


USO DO EXTRATO ETANÓLICO DE CASCA DE LARANJA PERA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.032-015>

Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante

Mestra em Biotecnologia (PPGBiotecM/CBIOTEC/UFPB), Instituição acadêmica: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-4365-620X>
E-mail: chrisbrilhante@gmail.com

Camilla Flávia Avelino de Farias

Mestra em Ciência Animal (PPGCAAn/CCA/UFPB), Instituição acadêmica: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9615-6410>
E-mail: camillafafarias@gmail.com

Maria Madalena Pessoa Guerra

Doutora em Ciência Animal (Escola de Veterinária/UFGM), Instituição acadêmica: Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5373-4062>
E-mail: madalena.guerra@ufrpe.br

Sildivane Valcácia Silva

Doutora em Ciência Veterinária (PPGMV/DMV/UFRPE), Instituição acadêmica: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1488-8074>
E-mail: sildivane@cbiotec.ufpb.br

RESUMO

O Brasil é o país com o maior rebanho bovino comercial, e com isso, surge a necessidade de aprimorar cada vez mais a eficiência dos processos envolvidos neste setor. Para isso são utilizadas biotécnicas aplicadas à reprodução, como a criopreservação. Buscando evitar os danos causados por esta técnica, são utilizados diluidores seminais. Todavia, os diluidores padrão rotineiramente utilizados possuem ingredientes de origem animal, como a gema de ovo e o leite desnatado. Estes são de difícil padronização e apresentam risco de contaminação. Têm-se então um grande interesse no desenvolvimento de diluidores de origem vegetal. A laranja é uma fruta rica em metabólitos secundários, como carboidratos e compostos fenólicos, estes estão relacionados à sua atividade antioxidante. No Brasil, a laranja-pera (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é variedade cítrica mais importante e seu uso pela indústria de sucos gera toneladas de resíduos agrícolas, principalmente provenientes de sua casca. Este trabalho busca utilizar de forma alternativa a casca de laranja pera, resíduo com possíveis potenciais bioativos, para produção de extrato bruto. Estes podem ser benéfico dentro da formulação de um diluidor seminal devido as suas características antioxidantes e antimicrobianas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso do extrato etanólico da casca na produção de um novo diluidor para a conservação de espermatozoides bovinos. Foi obtido o extrato etanólico da casca de laranja e caracterizado quanto à sua composição fitoquímica, potencial antioxidante e atividade antimicrobiana. Após obtenção, o extrato etanólico foi incluído em diluidores de congelamento para espermatozoides, com ou sem a presença da gema de ovo e adição de 10 e 20% deste extrato. Os



resultados demonstraram que o extrato etanólico da casca de laranja apresenta alcaloides, esteroides, taninos e flavonoides, além de alta concentração de açúcares redutores e potencial antioxidante, contudo, as avaliações espermáticas indicaram que não houve diferença entre o diluidor padrão adicionado do extrato e o diluidor padrão sozinho. Diante destes resultados, conclui-se que o extrato etanólico da casca de laranja deve ser melhor avaliado quanto ao seu potencial crioprotetor em células espermáticas de bovinos.

Palavras-chave: Bioativos. Conservação. Resíduo agroindustrial.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil, o segundo lugar no ranking do valor bruto de produção da agropecuária brasileira é ocupado pela pecuária de corte, com R\$ 183,31 bilhões, em 2023 (CNA, 2024). Para o alcance destes expressivos números são comumente utilizadas biotécnicas aplicadas à reprodução, como a inseminação artificial, transferência de embriões e a criopreservação de oócitos, espermatozoides e embriões (CARVALHO; PINTO; CARMO, 2023).

A criopreservação seminal é uma técnica importante dentro da pecuária, pois permite o armazenamento de amostras provenientes de animais com alto valor genético e comercial, possibilitando seu uso por um longo período de tempo (ZUIDEMA; KERNS; SUTOVSKY, 2021). Além disto, ela também contribui para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (BOLTON *et al.*, 2022), reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores e minimiza a possibilidade de introdução de infecções transmissíveis via sêmen em uma região e/ou país e a transmissão e propagação de infecções sexualmente transmissíveis entre os rebanhos (QUELHAS *et al.*, 2023).

Mesmo com as melhores técnicas de preservação, as taxas de sobrevivência pós-descongelamento ainda são baixas, com valor aproximado de redução de viabilidade em torno de 50%, considerando a população inicial de espermatozoides submetidas à congelamento. Com o intuito de minimizar os danos causados pelo processo de criopreservação, é adicionado às células um diluidor seminal, que deve apresentar valores de pH e osmolaridade adequados e ainda conferir proteção à estrutura morfológica do espermatozoide, mantendo-o viável mesmo em frente às injúrias causadas pelo processo de criopreservação (BUSTANI; BAIEE, 2023).

Contudo, os diluidores padrão utilizados nestas técnicas atualmente utilizam componentes de origem animal, como a gema de ovo e o leite desnatado. Estes são de difícil padronização e apresentam risco de contaminação microbiana. Sendo assim, é de grande interesse pesquisar aditivos que contribuam na redução das crioinjúrias e o crescimento de microrganismos (SOUZA *et al.*, 2023).

