilizadas amostras seminais de cinco caprinos da raça Saanen. Cada pool seminal foi diluído em Tris-gema adicionado de NELS nas proporções de 1,25, 2,5 e 5% na concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL. As amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf (1,5 mL) e armazenadas em caixas de refrigeração (botuflex[®]) para realização da curva de refrigeração até 5 °C, sendo que após 2 horas, foram transferidas para a geladeira também em temperatura controlada de 5 °C. Para cada análise, parte de cada amostra era aliqüotada e transferida para outros tubos eppendorf (1,5 mL) em banho seco a 37 °C e, posteriormente, avaliadas no Sistema de Análise Espermática Assistida por Computador (CASA), quanto à cinética espermática e, em microscopia de epifluorescência, quanto ao Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM), Integridade de Membrana Plasmática (IMP) e Integridade de Membrana Acrossomal (iAc). A adição de nanoemulsão de laranja selvagem ao diluidor tris-gema não foi capaz de melhorar os parâmetros de motilidade e cinéticos dos espermatozoides, além de reduzir significativamente o PMM após 24h de refrigeração. Os períodos de vivência do ESO foram proveitosos para o

Palavras-chave: biotecnologias; oócito; embrião; produção *in vitro*; sêmen.

ABSTRACT

The present study aims to report the activities carried out in compliance with the discipline 08525 - Mandatory Supervised Internship (MSI), part of the Bachelor's Degree in Veterinary Medicine, conducted between October 2, 2023, and November 28, 2023, at the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), in the Dairy Cattle unit in the municipality of Juiz de Fora - MG, and between January 2 and January 19, 2024, at the Laboratory of Biotechniques Applied to Reproduction (LBR) of the Department of Veterinary Medicine (DMV) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). The activities carried out provided in-depth training in *in vitro* embryo production (IVP) techniques for research purposes, including follicular aspiration of ovaries from abattoirs, *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), and *in vitro* embryo culture (IVC). Activities in the field of molecular biology involving DNA extraction and amplification through the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique were also performed. In the second chapter of this study, a research was conducted to evaluate the effect of adding nanoemulsion based on limonene-rich essential oil extracted from wild orange peel (NELS) to the semen extender of goat breeders. Seminal samples from five Saanen breed goats were used for the research. Each seminal pool was diluted in Tris-egg yolk supplemented with NELS at concentrations of 1.25, 2.5, and 5% at a concentration of 200×10^6 sperm/mL. The samples were placed in Eppendorf tubes (1.5 mL) and stored in refrigeration boxes (botuflex®) for cooling curve determination up to 5 °C, and after 2 hours, they were transferred to the refrigerator, also at a controlled temperature of 5 °C. For each analysis, part of each sample was aliquoted and transferred to other Eppendorf tubes (1.5 mL) in a dry bath at 37 °C and subsequently evaluated in the Computer-Assisted Sperm Analysis System (CASA) for sperm kinetics, and in epifluorescence microscopy for Mitochondrial Membrane Potential (MMP), Plasma Membrane Integrity (PMI), and Acrosomal Membrane Integrity (AMI). The addition of wild orange nanoemulsion to the Tris-egg yolk extender was not able to improve sperm motility and kinetic parameters, besides significantly reducing MMP after 24 hours of refrigeration.

Keywords: biotechnologies; oocyte; embryo; *in vitro* production; semen.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DO ESO E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
2.1 Laboratório de Reprodução da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)	13
2.2 Atividades desenvolvidas na Embrapa	16
2.2.1 Produção <i>in vitro</i> de Embriões	17
2.2.2 Biologia molecular	19
2.2.3 Outras atividades	24
2.3 Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução da UFRPE	27
2.4 Atividades desenvolvidas no Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução (LBR)	29
CAPÍTULO 2: EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO ESSENCIAL RICO EM LIMONENO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO	32
1 INTRODUÇÃO	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Animais, coleta e análise de sêmen	35
2.2 Refrigeração e Análise de Sêmen	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4 CONCLUSÃO	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

**CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O
ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO**

1 INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório faz parte da grade curricular do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, podendo ser realizado em um ou mais locais de mesma área ou não, perfazendo total de 420 horas de atividades realizadas e apresentadas posteriormente em um Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). O presente relatório é uma descrição das atividades realizadas em dois locais distintos, ambos na área de Reprodução Animal com ênfase na produção *in vitro* de embriões.

A primeira parte do estágio foi realizada no Laboratório de Reprodução da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, unidade Gado de Leite, localizada na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, onde foram realizadas 312 horas de atividades entre os dias 02 de outubro de 2023 e 28 de novembro de 2023 sob supervisão do Pesquisador Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo e orientação do professor André Mariano Batista da UFRPE.

Posteriormente, foram efetivadas 108 horas de atividades no Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, campus Sede, dos dias 02 de janeiro de 2024 à 19 de janeiro de 2024, sob orientação e supervisão do Professor André Mariano Batista.

2 DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DO ESO E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 Laboratório de Reprodução da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

A primeira etapa do Estágio Supervisionado Obrigatório foi realizada no Laboratório de Reprodução da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG, com ênfase na produção *in vitro* de embriões, no período de 02 de outubro à 28 de novembro de 2023 compondo carga horária de 312 horas, sob a supervisão do pesquisador da Embrapa Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo.

Durante este período foi possível acompanhar diversas atividades relacionadas à produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, iniciando-se com a preparação de meios e materiais, aspiração folicular dos ovários oriundos de abatedouro, bem como Maturação *in vitro* (MIV), capacitação espermática em meio Percoll® e Fertilização *in vitro* (FIV) e o Cultivo *in vitro* (CIV) dos presumíveis zigotos produzidos até seu desenvolvimento em

blastocistos. Também fizeram parte da experiência algumas atividades à campo como a castração de bezerros com posterior coleta de material para extração e purificação de DNA nas atividades de biologia molecular e coleta *in vivo* de embriões caprinos.

A escolha pela Embrapa Gado de Leite ocorreu por ser uma empresa brasileira com forte expressão internacional na área da pesquisa agropecuária, contando com estrutura física e recursos que permitem maior eficiência na produção de embriões *in vitro*.

O Laboratório de Reprodução conta com uma sala de convivência, sala de aspiração (Figura 1) onde é realizada a manipulação dos materiais oriundos do abatedouro, sala de meios e reagentes e os laboratórios de FIV (Figura 2).



Figura 1. Sala de aspiração do Laboratório de Reprodução Animal; **A.** Entrada da sala de aspiração do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite; **B.** Bancada da sala de aspiração do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite. Fonte: Autor (2023).



Figura 2. Entrada das salas de Fecundação *in vitro* do Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite. Fonte: Autor (2023).

Todos os equipamentos necessários para o bom funcionamento dos processos da PIVE estavam presentes no laboratório, tais como incubadoras de atmosfera controlada, capelas de fluxo laminar, estereomicroscópios e pipetas (Figura 3).



Figura 3. Equipamentos do Laboratório de Reprodução Animal; **A.** Incubadora de atmosfera controlada para a maturação dos oócitos, incubação dos gametas e cultivo de embriões; **B.** Capela de fluxo contínuo contendo pipetas, estereomicroscópio e placa aquecedora para manipulação de gametas e embriões. Fonte: Autor (2023).

Além disso, contava com equipamentos necessários para a preparação e realização de análises biomoleculares de tecidos e células, como termocicladores, cuba de eletroforese e os demais materiais necessários para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As etapas de extração do DNA a partir de tecidos, quantificação do material genético extraído através de espectrofotômetro, revelação do gel da PCR e purificação do DNA obtido eram realizados em parceria com o Laboratório de Genética, da mesma unidade (Figura 4).



Figura 4. Equipamentos para uso em biologia molecular; **A.** Termociclador; **B.** Cuba de eletroforese; **C.** Espectrofotômetro; **D.** Fotodocumentador (Eagle Eye II). Fonte: Autor (2023).

2.2 Atividades desenvolvidas na Embrapa

Durante o período de estágio no Laboratório de Reprodução da Embrapa Gado de Leite foi possível acompanhar junto aos pós-graduandos do laboratório todas as etapas e procedimentos envolvidos na PIVE, desde a preparação dos meios e reagentes, aspiração folicular dos ovários coletados no abatedouro, rastreamento e classificação dos oócitos, capacitação espermática e inseminação das gotas no processo de FIV e o cultivo dos embriões produzidos. A produção de meios ocorria a cada duas semanas ou quando estes eram esgotados antes desse período (Figura 5).



Figura 5. Filtragem do meio para rastreamento e classificação dos oócitos. Fonte: Autor (2023).

Além das atividades específicas do laboratório de reprodução foi possível acompanhar e participar na realização de análises biomoleculares e também atividades à campo como a castração de bezerros e coleta de embriões caprinos *in vivo*.