A laranja (*Citrus sinensis*), fruto da árvore da família Rutaceae, é rica em metabólitos secundários, como carboidratos, compostos fenólicos, flavonoides, entre outros (BERNARDI *et al.*, 2010). No Brasil, a laranja-pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é variedade cítrica mais importante, sendo amplamente utilizada pela indústria, assim como pelos mercados internos e externos de fruta fresca.

Como consequência da atividade industrial do processamento de alimentos, como a extração de suco, é gerado um grande volume de resíduos, cuja destinação pode ser problemática, por ocupar grandes espaços, e quando mal gerenciada pode representar riscos ambientais, como a poluição da água e do solo, além dos riscos à saúde da população (FARHAT *et al.*, 2011). De acordo com a Lei no 12.305 de agosto de 2010, da Política Nacional de Resíduos e Sólidos (BRASIL, 2020), é preciso que

todas as alternativas de aproveitamento tenham sido esgotadas para que um resíduo seja considerado um rejeito.

Portanto, se mostra cada vez mais importante o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias que levem ao aproveitamento e transformem estes resíduos em coprodutos. Ao delinear formulações de diluidores para criopreservação espermática com composição definida e com atividade protetora, foi considerada a busca por resíduos que pudessem conter propriedades crioprotetoras. Diante desse contexto, surge a alternativa do uso da casca de laranja-pera, representando os resíduos da fabricação de sucos, como matéria-prima para produção de coprodutos, como o extrato etanólico bruto e o óleo essencial (FERRONATO; ROSSI, 2018).

Baseado no exposto, ao considerar o impacto econômico e a importância ambiental do aproveitamento dos resíduos da laranja, tendo em vista o potencial antioxidante e antimicrobiano oriundos da casca de laranja, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diluidores acrescidos do extrato etanólico da casca de laranja-pera na conservação de espermatozoides epididimários bovinos.

2 METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido em três etapas, a primeira refere-se à obtenção e caracterização do extrato etanólico da casca de laranja; a segunda, os testes pós-diluição do extrato no diluidor comumente utilizado para a criopreservação e a terceira, os testes com a congelação de espermatozoides epididimários de bovinos

2.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE CASCA DE LARANJA

2.1.1 Obtenção e Preparação da Casca de Laranja

Foram utilizadas cascas de laranjas do tipo pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] adquiridas em João Pessoa-PB (7°06'35.5"S 34°49'55.3"W). As cascas foram lavadas em água corrente, secas, pesadas e colocadas em estufa (60 °C) por três dias. Na sequência, as cascas secas foram retiradas e previamente trituradas em um mixer, com trituração posterior em liquidificador, até a formação de um pó fino, o qual foi pesado, armazenado e envolvido em papel-alumínio, mantido em temperatura ambiente até seu uso na próxima etapa.

2.1.2 Elaboração do extrato etanólico de casca de laranja

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

Esta mistura foi filtrada a cada três dias. A cada filtração a fração líquida era separada em outro Erlenmeyer e o material sólido era mantido, junto a ele era adicionado de mais 1,2 litro de etanol. Este

processo se repetiu por três vezes e toda fração líquida obtida foi levada ao rotaevaporador para secagem e obtenção do extrato etanólico.

2.1.3 Screening fitoquímico

O screening fitoquímico foi realizado para identificar qualitativamente a presença/ausência de cinco grupos de compostos químicos no extrato etanólico, sendo eles: alcaloides, esteroides, taninos, flavonoides e saponinas. Para todos os grupos analisados, o teste foi realizado utilizando 20 mg do extrato bruto, em tubos de ensaio de vidro. A metodologia foi utilizada de acordo com a descrição de Melo *et al.* (2024).

2.1.4 Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS

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

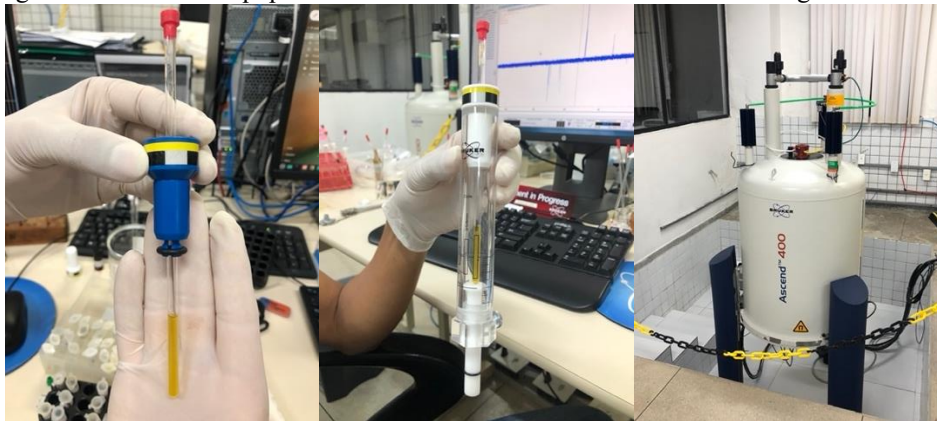
Foram utilizadas diferentes diluições feitas com o extrato bruto previamente obtido e água destilada. Em tubos de ensaio de vidro foram adicionados 0,5 mL da amostra e 0,5 mL do reagente DNS, esta mistura foi agitada em vórtex e incubada em banho termostabilizado à 90 °C por 5 minutos. Após esse período,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

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

2.1.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio 1H e carbono 13C

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

Figura 1: Materiais e equipamentos utilizados na técnica de ressonância magnética nuclear



Fonte: Autoria própria (2022).

2.1.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)

Utilizou-se o método Folin-Ciocalteu, que leva o nome do reagente principal utilizado na técnica. Este reagente apresenta coloração amarela, mas quando em contato com agentes redutores (compostos fenólicos) em pH alcalino, ocorre uma mudança de coloração para o azul. Esta mudança permite obter uma estimativa da concentração destes compostos. Para isso, utilizou-se uma curva de calibração do padrão, com o ácido gálico, em diferentes concentrações. A leitura das amostras e da curva de calibração foi feita em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g amostra).

Antes de iniciar o teste foram preparados os reagentes utilizados nas análises (Anexo II) e foi preparada a solução-amostra de 1,0 mg/mL do extrato etanólico em metanol.

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

2.1.7 Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH

Para realização do teste, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, em que cada poço teve 100 μ L das amostras (incluindo o controle positivo) adicionado. Após isso, sobre abrigo de luz, foi adicionado em cada poço 100 μ L da solução de DPPH (Sigma-Aldrich) a 0,3 mM. Para a preparação do branco foi utilizado 100 μ L da amostra e 100 μ L de metanol e para o controle negativo foi utilizado 100 μ L da solução DPPH a 0,3 mM e 100 μ L de metanol (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

A placa foi mantida no escuro por 30 minutos sem agitação. Após este tempo foi medida a absorbância em um leitor de microplacas multidetector (Biotek, modelo Synergy HT), no comprimento de onda de 517 nm. A partir dos valores obtidos do equipamento foram calculados o valor da porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL) ou também conhecida por porcentagem de inibição (% I) para cada amostra (Equação 1).

Equação 1: Equação da porcentagem de sequestro de radicais livres

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

Também foram calculados os valores da concentração necessária para atingir a IC 50, referente a concentração necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH em solução. Este valor foi encontrado a partir da plotagem em gráfico, em que o eixo X foi referente a concentração da amostra, e o eixo Y foi a média da porcentagem de inibição (% I) (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Para o extrato etanólico, foram feitos testes com soluções-mãe de 1, 2 e 3 mg/mL em metanol. Por último, para os diluidores, foram utilizados como soluções-padrão os mesmos já prontos em sua diluição final, a qual foi utilizada para as avaliações espermáticas.

2.2 TESTES PÓS-DILUIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE CASCA DE LARANJA NO DILUIDOR SEMINAL

2.2.1 Delineamento experimental dos testes com o extrato etanólico de casca de laranja

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

- Grupo Controle: Tris-gema;
- Grupo Extrato Etanólico Diluído 1 (EE1): Tris-gema + 10% da solução aquosa do extrato;
- Grupo Extrato Etanólico Diluído 2 (EE2): Tris-gema + 20% da solução aquosa do extrato;
- Grupo Extrato Etanólico Diluído 3 (EE3): Tris + 10 % da solução aquosa do extrato;
- Grupo Extrato Etanólico Diluído 4 (EE4): Tris + 20% da solução aquosa do extrato;

2.2.2 Testes microbiológicos

Os testes microbiológicos tiveram como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do extrato da casca de laranja-pera incluído no diluidor de criopreservação, o Tris-gema (3,605 g de Tris-hidroximetilaminometano; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose; 100 mL de água bidestilada;

20% de gema de ovo; 5% de glicerol) ou na solução tampão de Tris (3,605 g de Tris-hidroximetil aminometano; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose; 100 mL de água bidestilada; 5% de glicerol).

Para a realização dos testes microbiológicos, foram utilizados os grupos: Tris-gema + 10% de extrato etanólico, Tris-gema + 20% de extrato etanólico, Tris + 10% de extrato etanólico e Tris + 20% de extrato etanólico. Utilizou-se o método de microdiluição em placas de 96 poços de fundo chato. Reservou-se uma placa para cada bactéria utilizada, sendo elas: as linhagens padrão *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-13883, e o isolado *Escherichia coli* AV12. As três espécies utilizadas neste trabalho fazem parte da lista de bactérias prioritárias da OMS (Asokan *et al.*, 2019). O isolado AV12 apresenta característica de multidrogarresistente, com resistência à amoxicilina, cefalexina e cefalotina, e sensibilidade à ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, norfloxacin e sulfonamida.

Os microrganismos foram isolados de uma cultura recente de três dias e foram suspensos em solução fisiológica (NaCl 0,9%) até obter a turbidez padronizada de 1.0 da escala de McFarland's.

2.2.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

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

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

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

2.2.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da concentração bactericida mínima foi utilizado o corante redox resazurina. Esta molécula apresenta uma coloração azul, e ao entrar na célula que está viável e com atividade metabólica normal, este composto passa por reações de redução resultando na resorufina, uma molécula de coloração rosa e que apresenta fluorescência (GENHARTDT *et al.*, 1994). O teste consistiu em aplicar uma alíquota de 10 μ L da resazurina em cada poço das placas utilizadas no ensaio

anterior. Após o tempo de incubação de duas horas, à temperatura ambiente e em bancada, as placas foram analisadas quanto à sua coloração resultante.