2.2.1 Produção *in vitro* de Embriões

Os ovários eram coletados em abatedouro local na cidade de Juiz de Fora - MG e transportados em garrafa térmica à temperatura aproximada de 38 °C para o Laboratório de Reprodução. Os ovários eram lavados e colocados em soro fisiológico no banho-maria (37,5 °C) e, em seguida, os folículos eram aspirados com auxílio seringa de 10 mL conectada com agulha de 18G.

O fluido folicular era depositado em placa de petri de 90 mm e observado sob estereomicroscópio para o rastreamento dos oócitos presumivelmente presentes. As estruturas eram classificadas de acordo com o número de camadas das células do cumulus e da cor e aspecto do ooplasma (Figura 6). Os complexos *cumulus* oócitos (COCs) selecionados eram divididos em grupos e submetidos à maturação por 22 a 24 horas em gotas de meio de MIV cobertas por óleo mineral.

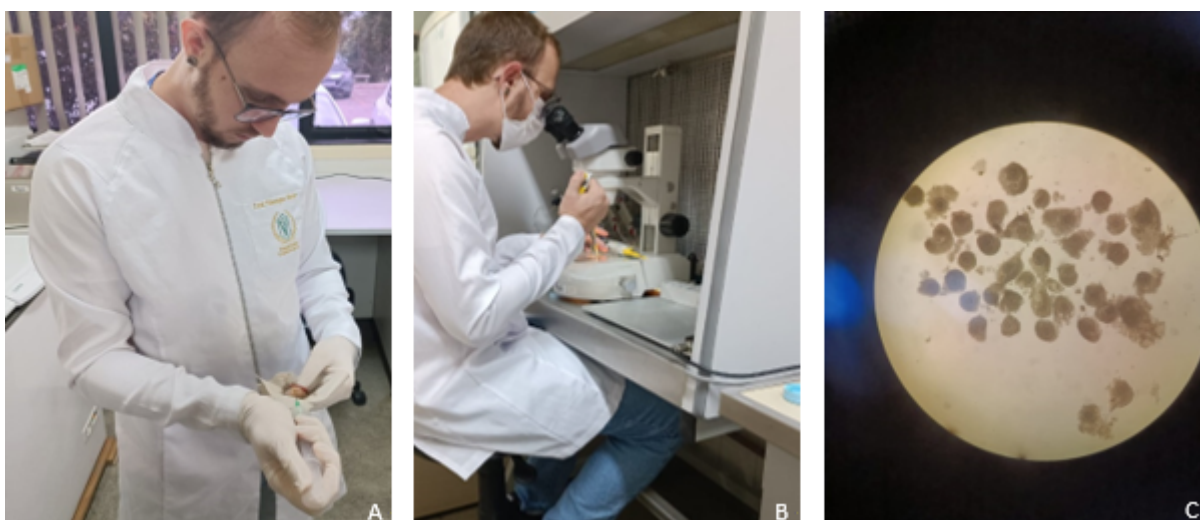


Figura 6. Etapas precedentes da maturação *in vitro*; **A.** Aspiração folicular de ovários obtido em abatedouro; **B.** Seleção dos oócitos obtidos na etapa de aspiração folicular; **C.** Complexos cumulus oócitos selecionados para maturação *in vitro*. Fonte: Autor (2023).

Após a maturação, sêmen criopreservado de bovino era descongelado e avaliado em microscópio quanto à motilidade e vigor. Em seguida, as amostras com viabilidade aceitável eram adicionadas como uma terceira camada em tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo gradiente de Percoll® nas concentrações de 45% e 90% e centrifugado para capacitação (Figura 7). Por fim, os espermatozoides capacitados eram incubados com os COCs em gotas de meio próprio para FIV.

Em aproximadamente 18h após a co-incubação dos gametas, os presumíveis zigotos eram transferidos para placas de CIV previamente preparadas, sendo as gotas compostas por *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) com objetivo de simular o ambiente natural de desenvolvimento embrionário, onde permaneciam por 6 dias (Figura 8).



Figura 7. Gradiente de Percoll® após centrifugação contendo as camadas de diluidor de sêmen, Percoll® 45%, células mortas, Percoll® 90% e o pellet com espermatozoides capacitados. Fonte: Autor (2023).

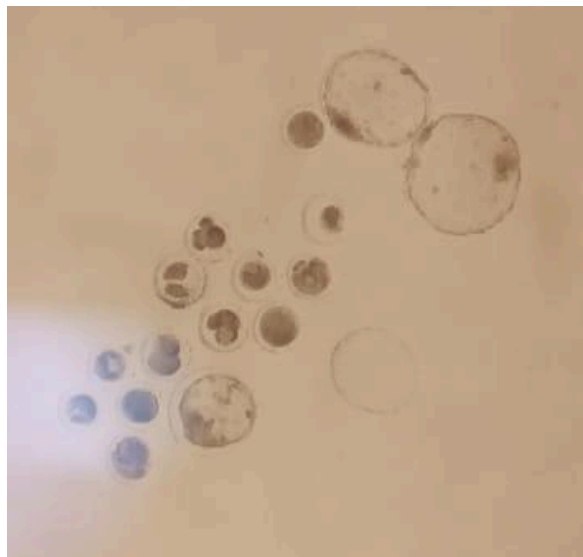


Figura 8. Embriões bovinos. Fonte: Autor (2023).

2.2.2 Biologia molecular

Foi possível também participar das atividades de biologia molecular, iniciando com a extração de DNA de tecidos de origem animal através de protocolo interno modificado de Sambrook *et al.* (2001), quantificação do material genético extraído através de espectrofotômetro, preparação do material para realização de PCR através da adição de quantidade previamente calculada do material genético, o *pool* de nucleotídeos, os *primers* referentes à sequência gênica desejada para amplificação e a enzima TAQ-DNA-Polimerase (Figura 9).



Figura 9. Preparação do material genético para realização da Reação em Cadeia da Polimerase. Fonte: Autor (2023).

Após a preparação das amostras, estas eram alocadas no Termociclador para realização dos ciclos de temperaturas e tempos adequados para amplificação do segmento de DNA desejado, consistindo em 2 minutos em 95 °C para desnaturação inicial das cadeias do DNA, seguido de 30 ciclos repetidos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos para o emparelhamento dos primers com a sequência de nucleotídeos correspondente da fita de DNA e 72 °C por 1 minuto para que a enzima TAQ-DNA-polimerase possa realizar a síntese das novas fitas de DNA e para finalizar, mais 5 minutos à 72 °C antes de estarem prontas para o armazenamento em temperatura de 4 °C por tempo indeterminado.

Através da amplificação do segmento de DNA desejado é possível realizar a eletroforese em gel de agarose. As amostras amplificadas eram depositadas nos poços presentes na extremidade do gel, que por sua vez era posicionado na cuba de eletroforese onde uma corrente elétrica realizava a separação das bandas do DNA de acordo com sua quantidade de pares de base (Figura 10).