2.3 TESTES DE CONGELAÇÃO ESPERMÁTICA COM OS DILUIDORES ACRESCIDOS DO EXTRATO ETANÓLICO DE CASCA DE LARANJA

2.3.1 Obtenção dos espermatozoides epididimários de bovinos

Foram utilizados complexos testículos/epidídimos de bovinos sem raça definida que foram obtidos em um abatedouro localizados na cidade de Santa Rita/PB (7°07'10.7"S 34°59'33.7"W) e transportados em caixa térmica até o Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da Universidade Federal da Paraíba (Campus I). No laboratório, o epidídimo e o ducto deferente foram separados do testículo, amarrados com um barbante para que não houvesse extravasamento do seu conteúdo interno, cortados e higienizados com solução fisiológica (NaCl 0,9%) à temperatura ambiente (FARIAS *et al.*, 2019).

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

Figura 2: Técnica de flutuação para obtenção dos espermatozoides epididimários bovinos



Fonte: Autoria própria (2022).

Os espermatozoides obtidos na suspensão foram avaliados quanto à motilidade (0-100%) e vigor (0-5). Amostras com motilidade superior a 50% foram homogeneizadas em um tubo tipo falcon de 15 mL para a formação do pool (espermatozoides diluídos em soro fisiológico) a fim de evitar alterações ou variabilidade entre indivíduos no experimento (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Distribuiu-se 1,0 mL do pool obtido em tubos do tipo eppendorf, estes foram levados à centrífuga (Centrífuga de Bancada Refrigerada da marca Solab, modelo SL-706) por 10 minutos a 3000 rpm (rotações por minuto), com aceleração e desaceleração de 120 segundos e em temperatura ambiente. Em seguida, por pipetagem, retirou-se o maior volume possível da solução fisiológica

sobrenadante, mantendo-se o pellet das células espermáticas. Em todas as repetições, as células foram ressuspensas em um volume de 2,0 mL do diluidor/grupo a ser testado.

2.3.2 Análises espermáticas pré-congelação

2.3.2.1 Avaliação da motilidade espermática

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

2.3.2.2 Teste de integridade da membrana plasmática

O teste de integridade da membrana plasmática foi feito utilizando a dupla coloração com os corantes eosina e nigrosina (CBRA, 2013). A eosina é um corante supravital incapaz de penetrar em células com sua membrana plasmática intacta. Por outro lado, em células mortas ou lesadas, onde não há mais uma integridade da membrana plasmática, a eosina pode penetrar na célula, e estas foram coradas em rosa. A nigrosina é responsável por dar o contraste mais escuro do fundo da lâmina, permitindo uma melhor visualização dos espermatozoides não corados (SWANSON; BEARDEN, 1951). As células não coradas indicaram as células vivas, onde não houve entrada do corante, e as células rosadas representaram células com membrana plasmática não íntegras

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

2.3.2.3 Teste de funcionalidade da membrana plasmática

Foi utilizado o teste hiposmótico (HOST) para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática. Este baseia-se nas propriedades de manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular (CBRA, 2013). Nesta técnica o espermatozoide é incubado em solução hiposmótica, na qual ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Conseqüentemente à entrada e expansão da membrana, há o enrolamento da cauda num processo fisiológico. Caso a membrana não esteja intacta, seja por danos ou morte do espermatozoide, esta reação não ocorrerá, resultando em uma cauda esticada (JEYENDRAN *et al.*, 1984). Temos então que,

para o experimento, foram consideradas células espermáticas com membranas plasmáticas funcionais aquelas que tiveram sua cauda enrolada e células com membranas plasmáticas não funcionais aquelas que apresentaram cauda esticada.

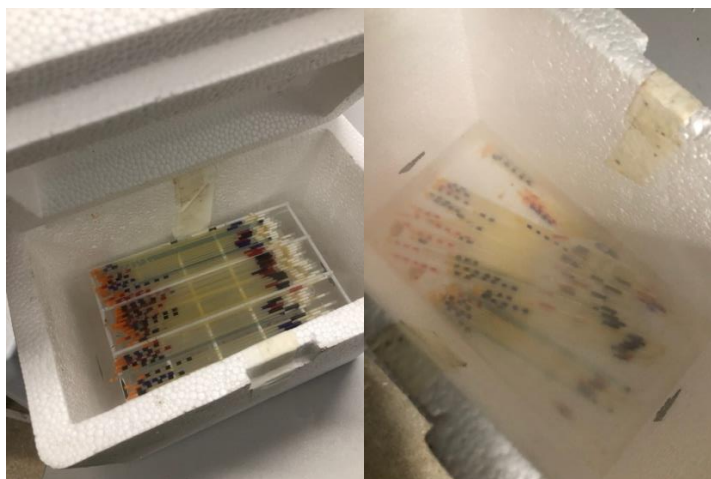
Para o teste, foi diluído em um microtubo 10 μL de cada grupo experimental juntamente à 100 μL da solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H₂O) (Anexo II). Esta solução foi incubada em banho maria à 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, foi adicionado 50 μL de uma solução formol salina a fim de parar a reação osmótica. A avaliação foi feita colocando-se 10 μL de cada solução em uma lâmina, coberta por uma lamínula, e esta foi analisada em um microscópio óptico com objetiva de 40x. Foram contadas 100 células e anotou-se a quantidade de células com cauda enrolada e com cauda esticada para cada grupo experimental.

2.3.3 Congelação e descongelação dos espermatozoides epididimários bovinos

Para congelação (Figura 3), as amostras foram inicialmente envasadas em palhetas de 0,25 mL e vedadas com álcool polivinílico. Estas palhetas foram então colocadas em sacos plásticos e foram submersas em um béquer com água à temperatura ambiente. Este foi levado para geladeira, mantida na temperatura à 5 °C, para a curva de refrigeração e posterior manutenção a 5 °C por quatro horas, para o tempo de equilíbrio (ALMEIDA *et al.*, 2017). Após este período, foram submetidas à curva de congelação em vapor de nitrogênio líquido (distância de 4 cm entre as palhetas e a lâmina de nitrogênio líquido), 15 minutos. Na sequência, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido e transferidas para o botijão, até o momento da avaliação.

Figura 3: Etapas da congelação das amostras





Fonte: Autoria própria (2022).

2.3.4 Análises espermáticas pós-descongelção

As amostras foram descongeladas a 37 °C, em banho-maria, por 30 segundos, e fracionadas em tubos de microdiluição, na quantidade de 10 µL. As amostras foram diluídas em solução fisiológica (NaCl 0,9%), na proporção de 1:3 e foram adicionadas as sondas fluorescentes (exceto as amostras submetidas à avaliação cinética), que serão descritas abaixo. Todas as sondas foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções-estoque de fluoróforos foram preparadas como segue: iodeto de propídio (25 mg/mL), JC-1 (5 mg/mL) e FITC conjugado com aglutinina de amendoim (FITC-PNA, 1 mg/mL) em solução tampão fosfato salina (PBS); as soluções de trabalho foram JC-1 (153 µM) em dimetilsulfóxido (DMSO), FITC-PNA (0,04 mg/mL) e IP (0,5 mg/mL) em PBS e diacetato de carboxifluoresceína (DIC; 0,46 mg/mL em DMSO). As avaliações foram feitas logo após a descongelção e repetidas novamente após 1 h em banho-seco a 37 °C (teste de termorresistência).

2.3.4.1 Avaliação dos parâmetros cinéticos

A cinética espermática foi analisada através do sistema computadorizado de análise espermática (Sperm Class Analyzer - SCATM software, Microoptics, 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™ H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie™ A312FC, Ahrensburg, Alemanha) (Figura 16). Para cada amostra foram analisados cinco campos não consecutivos, selecionados aleatoriamente, com registro de, no mínimo, 2.000 espermatozoides.

Foram avaliadas as seguintes variáveis: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (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). 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^2 ; VAP: lentos 10 μs < médios 45 μs < rápidos 90 $\mu\text{m/s}$; progressividade, 75% STR, 50% LIN (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

2.3.4.2 Integridade de membrana plasmática (iMP)

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

2.3.4.3 Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)

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

2.3.4.4 Integridade de membrana acrossomal (iAC)

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

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE LARANJA

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

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE CASCA DE LARANJA

3.2.1 Screening fitoquímico

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

Dados semelhantes quanto à presença destes compostos na casca de laranja foram descritos por Pereira *et al.* (2020), Silveira (2019) e Oliveira (2017). A presença de esteroides podem indicar uma possível proteção à membrana plasmática, uma vez que apresentam composição similar ao colesterol, que promove esta proteção aos espermatozoides submetidos à criopreservação. Os flavonoides podem apresentar atividade antioxidante, que é importante na descongelação das amostras seminais, por promover equilíbrio após a formação elevada de oxidantes pós-criopreservação. Assim, o extrato etanólico da casca de laranja apresenta características funcionais para a criopreservação espermática.

3.2.2 Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS

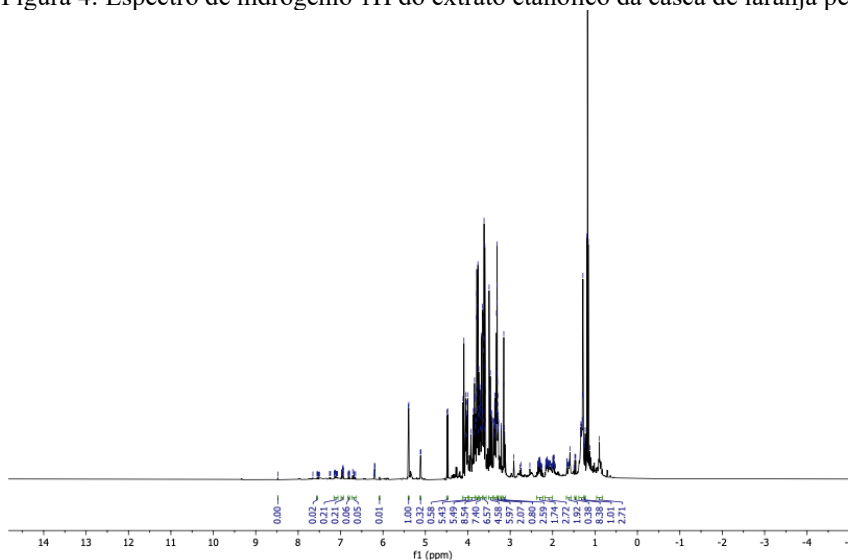
A concentração de açúcares redutores encontrada no extrato da casca de laranja foi de 305 ± 20 mg/mL. Os açúcares solúveis na casca de laranja variam entre 15 a 40% do peso total, eles atuam como um importante substrato para processos biológicos (Ahmed *et al.*, 2016). Dentre eles, os açúcares principais encontrados são a glicose, frutose e sacarose, mas é possível encontrar em menor quantidade a xilose e glicopolissacarídeos (Rivas *et al.*, 2008; Torrado *et al.*, 2011). Os dados aqui obtidos indicam que o extrato produzido e utilizado neste trabalho apresenta uma alta concentração de açúcares redutores, este resultado vai ao encontro de outros estudos que também realizaram esta técnica em diferentes extratos da casca de laranja (Locatelli, Finkler, Finkler, 2019; Ayala *et al.*, 2021). Nas