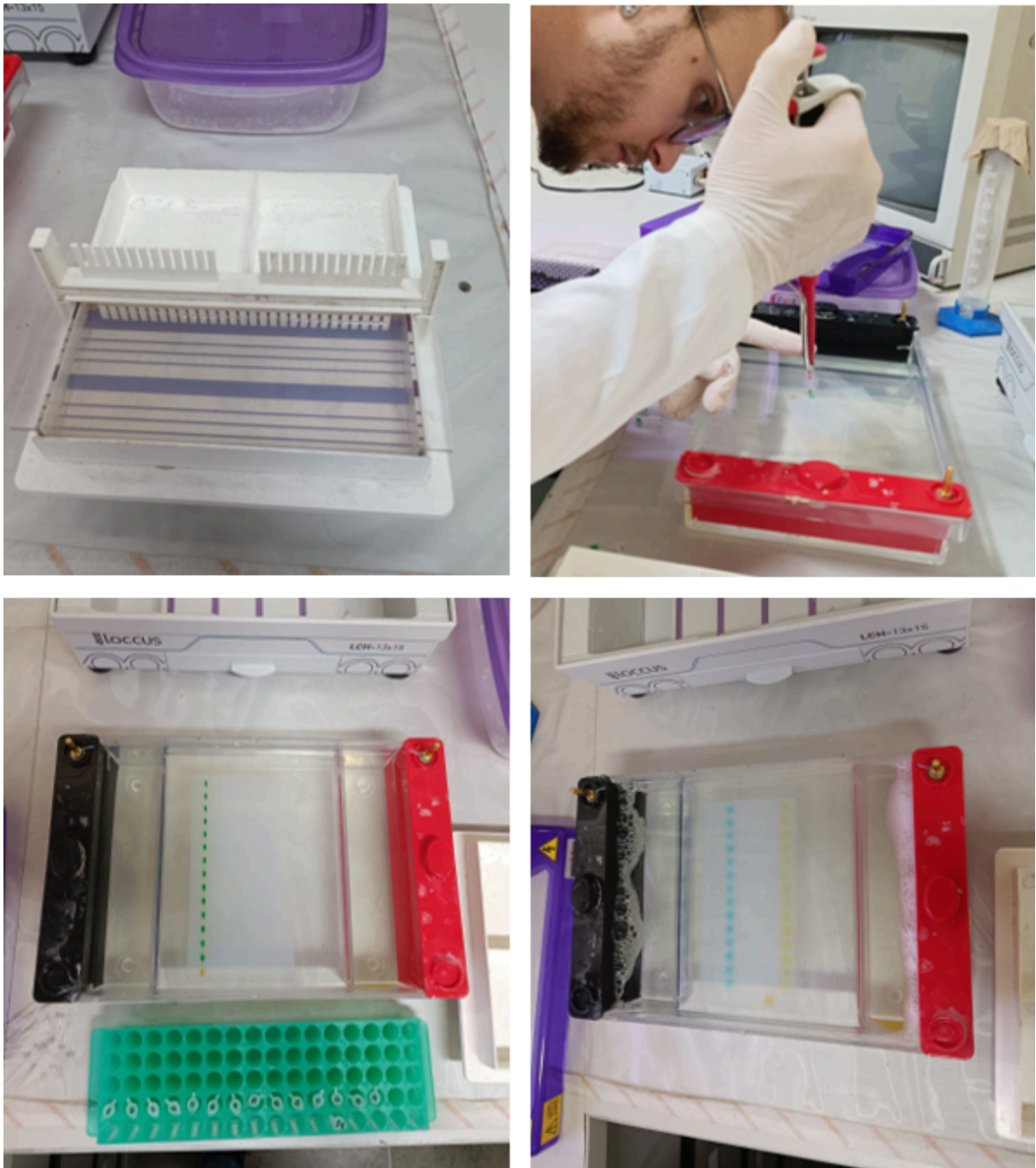


Figura 10. Etapas da realização da eletroforese em gel de agarose; **A.** Preparação de gel de agarose; **B.** Deposição das amostras amplificadas nos poços do gel; **C.** Gel pronto para realização da eletroforese com as amostras de DNA depositadas nos poços. **D.** Gel após a eletroforese com a separação das bandas maiores (azuis). Fonte: Autor (2023).

Na sequência, o foto documentador Eagle Eye II era utilizado para revelar o gel através de luz ultravioleta (UV), evidenciando quais foram as bandas de fato amplificadas durante a PCR (Figura 11).

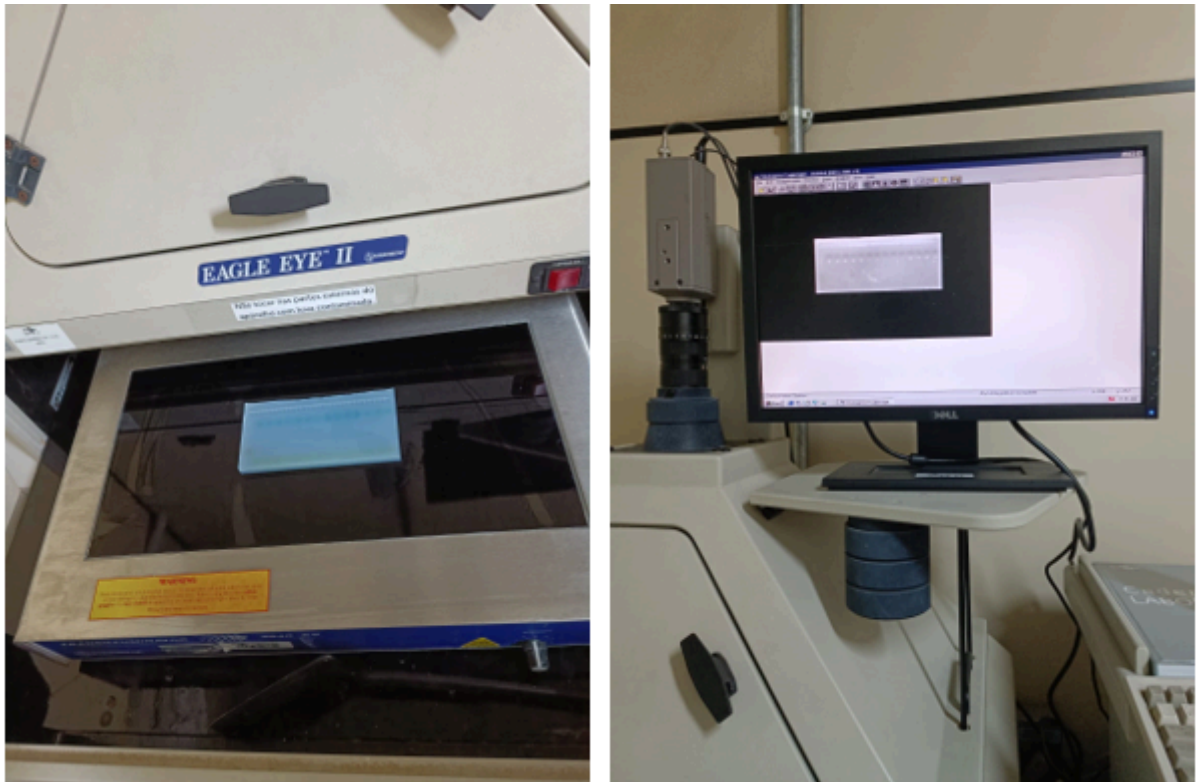


Figura 11. Etapas da revelação da eletroforese em gel de agarose; **A.** Gel de agarose após a eletroforese posicionado no Fotodocumentador para exposição à luz UV e revelação das bandas amplificadas; **B.** Imagem capturada pelo aparelho revelando as bandas amplificadas. Fonte: Autor (2023).

Por fim, os fragmentos do gel contendo as bandas amplificadas eram coletados e submetidos à purificação através de protocolo interno para realização do sequenciamento dos pares de base presentes no segmento desejado (Figura 12).



Figura 12. Coleta de fragmentos de gel de agarose contendo DNA. Fonte: Autor (2023).

2.2.3 Outras atividades

Além das atividades laboratoriais, também foi possível vivenciar experiências à campo como a castração de três bezerros machos e uma fêmea. Todos os animais foram esterilizados mediante anestesia geral, sendo os órgãos reprodutivos da fêmea acessados através de incisão no flanco esquerdo e para os machos cada um foi submetido à um diferente tipo de orquiectomia.

O primeiro bezerro foi castrado através de técnica de orquiectomia fechada, onde a pele do escroto e a túnica dartos foram seccionadas, mantendo-se íntegra a túnica vaginal. Após acessar os testículos, os mesmos foram tracionados e o cordão espermático foi transfixado, junto da túnica vaginal, e ligado para garantir a hemostasia antes da remoção do testículo propriamente dita (Figura 13). No segundo bezerro também foi aplicada uma técnica fechada, porém com a utilização do emasculador em substituição da ligadura do cordão espermático. O último bezerro por sua vez foi submetido ao método aberto (Figura 14), onde a túnica vaginal parietal também foi seccionada, permitindo com que fosse removido apenas o testículo, preservando a túnica vaginal parietal e o músculo cremaster no animal e as ligaduras fossem aplicadas diretamente sobre os vasos.



Figura 13. Tração do testículo envolto pela túnica vaginal. Fonte: Autor (2023).



Figura 14. Testículo acessado após incisão na túnica vaginal parietal. Fonte: Autor (2023).

Outro procedimento acompanhado foi a coleta de embriões caprinos *in vivo*, onde os embriões foram coletados de duas fêmeas inseminadas 7 dias antes do procedimento. Os

animais foram posicionados em tronco específico para a coleta (Figura 15) e com o auxílio do espéculo vaginal foi localizada a cérvix, sendo a mesma tracionada com pinça de Allis e fixada temporariamente junto a vulva. Após a fixação foi inserida uma sonda oro-nasal direcionada aos cornos uterinos, um de cada vez, acoplada à um sistema fechado composto por equipo e filtro de coleta para a infusão de solução de PBS acrescido de 1% de Soro Fetal Bovino para lavagem do corno uterino e recuperação dos embriões.



Figura 15. Fêmea caprina posicionada em tronco de contenção para coleta de embriões in vivo. Fonte: Autor (2023).

2.3 Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução da UFRPE

A segunda etapa do Estágio Supervisionado Obrigatório foi realizada no Laboratório de Biotécnicas aplicadas à Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, também com ênfase na produção *in vitro* de embriões, no período de 02 de janeiro de 2024 a 19 de janeiro de 2024 compondo uma carga horária de 108 horas, sob a supervisão do professor titular da UFRPE Dr. André Mariano Batista. Durante este período foi possível acompanhar e realizar diversas atividades relacionadas à produção *in vitro* de embriões bovinos, iniciando-se com a preparação de meios e materiais, aspiração folicular dos ovários oriundos de abatedouro, bem como Maturação *in vitro* (MIV), capacitação espermática em meio Percoll® e Fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) dos presumíveis zigotos produzidos até seu desenvolvimento em blastocistos. Entre os procedimentos também foi realizada a preparação de lâminas coradas com a sonda Hoechst para avaliação da maturação nuclear dos oócitos.