condições deste experimento, a presença dos açúcares no extrato agiria em dois momentos; a sacarose, na fase de refrigeração/congelação, que pode aumentar a osmolaridade do meio e promover a desidratação celular, importante para a saída de água do meio intracelular para o meio extracelular, evitando a formação de cristais de gelo dentro do espermatozoide e, como glicose e frutose, fornecendo substrato para a motilidade espermática pós-descongelção, uma vez que as mitocôndrias utilizam desta energia para conversão em ATP e impulsionar o batimento flagelar.

3.2.3 Ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ^1H e carbono ^{13}C

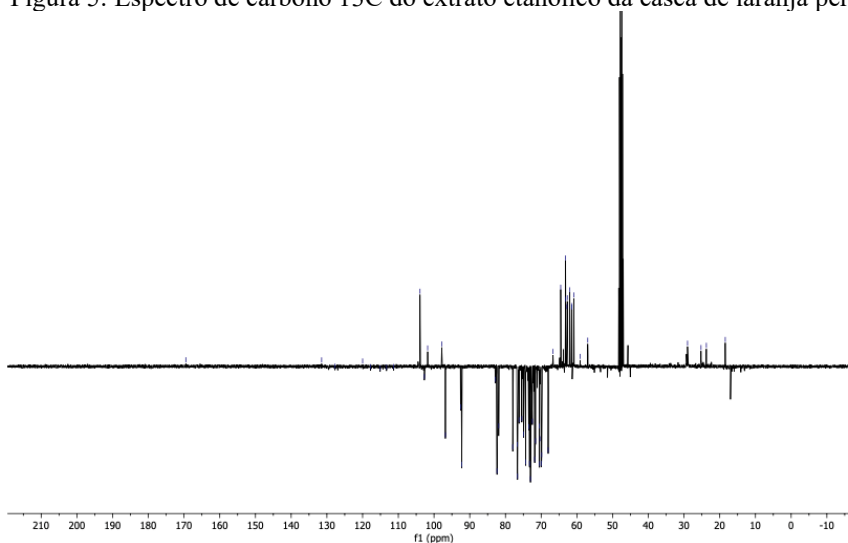
O espectro de hidrogênio ^1H do extrato etanólico está indicado na Figura 4 e o espectro de carbono ^{13}C está indicado na Figura 5.

Figura 4: Espectro de hidrogênio ^1H do extrato etanólico da casca de laranja pera



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 5: Espectro de carbono ^{13}C do extrato etanólico da casca de laranja pera



Fonte: Autoria própria (2022).

Quanto ao espectro de ^1H , foi possível perceber a presença de três intervalos distintos, os quais indicam a presença de certas classes de compostos químicos. O primeiro intervalo está entre 1,9 e 2,4 ppm (mg/Kg), e apresenta sinais de hidrogênios alifáticos característicos de substâncias terpênicas. O segundo intervalo encontra-se entre 3 e 4 ppm e apresenta um envelope de sinais de características de açúcar ou glicosídeos. O terceiro intervalo está entre 6 e 8 ppm, e apresenta sinais característicos de substâncias aromáticas.

A partir da década de 1980, a presença de carboidratos passou a ser estabelecida com a utilização de dados de deslocamento químico, podendo ser avaliada pela técnica de RMN. Sinais de RMN de H em torno de 4,5 a 5 ppm podem indicar a presença de hidrogênios anoméricos de açúcares, associado à presença de multipletos no intervalo de 3 e 4 ppm. Quanto aos espectros de RMN de C, a presença de carboidratos pode ser dada pela presença de sinais entre 90 a 115 ppm, correspondendo a carbonos anoméricos, e sinais em torno de 70 a 80 ppm, relativos aos carbonos hidroxilados. Além destes, a presença de glicosídeos pode ser destacada pela existência de um sinal em torno de 61 ppm (BORGES, 2008; GIL; GERALDES, 1987). O aspecto geral do espectro obtido neste trabalho apresenta muita semelhança com o espectro equivalente a classe dos carboidratos observados por Lima (2013), podendo ser considerado como o grupo de compostos majoritários presente neste extrato.

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

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

Baseado no resultado obtido pela técnica de RMN e pela técnica DNS, pode-se considerar que o extrato etanólico da casca de laranja avaliado apresenta grande concentração de carboidratos, entre eles os açúcares redutores.

3.2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)

A leitura espectrofotométrica da solução de 1,0 mg/mL do extrato etanólico resultou em uma absorbância de 0,191. Sendo assim, a partir da curva padrão do ácido gálico, este valor de absorbância

indicou a presença de 340,88 mgEAG/100g de extrato etanólico. Quanto à solução de extrato etanólico na diluição 1:100, a qual foi utilizada na formulação dos diluidores testados, o valor de absorvância obtido foi de 1,335 e, a partir da mesma curva padrão, correspondeu a 2003,00 mgEAG/100g de extrato bruto.

O resultado obtido neste trabalho (equivalente a 1,0 mg/mL) apresentou um valor maior de CFT em comparação aos extratos cítricos comerciais (142,19±8,35 mgGAE/g de extrato) avaliados por Fiorentini *et al.* (2022). Quimicamente, o extrato da casca de laranja é caracterizado pela presença de compostos fenólicos de grande poder antioxidante. De uma maneira geral, existe esta correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e a propriedade antioxidante das frutas e hortaliças (KAUR; KAPOOR, 2002). Todavia, outros autores não têm evidenciado esta correlação (ISMAIL; MARJAN; FOONG, 2004). Assim, é necessário que a fim de explicar a capacidade antioxidante de um extrato, deve-se levar em consideração outros fatores além do seu teor de fenólicos totais. Deve-se observar a caracterização da estrutura do composto ativo e sua função biológica (HEINONEN, LEHTONEN, HOPIA, 1998; MELO *et al.* 2018).

3.2.5 Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH

Baseado na curva padrão do Trolox (Apêndice A), as Tabelas 1 e 2 apresentam os valores de equivalente de Trolox para cada concentração do extrato testada pelo método DPPH e dos diluidores T+10%EB e T+20%EB. Os dados obtidos para os diluidores TG+10% e TG+20% não estão descritos pois não foi possível realizar esta análise, devido à presença da gema de ovo que impossibilitou a medição da absorvância. A composição da gema de ovo, rica em proteínas, quando em contato com a solução de DPPH diluída em metanol, desencadeou uma desnaturação proteica, impossibilitando a avaliação espectrofotométrica das amostras.

Tabela 1: Potencial antioxidante pelo método DPPH para o extrato etanólico de casca de laranja

Concentração do extrato bruto	TEAC (µg/mL)
1,0 mg/mL	400,3
2,0 mg/mL	597,1
3,0 mg/mL	768,6

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 2: Potencial antioxidante pelo método DPPH para os diluidores utilizados nas avaliações espermáticas

Diluidores	TEAC (µg/mL)
Tris	0,0
Tris+10%EB	409,0
Tris+20%EB	771,1

Fonte: Autoria própria (2022).

O resultado obtido na concentração de 1,0 mg/mL já demonstra que o extrato etanólico da casca de laranja utilizado neste trabalho possui atividade antioxidante, sendo esta equivalente à 400 µg/mL de Trolox. Quanto aos diluidores que foram de possível avaliação, temos que a solução de Tris de forma isolada não apresentou potencial antioxidante, como esperado. Por outro lado, a adição da solução do extrato etanólico, nas concentrações de 10 e 20%, ofereceram uma atividade antioxidante. Sendo assim, conclui-se que a atividade antioxidante obtida nos diluidores Tris+10%EB e Tris+20%EB é decorrente da ação do extrato bruto e não da solução de Tris.

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

3.2.6 Determinação do potencial hidrogeniônico

O valor do pH obtido para o extrato etanólico foi inicialmente de 5. A Tabela 3 traz o resultado da mensuração do pH do diluidor padrão à base de Tris e gema de ovo (Tris-gema) e dos diluidores formulados com o extrato bruto (EB), respectivamente.

Tabela 3: Valores de pH dos diluidores com o extrato bruto da casca de laranja pera

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

Fonte: Autoria própria (2022).

Já os diluidores adicionados de extrato, tiveram valores de pH maiores, sendo 7 para os grupos adicionados ao Tris-gema, e 6,5 para os grupos adicionados ao Tris.

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

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

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

3.2.7 Testes microbiológicos

3.2.7.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)

Os valores obtidos de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) para os diluidores com o extrato etanólico da casca de laranja estão indicados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4: Concentração inibitória mínima dos diluidores acrescidos de extrato etanólico de casca de laranja

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

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela 5: Concentração bactericida mínima dos diluidores acrescidos de extrato etanólico de casca de laranja

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

Fonte: Autoria própria (2022).

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

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

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

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

3.2.8 Análises espermáticas pré-congelação

3.2.8.1 Avaliação da motilidade espermática

Os valores da média da motilidade espermática no pós-diluição e pós-descongelação estão indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Motilidade total (%) de espermatozoides epididimários bovinos pós-diluição e pós-descongelação com ou sem adição de extrato de casca de laranja

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-diluição (%)	75,0±5,2 ^{aa}	79,1±3,7 ^{aa}	80,8±3,4 ^{aa}	19,1±13,1 ^{ba}	12,5±6,3 ^{ba}
Pós-descongelação (%)	48,3±9,9 ^{ab}	50,8±9,3 ^{ab}	51,6±9,9 ^{ab}	0,6±0,5 ^{bb}	0,0±0,0 ^{bb}

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (0 h ou pós-descongelação) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0 h e pós-descongelação).

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

3.2.8.2 Teste de integridade da membrana plasmática

Os valores da média dos espermatozoides com membrana plasmática não-íntegra no pós-diluição e pós-descongelação estão indicados na Tabela 7.