O Laboratório é dividido em área suja, composta pela sala de convivência, sala de esterilização de materiais (Figura 16) e sala de aspiração (figura 17) e área limpa, composta pela antessala de paramentação e a Sala de Manipulação de gametas.



Figura 16. Sala de esterilização de materiais do LBR - UFRPE. Fonte: Autor (2024).



Figura 17. Sala de aspiração do LBR – UFRPE. Fonte: Autor (2024).

Todos os equipamentos necessários para o bom funcionamento dos processos da PIVE estavam presentes no laboratório, tais como incubadoras de atmosfera controlada (Figura 18), capela de fluxo laminar, estereomicroscópios e pipetas (Figura 19).



Figura 18. Incubadora de atmosfera controlada. Fonte: Autor (2024).





Figura 19. Capela de fluxo laminar equipada com esteromicroscópio, placa aquedora e pipetas. Fonte: Autor (2024).

2.4 Atividades desenvolvidas no Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução (LBR)

Durante o período de estágio no LBR foi possível realizar todas as etapas e procedimentos envolvidos na PIVE, desde a preparação dos meios e reagentes, aspiração folicular dos ovários coletados no abatedouro, rastreamento e classificação dos oócitos, capacitação espermática e inseminação das gotas no processo de FIV e o cultivo dos embriões produzidos.

Os ovários eram coletados em abatedouro na cidade de Vitória de Santo Antão - PE e transportados em garrafa térmica em temperatura aproximada de 38 °C para o laboratório. Os ovários eram lavados e mantidos submersos em soro fisiológico no banho-maria (37,5 °C) e, em seguida, os folículos eram aspirados em solução fisiológica com auxílio seringa de 10 mL conectada com agulha de 18G.

O fluido folicular era depositado em placa de petri de 90 mm e observado sob estereomicroscópio para o rastreamento dos oócitos presumivelmente presentes. As estruturas eram classificadas de acordo com o número de camadas das células do cumulus e da cor e aspecto do ooplasma. Os complexos *cumulus* oócitos (COCs) selecionados eram divididos em grupos e submetidos à maturação por 22 a 24 horas em gotas de meio de MIV cobertas por óleo mineral.

Em parte do estágio, os oócitos maturados eram corados com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para avaliação da maturação nuclear através de exposição em microscópio de epifluorescência. Os oócitos eram lavados em gotas de PBS (Figura 20) e incubados com a sonda em câmara escura por 15 minutos, após esse tempo, eram novamente lavados em novas gotas de PBS e transferidos para lâmina de microscopia, cobertos com lamínula posicionada sobre colunas de silicone para evitar o esmagamento das células e posteriormente seladas com verniz para unhas.

Parte dos oócitos era direcionada para PIVE, quando era realizado o descongelamento de sêmen criopreservado de bovino, avaliação quanto à motilidade e vigor da amostra, capacitação em gradiente de Percoll® mediante centrifugação e inseminação das gotas de meio próprio para FIV contendo os COC's.



Figura 20. Lavagem dos oócitos em gotas de PBS. Fonte: Autor (2024).

Em aproximadamente 18h após a co-incubação dos gametas, os presumíveis zigotos eram transferidos para placas de CIV previamente preparadas, sendo as gotas compostas por *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) com objetivo de simular o ambiente natural de desenvolvimento embrionário, onde permaneciam por 6 dias.

**CAPÍTULO 2: EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO
ESSENCIAL RICO EM LIMONENO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE
SÊMEN CAPRINO**

1 INTRODUÇÃO

Em 2021 o rebanho brasileiro de caprinos era composto por cerca de 11,9 milhões de animais, dos quais mais de 11,3 milhões (95,2%) estão concentrados na região nordeste, sendo os estados da Bahia e Pernambuco os maiores produtores (IBGE, 2021). A proporção elevada da produção no Nordeste se justifica pela alta adaptabilidade da espécie em relação ao clima e vegetação presentes no semiárido (Felisberto *et al.*, 2016; Mesquita, 2020a; Meira *et al.*, 2021), sendo especialmente importante pelo potencial em aumentar a renda dos pequenos produtores (Felisberto *et al.*, 2016; Mesquita, 2020a).

Aprimorar a reprodução dos animais é imprescindível para o melhoramento genético dos rebanhos (Mesquita, 2020a, Mesquita, 2020b). Atualmente, grande maioria dos produtores ainda utiliza métodos de reprodução naturais, com a presença do reprodutor em meio as fêmeas durante o ano todo, sem atentar à estação de monta e sem uso de biotécnicas para a seleção dos animais a serem utilizados, resultando em perdas por falta de alimento e mortalidade, devido à má distribuição das parições ao longo do ano (Felisberto *et al.*, 2016; Mesquita, 2020a).

A fim de melhorar a lucratividade através do aumento de produtividade faz-se necessária a utilização da biotécnicas da reprodução, em especial a criopreservação de sêmen acompanhada da inseminação artificial (IA) (Sakashita *et al.*, 2012; Mesquita, 2020b). Para tanto, a seleção adequada dos reprodutores com base em sua condição de saúde e qualidade genética, bem como sua aptidão comprovada através de exame andrológico são necessárias (Câmara *et al.*, 2015; Mesquita, 2020b).

O uso da IA permite que o potencial de um bom reprodutor seja maximizado através de maior número de fêmeas fertilizadas, visto que um ejaculado com bilhões de espermatozoides, que seriam depositados em apenas uma fêmea através da monta natural, pode ser dividido em várias inseminações com 200 milhões de espermatozoides cada (Sakashita *et al.*, 2012; Mesquita, 2020b). A criopreservação do sêmen para realização de IA permite também que os pequenos produtores introduzam genética superior em sua propriedade sem precisar deter o reprodutor ou arcar com os custos de transporte do animal, apenas através do comércio das doses inseminantes (Mesquita, 2020b).

Existem duas vertentes da criopreservação de sêmen, a refrigeração e a congelação (Sakashita *et al.*, 2012; Maia, 2015; Mesquita, 2020b). Na refrigeração o sêmen é

acondicionado em temperaturas de 5 °C a 15 °C, capazes de deprimir seu metabolismo prolongando sua vida fértil em até 48 horas, sendo recomendado seu uso compartilhado entre criadores de uma área pequena, devido ao tempo limitado de armazenamento (Maia, 2015). Segundo Sakashita e colaboradores (2012), o sêmen refrigerado além de ser mais viável economicamente, apresenta taxas de prenhez próximas às obtidas através de monta natural ou IA com sêmen fresco e superiores às de IA com sêmen congelado.

A temperatura aplicada aos espermatozoides na refrigeração ainda causa danos à membrana plasmática e acrossomal, afetando motilidade espermática e fertilidade (Maia, 2015; Acharya *et al.*, 2020). Para redução desses danos e aumento das taxas de fertilidade são utilizados diluidores específicos que ajudam na proteção das células contra os efeitos causados pelo choque-térmico (Maia, 2015; Sakashita *et al.*, 2012).

Para a refrigeração, os diluidores devem conter um crioprotetor externo como a gema de ovo ou o leite desnatado, que contém lecitina e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que reduzem o impacto do abaixamento da temperatura sobre o espermatozoide, uma fonte energética como glicose ou frutose, um tampão como citrato de sódio ou hidroximetil aminometano (TRIS) e antibióticos para prevenir crescimento bacteriano (Silva & Guerra, 2012; Sakashita *et al.*, 2012).

Caprinos produzem naturalmente a enzima fosfolipase-A através das glândulas bulbo uretrais, essa enzima interage com a lecitina presente na gema do ovo formando ácidos graxos e lisolecitinas que causam danos à membrana plasmática dos espermatozoides (Sakashita *et al.*, 2012). Por isso, concentrações abaixo de 2,5% de gema de ovo são recomendadas para compor diluidores de refrigeração para sêmen caprino (Bispo *et al.*, 2011).

Durante o estresse térmico, metabólitos reativos ao oxigênio (ROS) são formados e reagem com os lipídios de membrana, DNA nuclear e mitocôndrias dos espermatozoides, comprometendo sua motilidade e conseqüentemente a qualidade da amostra (Toniolli & Costa, 2017). Para tanto, a adição de substâncias antioxidantes pode trazer benefícios para as células espermáticas durante o processo de refrigeração (Silva, 2011; Maia, 2015), já tendo sido observado efeito positivo na utilização de antioxidantes como vitamina E e selênio (Quezada, 2021) e também o resveratrol (Vieira *et al.*, 2019).

O limoneno é um terpeno presente em frutas cítricas, podendo ser isolado em óleos essenciais extraídos da casca de laranja, limão, lima, tangerina e mandarina (Pauletti, 2018), que dentre suas características apresenta função antioxidante (Pauletti, 2018; Piccialli *et al.*,

2021). Picciali *et al.* (2021) evidenciaram a ação do limoneno na proteção de células nervosas contra a ação das ROS.

A presença de antioxidantes em diluidores para criopreservação já se mostrou benéfica para a qualidade espermática de sêmen caprino refrigerado e congelado (Silva, 2011; Vieira *et al.*, 2019; Quezada, 2021). O uso do limoneno como antioxidante pode ser viável na preservação do sêmen caprino, mas por possuir características lipossolúveis deve ser processado com uso de nanotecnologia para que possa ser acrescido ao diluidor. Através do uso de dispositivos nanométricos (Khan *et al.*, 2017) é possível obter uma nanoemulsão a partir do óleo essencial de laranja selvagem junto com uma substância surfactante e água, que gera o encapsulamento do óleo em nanopartículas com características anfifílicas, ou seja, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas (Maurya *et al.*, 2021).

A partir da produção da nanoemulsão do óleo essencial de laranja selvagem rico em limoneno é possível a utilizar esta substância acrescida aos diluidores tradicionais de sêmen caprino para avaliar os efeitos de sua atividade antioxidante na criopreservação, através da avaliação da de motilidade, cinética e das membranas dos espermatozoides.

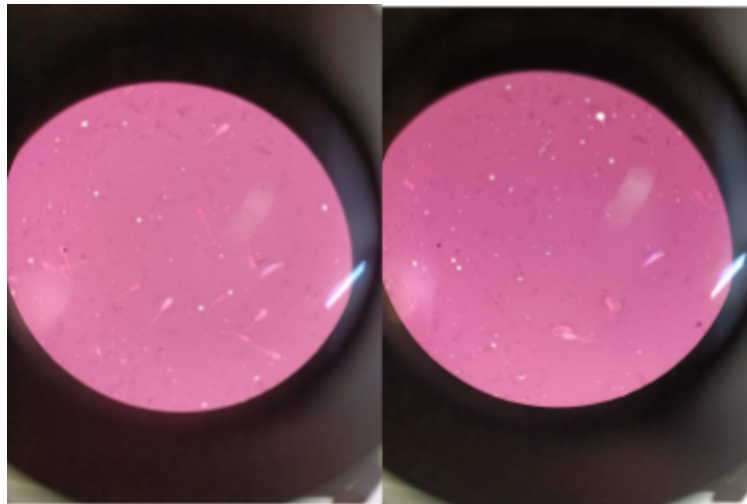
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais, coleta e análise de sêmen

O estudo foi realizado no Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), respeitando os protocolos de ética estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE (protocolo 6719080520).

Para este experimento foram utilizados cinco caprinos da raça Saanen, com idades variando de três a cinco anos, histórico de fertilidade e submetidos a exame andrológico completo, incluindo avaliação de integridade de membrana e patologias espermáticas através do estiramento com corante eosina-nigrosina. Para o estiramento foi utilizado um ejaculado de cada animal diluído individualmente em água destilada na concentração de 1:400. Posteriormente, 10 µL do sêmen diluído foi acrescido de 15 µL de eosina-nigrosina em lâmina de microscopia e realizado o estiramento, que após 10 minutos de secagem foram avaliados em microscópio de contraste de fase (Figura 21).

Os animais estavam alojados na Estação Experimental de Pequenos Animais da UFRPE no município de Carpina-PE, onde eram submetidos a manejo intensivo, alimentados com 400g/dia de concentrado comercial, além de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado no cocho, sal mineral e água *ad libitum*. As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial em temperatura aproximada de 42 °C, na presença de fêmea em cio como manequim, duas vezes por semana. Para este experimento foram coletados seis ejaculados de cada reprodutor, sendo cada ejaculado submetido às avaliações macroscópicas de volume, aspecto, cor e viscosidade, e microscópicas de turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração antes do processamento para criopreservação.



2.2 Refrigeração e Análise de Sêmen

Após avaliadas, as amostras aprovadas foram destinadas à formação do *pool* seminal com o objetivo de eliminar a variabilidade individual entre os animais. Para a refrigeração das amostras foi utilizado diluidor convencional Tris-gema de ovo, que constituiu o grupo controle. Os grupos de tratamento foram acrescidos de nanoemulsão à base de óleo essencial de laranja selvagem nas concentrações de 1,25%, 2,5% e 5% e a concentração final de espermatozoides utilizada em cada grupo foi de 200×10^6 células/mL.

Devido a distância entre o local de coleta (município de Carpina) e o laboratório (município de Recife) cada grupo experimental foi acondicionado em tubo Eppendorf de 1,5 mL individual e identificado, sendo submetidos imediatamente à curva de refrigeração em caixa refrigerada própria para transporte de sêmen (Botuflex[®], São Paulo, Brasil), onde as

amostras permaneceram a 5 °C por duas horas, sendo posteriormente armazenados em geladeira na mesma temperatura por mais 46 horas.

A análise da cinética espermática foi realizada no Sistema de Análise Espermática Assistida por Computador (CASA). Já as avaliações da Integridade da Membrana Plasmática (IMP), do Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) e da Integridade do Acrossoma (iAc) foram realizadas em microscopia de epifluorescência. Todos os grupos foram avaliados após 2, 24 e 48 horas de refrigeração.

Para o estudo da cinética espermática, uma alíquota (10 µL) de sêmen foi diluída em 30 µL de TRIS (37 °C). A seguir, 2,5 µL da amostra diluída foram depositados em lâmina, coberta com lamínula (18 x 18 mm), previamente aquecidas (37 °C), e avaliadas em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Japão; 100x). As imagens foram capturadas com uma câmera digital Basler A312FC (Basler Vision Technologies, Alemanha). Pelo menos cinco campos aleatórios foram escolhidos, com registro de, no mínimo, 500 espermatozoides. Os parâmetros cinéticos avaliados utilizando o software SCA™, versão 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Espanha), foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s) e velocidade média da trajetória (VAP, µm/s); deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento cruzado (BCF; Hz).

Para a análise da Integridade da Membrana Plasmática foram utilizados duas sondas fluorescentes, o Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma Aldrich®) e o Iodeto de Propídio (IP; Sigma Aldrich®), de acordo com Araújo Silva *et al.* (2019). Foram alíquotados 30 µL de TRIS, 10 µL de sêmen, junto a 5 µL de DCF e 5 µL de IP, que foram incubados por 7 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, foi depositado 10 µL da amostra em uma lâmina, que foi recoberto por lamínula, para ser avaliado imediatamente em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Alemanha, 400X), usando um filtro de emissão DBP 580-630 nm e filtro de excitação DBP 485/20 nm, onde foram contabilizadas 200 células em campos aleatórios, sendo as que se apresentaram verdes as íntegras, e as que se apresentam vermelhas as não íntegras (Figura 22).

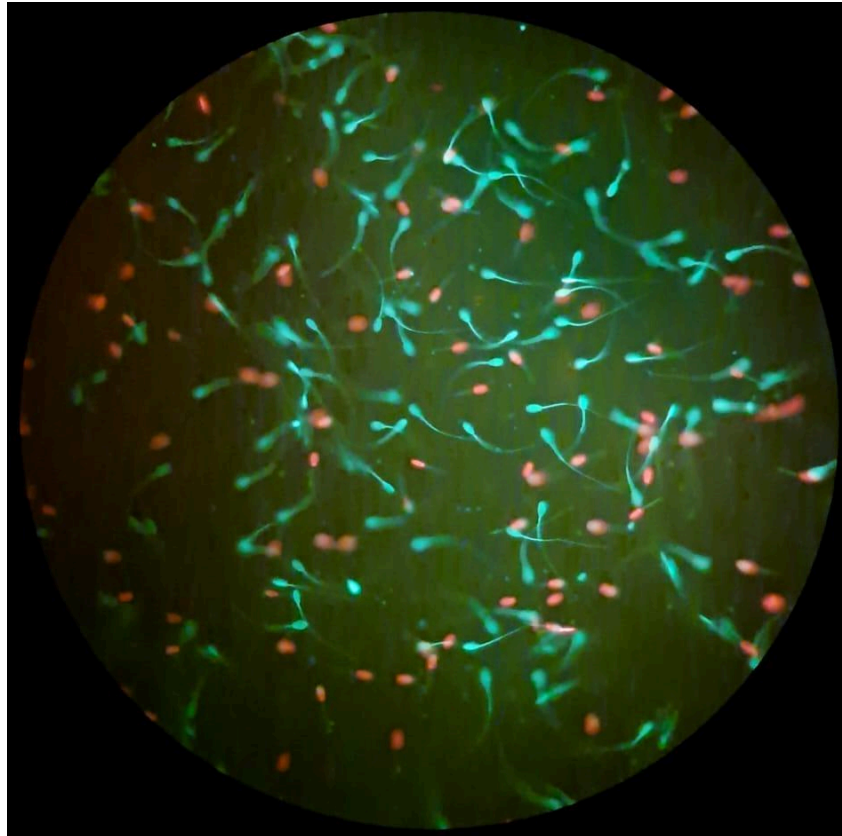


Figura 22. Espermatozoides caprinos com membrana plasmática íntegras (verde) e com membrana plasmática não íntegras (vermelho). Fonte: Autor (2023).

A análise do Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) foi realizada através da utilização da sonda fluorescente JC-1, de acordo com Araújo Silva *et al.* (2019). Foram aliqüotados 30 μL de TRIS, 10 μL de sêmen, junto a 5 μL de JC-1 que foram incubados por 7 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação, foi depositado 10 μL da amostra em uma lâmina, que foi recoberto por lamínula, para ser avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Alemanha, 400X), usando um filtro de excitação BP 450-490 nm e um filtro de emissão LP 515 nm, onde foram contabilizadas 200 células em campos aleatórios, sendo as que se apresentam laranjas, com alto potencial, e as que se apresentam verdes, as com baixo potencial (Figura 23).

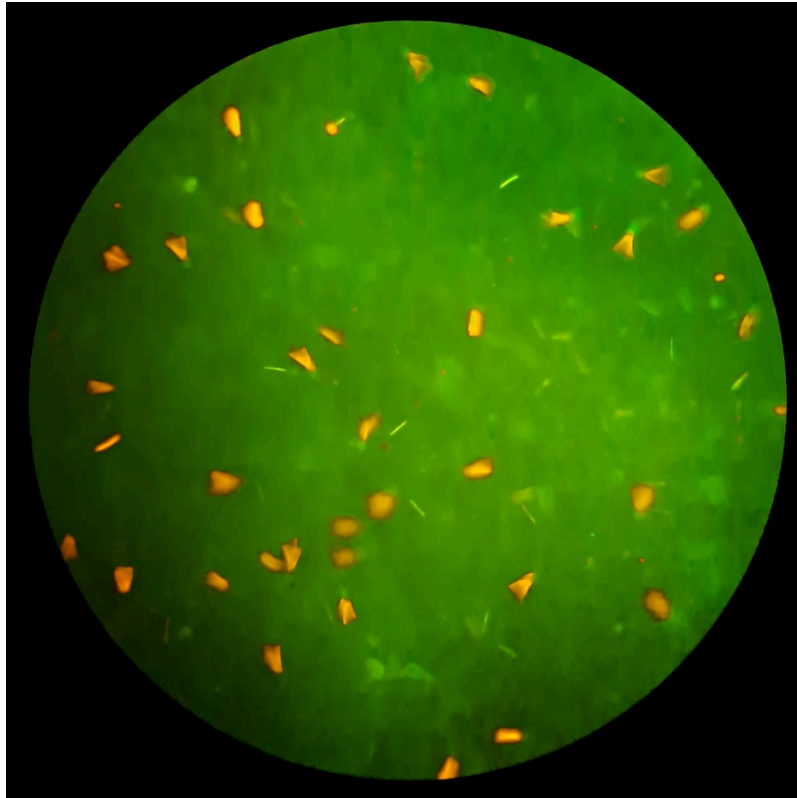


Figura 23. Espermatozoides caprinos com alto potencial de membrana mitocondrial (laranja) e baixo potencial de membrana mitocondrial (verde). Fonte: Autor (2023).

Para a Integridade do Acrossoma, a sonda utilizada foi Isotiocianato de Fluoresceína conjugado com *Peannut agglutinin* (PNA) (FITC-PNA; Sigma Aldrich[®]) (Araújo Silva *et al.*, 2019). Uma alíquota (10 μ L) foi usada para fazer um esfregaço da amostra e as lâminas foram coradas com alíquotas de 20 μ l de FITC-PNA, posteriormente incubadas em câmara úmida a 4 °C por 15 min na ausência de luz. Em seguida, as lâminas foram imersas em PBS duas vezes e secas ao ar. Imediatamente antes da avaliação, 5,0 μ L da solução (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5,0 mg de p-fenilenodiamina) foram colocados na lâmina e cobertos com uma lamínula, são contados 200 espermatozoides no microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss; Alemanha, 1000X) e em campos, aleatórios, com um filtro de emissão LP de 515 nm e BP de 450-490 nm filtro de excitação, onde as células que apresentam fluorescência estão com o acrossoma íntegro e as que não apresentam estão com o acrossoma reagido (Figura 24).

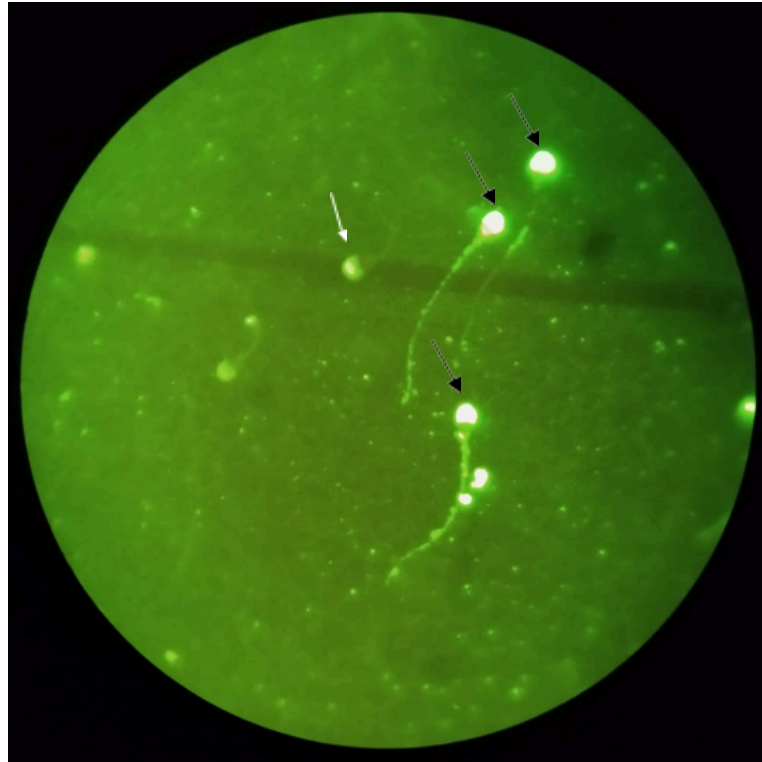


Figura 24. Espermatozoides caprinos com acrossomas íntegros (seta preta) e acrossomas reagidos (seta branca).
Fonte: Autor (2023).

As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad InStat (versão 3.10, 2009). Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância pelo Teste de Shapiro Wilk, removendo eventuais *outliers*. Posteriormente, os dados de cada grupo experimental foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar os efeitos dos tratamentos, com nível de significância estabelecido em 5%. Quando significativo, o teste de Tukey-Kramer foi realizado para comparar as médias. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas e aquelas com $0,05 < P \leq 0,1$ foram consideradas tendências.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação computadorizada através do sistema CASA, que consistem na motilidade (MT, MP, LIN e STR) e cinética espermática (WOB, VCL, VSL, VAP, ALH e BCF) foram organizados em tabelas de acordo com o tempo de refrigeração. Nas Tabelas 1 e 2 estão expressos os dados referentes às avaliações de cada amostra após duas e vinte e quatro horas de refrigeração, respectivamente, sendo que não houve diferença significativa nos

parâmetros de motilidade e cinéticos entre o grupo controle e os grupos tratados com a nanoemulsão de laranja selvagem ($p > 0,05$).

Tabela 1- Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados por 2h em diluidor de refrigeração suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Parâmetros espermáticos	Grupo Controle	Grupos tratados com nanoemulsão de laranja selvagem			P
		1,25%	2,5%	5%	
MT (%)	68,32 ± 13,00	66,52 ± 10,58	73,97 ± 3,91	64,48 ± 12,13	0,6675
MP (%)	48,32 ± 10,31	49,72 ± 14,17	55,15 ± 14,64	49,00 ± 16,23	0,8507
LIN (%)	69,88 ± 15,70	68,15 ± 11,39	68,60 ± 10,87	74,14 ± 5,29	0,8079
STR (%)	85,92 ± 7,76	86,00 ± 3,28	85,88 ± 4,42	88,46 ± 1,43	0,9295
WOB (%)	80,57 ± 13,36	70,98 ± 10,82	79,55 ± 9,52	79,27 ± 11,94	0,8002
VCL (µm/s)	67,48 ± 5,06	68,46 ± 3,06	75,05 ± 13,97	74,62 ± 11,93	0,9269
VSL (µm/s)	52,35 ± 17,92	50,67 ± 15,43	51,88 ± 14,88	50,02 ± 13,81	0,8926
VAP (µm/s)	60,48 ± 20,46	52,12 ± 5,63	60,03 ± 15,55	58,78 ± 11,79	0,8826
ALH (µm)	1,95 ± 0,34	1,98 ± 0,32	2,07 ± 0,27	2,08 ± 0,42	0,6067
BCF (Hz)	8,52 ± 0,49	9,26 ± 0,88	9,58 ± 0,88	9,38 ± 0,92	0,1139

Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s) e velocidade média da trajetória (VAP, µm/s); deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento cruzado (BCF; Hz).

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados por 24h em diluidor de refrigeração suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Parâmetros espermáticos	Grupo Controle	Grupos tratados com nanoemulsão de laranja selvagem			P
		1,25%	2,5%	5%	
MT (%)	70,25 ± 11,65	67,98 ± 9,12	70,72 ± 12,75	70,33 ± 8,94	0,9691
MP (%)	45,73 ± 23,62	44,57 ± 23,24	46,52 ± 27,05	48,55 ± 23,53	0,9732
LIN (%)	40,55 ± 7,26	52,63 ± 14,58	48,48 ± 12,06	49,07 ± 10,14	0,6621
STR (%)	73,68 ± 8,66	79,55 ± 7,54	76,97 ± 9,01	75,72 ± 11,34	0,7419
WOB (%)	57,42 ± 3,73	65,20 ± 12,90	62,20 ± 9,14	64,52 ± 5,40	0,5460
VCL (µm/s)	82,80 ± 16,16	68,32 ± 8,61	73,67 ± 8,65	80,17 ± 18,56	0,6733
VSL (µm/s)	32,83 ± 4,33	38,67 ± 7,37	35,40 ± 8,55	38,23 ± 7,30	0,4358
VAP (µm/s)	45,00 ± 7,18	48,67 ± 7,95	45,68 ± 7,56	51,37 ± 11,34	0,2448
ALH (µm)	3,33 ± 0,77	2,78 ± 1,19	2,72 ± 0,52	2,67 ± 0,58	0,4880
BCF (Hz)	9,98 ± 0,85	9,80 ± 0,28	10,60 ± 0,70	10,65 ± 0,74	0,2931

Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s) e velocidade média da trajetória (VAP, µm/s); deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento cruzado (BCF; Hz).

No grupo tratado com 5% da nanoemulsão de laranja selvagem todos os espermatozoides estavam mortos após 48 h de refrigeração.

Tabela 3- Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos refrigerados por 48h em diluidor de refrigeração suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem.

Parâmetros espermáticos	Grupo Controle	Grupos tratados com nanoemulsão de laranja selvagem			P
		1,25%	2,5%	5%	
MT (%)	67,33 ± 12,78 ^a	68,47 ± 10,59 ^a	56,33 ± 20,05 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
MP (%)	25,50 ± 23,08 ^a	31,32 ± 24,90 ^a	29,68 ± 24,87 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,0104
LIN (%)	36,98 ± 12,26 ^a	37,07 ± 6,83 ^a	40,48 ± 4,80 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
STR (%)	66,45 ± 9,15 ^a	69,23 ± 6,07 ^a	74,03 ± 4,98 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
WOB (%)	54,68 ± 10,43 ^a	53,28 ± 6,68 ^a	55,42 ± 3,63 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
VCL (µm/s)	92,2 ± 18,12 ^a	91,75 ± 20,15 ^a	79,48 ± 15,71 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
VSL (µm/s)	33,22 ± 4,85 ^a	32,97 ± 3,53 ^a	32,45 ± 6,74 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
VAP (µm/s)	49,68 ± 5,79 ^a	47,98 ± 6,96 ^a	43,82 ± 8,02 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
ALH (µm)	3,85 ± 1,13 ^a	3,80 ± 1,38 ^a	3,55 ± 0,91 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
BCF (Hz)	9,95 ± 0,81 ^a	9,12 ± 0,45 ^a	9,88 ± 0,55 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01

Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s) e velocidade média da trajetória (VAP, µm/s); deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento cruzado (BCF; Hz).

Os parâmetros de integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridade de acrossoma também estão expressos nas tabelas de acordo com o tempo de refrigeração. Após 2 h de refrigeração não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentuais de espermatozoides caprino com membrana plasmática íntegras, alto potencial de membrana mitocondrial e acrossomas íntegros, após 2 horas (t2) de refrigeração utilizando diluidor suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem

Parâmetros espermáticos	Grupo Controle	Grupos tratados com nanoemulsão de laranja selvagem			P
		1,25%	2,5%	5%	
IMP (DCF+%)	58,40 ± 1,78	61,75 ± 8,80	55,00 ± 4,61	51,67 ± 8,29	0,2872
PMM (JC-1+%)	79,17 ± 9,01	65,92 ± 12,10	66,25 ± 20,54	54,83 ± 22,29	0,4890
iAc (PNA+%)	50,92 ± 13,63	40,33 ± 7,80	44,92 ± 6,58	55,00 ± 8,30	0,0104

IMP = Integridade Membrana Plasmática; PMM = Alto Potencial de Membrana Mitocondrial; iAc = Integridade de Acrossoma.

Após 24 h os grupos tratados com a nanoemulsão de laranja selvagem apresentaram redução significativa no Potencial de Membrana Mitocondrial, sendo o grupo tratado na concentração de 5% o com maior decréscimo, significativo em relação ao grupo controle e o tratado com 1,25% da nanoemulsão (Tabela 5).

Tabela 5 – Percentuais de espermatozoides caprino com membrana plasmática íntegras, alto potencial de membrana mitocondrial e acrossomas íntegros, após 24 horas (t24) de refrigeração utilizando diluidor suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem

Parâmetros espermáticos	Grupo Controle	Grupos tratados com nanoemulsão de laranja selvagem			P
		1,25%	2,5%	5%	
IMP (DCF+%)	57,00 ± 7,62	48,75 ± 15,39	54,17 ± 4,73	45,25 ± 14,93	0,6583
PMM (JC-1+%)	62,92 ± 19,20 ^a	53,00 ± 15,18 ^{ab}	27,75 ± 19,93 ^b	15,58 ± 19,13 ^{bc}	<0,01
iAc (PNA+%)	48,92 ± 12,18	42,92 ± 10,26	41,92 ± 7,37	48,25 ± 7,04	0,3718

IMP = Integridade Membrana Plasmática; PMM = Alto Potencial de Membrana Mitocondrial; iAc = Integridade de Acrossoma.

Com 48 h de refrigeração não houve diferença significativa na avaliação de integridade acrossomal. O potencial de membrana mitocondrial sofreu redução significativa nos grupos tratados com a nanoemulsão, além do aumento significativo dos danos à membrana no grupo tratado com 5%.

Tabela 6 – Percentuais de espermatozoides caprino com membrana plasmática íntegras, alto potencial de membrana mitocondrial e acrossomas íntegros, após 48 horas (t48) de refrigeração utilizando diluidor suplementado com diferentes concentrações de nanoemulsão de laranja selvagem

Parâmetros espermáticos	Grupo Controle	Grupos tratados com nanoemulsão de laranja selvagem			P
		1,25%	2,5%	5%	
IMP (DCF+%)	50,83 ± 8,23 ^a	46,42 ± 11,27 ^a	33,58 ± 21,15 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
PMM (JC-1+%)	30,50 ± 7,11 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	<0,01
iAc (PNA+%)	40,60 ± 14,95	38,67 ± 11,89	34,75 ± 8,29	41,00 ± 10,23	0,1244

IMP = Integridade Membrana Plasmática; PMM = Alto Potencial de Membrana Mitocondrial; iAc = Integridade de Acrossoma.

Não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros de motilidade ou cinética, porém o potencial de membrana mitocondrial foi significativamente reduzido após 24h de refrigeração em todos os tratamentos. As mitocôndrias têm importante papel na produção de energia através da síntese de adenosina trifosfato (ATP) por fosforilação oxidativa (Peña *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2013) e o alto potencial de membrana mitocondrial já foi correlacionada positivamente com a motilidade seminal em humanos (Marchetti *et al.*, 2004; Paoli *et al.*, 2011) e touros (Aitken *et al.*, 2004), além de ser importante para a capacitação espermática (Amaral *et al.*, 2013).

O fato de as células manterem os parâmetros cinéticos e de motilidade apesar do potencial de membrana mitocondrial ser nulo após 24 h de refrigeração pode ter ocorrido pelo fato da mitocôndria não ser a única fonte energética da célula, visto que a glicólise também tem importante papel na movimentação do flagelo (Ramalho-Santos *et al.*, 2009; Paoli *et al.*, 2011).

4 CONCLUSÃO

A adição de nanoemulsão de laranja selvagem ao diluidor tris-gema não foi capaz de melhorar os resultados de motilidade e cinéticos dos espermatozoides, além de reduzir significativamente o Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) e a integridade de membrana após 24h de refrigeração.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Estágio Supervisionado Obrigatório é uma etapa indispensável na formação profissional do médico veterinário, permitindo maior aprofundamento na área de escolha, aprimorando técnicas e propiciando o desenvolvimento de *networking*. Além disso, proporcionou o contato com áreas interessantes e importantes como os procedimentos envolvidos na biologia molecular.

O período de vivência na Embrapa permitiu o acompanhamento de uma rotina mais intensa, onde foi possível observar diferentes pessoas executando os processos da PIVE e as particularidades com que cada um realizava as tarefas. Portanto, foi um momento de grande importância na construção do aprendizado e melhor compreensão de cada etapa da PIVE.

Durante o estágio no LBR, houve uma autonomia maior concedida ao discente, onde foi possível executar por si só todas as etapas da técnica em questão, permitindo além da compreensão um treinamento prático nos processos, que faz-se muito importante quando nos referimos à uma técnica tão sofisticada como a produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M.; BURKE, J.M.; RORIE, R.W. **Effect of Semen Extender and Storage Temperature on Motility of Ram Spermatozoa**. *Adv Reprod Sci*, v. 8, p. 14-30, 2020.
- AITKEN, R. J. *et al.* **Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa**. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, n. 8, p. 994–1010, 15 abr. 2004.
- AMARAL, A. *et al.* **Mitochondria functionality and sperm quality**. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 146, n. 5, p. R163-174, 2013.
- ARAÚJO SILVA, R. A. J.; BATISTA, A. M.; ARRUDA, L. C. P.; SOUZA, H. M.; NERY, I. H. A. V.; GOMES, W. A. SOARES, P. C.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. **Concentration of Soybean Lecithin Afects Short-term Storage Sucess of Goat Semen Related with Seminal Plasma Removal**. *Animal Reproduction*, v. 16, n. 4, p. 895-901, 2019.
- BISPO, C. A. S.; PUGLIESI, G.; PALHÃO, M. P.; COELHO, P. G. B.; KER, P. G.; RODRIGUES, M. T.; CARVALHO, G. R. **Características *In vitro* E Fertilidade Do Sêmen Caprino Armazenado A 5°C Por 24 Horas Utilizando Duas Concentrações De Gema De Ovo No Diluente**. *Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science, Goiânia*, v. 12, n. 4, p. 653–660, 2011. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/13115>. Acesso em: 8 abr. 2023.
- BRANCO, Y. N. T. C. C.; BRANCO, M. A. C; GOMES, L. A; LUSTOSA, M. S. C; BARÇANTE, F. P. S; BARROS, F. N; NASCIMENTO, I. M. R; SOUZA, J. A. T. **Ação do Limoneno (S)-(-) Sobre a Cinética Espermiática de Sêmen Criopreservado de Touros**. *Anais do Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal (VIII CONERA) In: Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 40, n. 4, p. 200-201, 2016.
- CÂMARA, D; SILVA, S. V; GUERRA, M. M. P. **Seleção de Reprodutores e Matrizes como Estratégia para Melhoria do Desempenho Produtivo da Caprino-Ovinocultura**. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 18, n. 2, p. 28-33, 2015.
- FELISBERTO, Nivea Regina de Oliveira; OLIVEIRA, Leandro Silva; CORDEIRO, Ana Gabriela Pombo Celles. **Sistemas de produção de caprinos leiteiros**. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO DE CAPRINOS NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA, 13., 2016, Coronel Pacheco. *Anais Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos. Coronel Pacheco: Embrapa*

Gado de Leite, 2016. p. 11-35. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1064921>. Acesso em: 08 abr. 2023.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. **Nanoparticles: Properties, applications and toxicities.** Arabian Journal of Chemistry, v. 12, n. 7, maio 2017.

MAIA, Marciane da Silva. **Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos.:** vii seminário nordestino de caprino-ovinocultura. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA., 6.; SEMINÁRIO NORDESTINO DE CAPRINO-OVINOCULTURA, 7., 2015, Recife. Saúde animal e produção sustentável no Nordeste: desafios e inovações tecnológicas. Recife: CRMV-PE: SPEMVE, 2015. Disponível em:

<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1025585&biblioteca=vazio&busca=1025585&qFacets=1025585&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 08 abr. 2023.

MARCHETTI, C. *et al.* **Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility.** Human Reproduction, v. 19, n. 10, p. 2267–2276, 1 out. 2004.

MAURYA, A; SINGH, V. O; DAS, S; PRASAD, J; KEDIA, A; UPADHYAY, N; DUBEY, N. K; DWIVEDY, A. K. **Essential Oil Nanoemulsion as Eco-Friendly and Safe Preservative: Bioefficacy Against Microbial Food Deterioration and Toxin Secretion, Mode of Action, and Future Opportunities.** Frontiers in Microbiology, v. 12, p. 1-17, 2021.

MEIRA, A. S.; BANDEIRA, D. J. A. .; OLIVEIRA, A. N. de .; CASTRO, A. P. de; LEITE, P. G.; NASCIMENTO, K. L. do; ARAGÃO, K. P.; LIMA, M. J. N. da C. **Technological prospecting: the advancement of goat studies.** Research, Society and Development, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e44101320809, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.20809. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20809>. Acesso em: 8 abr. 2023.

MESQUITA, Fernando Lucas MESQUITA de (org.). In: CONSELHO REGIONAL DE ENGENHARIA E AGRONOMIA (Pernambuco). **Cadernos do semiárido riquezas & oportunidades: caprinos e ovinos vol. 1.** 14. ed. Recife: Editora Ufrpe, 2020a. Disponível em:

<https://www.creape.org.br/wp-content/uploads/2020/10/CADERNO-SEMIARIDO-14-CAPRINOS-E-OVINOS.v1.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2023.

MESQUITA, Fernando Lucas MESQUITA de (org.). In: CONSELHO REGIONAL DE ENGENHARIA E AGRONOMIA (Pernambuco). **Cadernos do semiárido riquezas & oportunidades: caprinos e ovinos vol. 2**. 16. ed. Recife: Editora Ufrpe, 2020b. Disponível em:

<https://www.creape.org.br/wp-content/uploads/2020/10/CADERNO-SEMIARIDO-16-CAPRINOS-E-OVINOS.v2.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2023.

PAOLI, D. *et al.* **Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility**. Fertility and Sterility, v. 95, n. 7, p. 2315–2319, jun. 2011.

PAULETTI, G. F.; SLVESTRE, W. P. **Óleo essencial cítrico: produção, composição e fracionamento**. In EFROM, C. F. S.; SOUZA, P. V. D. (Eds.). Citricultura do Rio Grande do Sul: indicações técnicas. Porto Alegre: SEAPI-DDPA. pp. 245-268, 2018.

PEÑA, F. *et al.* **Mitochondria in Mammalian Sperm Physiology and Pathology: A Review**. Reproduction in Domestic Animals, v. 44, n. 2, p. 345–349, abr. 2009.

PICCIALLI, Ilaria *et al.* **The antioxidant activity of limonene counteracts neurotoxicity triggered by A β 1-42 oligomers in primary cortical neurons**. Antioxidants, v. 10, n. 6, p. 937, 2021.

QUEZADA, María Soledad Ortega. **Estudio de antioxidantes como preservantes de semen caprino para mejorar los procesos reproductivos controlados**. 2021. 87 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Biotecnologia, Universidad de Las Fuerzas Armadas, Sangolqui, 2021. Disponível em: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26244/1/T-ESPE-046541.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2023.

RAMALHO-SANTOS, J. *et al.* **Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells**. Human Reproduction Update, v. 15, n. 5, p. 553–572, 4 maio 2009.

SAKASHITA, S.M. *et al.* **Inseminação artificial em caprinos: Associação das biotécnicas de diluição e refrigeração do sêmen**. PUBVET, Londrina, V. 6, N. 14, Ed. 201, Art. 1345, 2012.

SILVA, E. C. B; GUERRA, M. M. P. **Aspectos Fundamentais da Morfofisiologia e Criopreservação Espermática em Pequenos Ruminantes**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 36, n. 3, p. 181-187, 2012.

SILVA, Rodrigo Otávio Correia da. **Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-04102012-151026/publico/RODRIG O_O_C_SILVA.pdf. Acesso em: 08 abr. 2023.

TONIOLLI, R; COSTA, J. M. **Espécies Reativas ao Oxigênio, Antioxidantes e suas Implicações na Qualidade do Sêmen Criopreservado de Mamíferos Domésticos**. Revisão Reprodução Animal, v. 16, n. 8, p. 22-29, 2017.

VIEIRA, Renan Luiz Albuquerque *et al.* **Resveratrol na conservação de sêmen caprino resfriado centrifugado e não centrifugado**. Revista Semiárido De Visu, v. 7, n. 3, p. 306-318, 2019.