Tabela 7: Integridade de membrana plasmática (%) de espermatozoides epididimários bovinos pós-diluição e pós-descongelamento com ou sem adição de extrato de casca de laranja

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-diluição (%)	55,8±10,8 ^{aa}	57,0±8,8 ^{aa}	56,8±10,4 ^{aa}	85,0±23,8 ^{ba}	110,0±22,3 ^{ba}
Pós-descongelamento (%)	59,1±6,3 ^{aa}	55,8±4,8 ^{aa}	69,8±5,3 ^{bb}	187,5±6,6 ^{cb}	197,6±1,3 ^{db}

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (0 h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0 h e pós-descongelamento).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos Tris-gema e TG+10%EB, tanto para o tempo 0 h quanto para pós-descongelamento, assim como entre eles. Houve um aumento do número de células com MP não-integra no grupo TG+20%EB após a descongelamento, este aumento se dá em comparação ao grupo controle (Tris-gema) na mesma condição e ao próprio grupo no tempo de 0 h. Quanto aos grupos T+10%EB e T+20%EB, estes apresentaram valores superiores aos outros grupos, tanto no tempo 0 h, quanto após a descongelamento.

Este aumento do número de células com MP não-integra indica que o extrato sozinho, e nestas concentrações testadas, não possui ação protetora de membrana o suficiente para os espermatozoides epididimários bovinos que passarão pelo processo de congelamento.

3.2.8.3 Teste de funcionalidade da membrana plasmática

Os valores da média dos espermatozoides com membrana plasmática funcional (cauda enrolada) no pós-diluição e pós-descongelamento estão indicados na Tabela 8.

Tabela 8: Funcionalidade da membrana plasmática (%) de espermatozoides epididimários bovinos pós-diluição e pós-descongelamento com ou sem adição de extrato de casca de laranja

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-diluição (%)	80,5±4,2 ^{aa}	83,5±5,5 ^{aa}	85,6±4,8 ^{aa}	69,3±7,1 ^{ba}	68,6±11,8 ^{ba}
Pós-descongelamento (%)	46,6±3,6 ^{ab}	39,6±10,6 ^{ab}	34,1±6,9 ^{ab}	8,6±3,9 ^{bb}	4,6±2,0 ^{bb}

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (0 h ou pós-descongelamento) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (0 h e pós-descongelamento).

Dentre um mesmo tempo, não houve diferença ($P > 0,05$) entre o grupo controle e os grupos Tris-gema adicionados do extrato bruto, tanto para 10 e 20%. Contudo, assim como os parâmetros de motilidade e integridade de membrana, houve diferença estatística entre os grupos com apenas o extrato bruto e sem a adição da gema de ovo. Quanto à funcionalidade da membrana plasmática, para estes dois grupos, houve uma diminuição no número de células com membrana plasmática funcional quando em comparação com o controle, tanto para o tempo 0 h e após a descongelamento.

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

3.2.9 Análises espermáticas pós-descongelamento

3.2.9.1 Avaliação dos parâmetros cinéticos

Dos dados obtidos, estão aqui descritos os valores de motilidade total (Tabela 9) e progressiva (Tabela 10).

Tabela 9: Motilidade total (%) de espermatozoides epididimários bovinos pós-descongelamento e após 1 h a 37°C, com ou sem adição de extrato de casca de laranja

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-descongelamento (%)	55,2±20,0 ^{aA}	66,7±15,5 ^{aA}	57,5±9,0 ^{aA}	8,3±2,6 ^b	7,0±3,4 ^b
1 h pós-descongelamento (%)	40,5±15,7 ^{aB}	48,6±17,1 ^{aB}	43,0±8,0 ^{aA}	0,0±0,0	0,0±0,0

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1 h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1 h).

Tabela 10: Motilidade progressiva (%) de espermatozoides epididimários bovinos pós-descongelamento e após 1 h a 37°C, com ou sem adição de extrato de casca de laranja

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-descongelamento (%)	23,8±11,7 ^{aA}	27,2±13,6 ^{aA}	22,03±6,4 ^{aA}	0,1±0,3 ^b	0,1±0,2 ^b
1 h pós-descongelamento (%)	14,2±6,5 ^{aB}	17,4±6,2 ^{aB}	13,5±7,6 ^{aB}	0,0±0,0	0,0±0,0

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1 h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1 h).

Nota-se que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controle (Tris-gema) e os TG+10%EB e TG+20%EB, tanto pós-descongelamento, quanto na análise após 1 h a 37 °C. Houve, por outro lado, uma diferença ($P < 0,05$) entre o mesmo grupo quanto ao tempo, sendo que para os grupos citados, houve uma diminuição da motilidade progressiva e total na avaliação após 1 h. Apenas o grupo TG+20%EB não obteve diferença estatística para motilidade total entre a análise pós-descongelamento e após 1 h.

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

3.2.9.2 Integridade de membrana plasmática (iMP)

Os valores da média dos espermatozoides com membrana plasmática não-integra (corados em vermelho) pós-descongelamento e após 1 h estão indicados na Tabela 11.

Tabela 11: Integridade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários pós-descongelamento e pós 1 h a 37 °C

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-descong.	47,1±7,6 ^{aA}	39,3±9,6 ^{aA}	34,1±16,5 ^{bA}	3,3±2,7 ^c	1,0±2,4 ^c
Após 1h	42,7±11,4 ^{aA}	41,0±14,4 ^{aA}	33,8±11,3 ^{aA}	-	-

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Pós-descong. – Média das células coradas em vermelho pós-descongelamento; Após 1h – Média das células coradas em vermelho após 1h; Dados apresentados quanto ao número de células não-integras em 200 células contadas; Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1h).

Têm-se que não houve diferença ($P > 0,05$) entre o grupo controle (Tris-gema) e o grupo TG+10%EB, tanto após a descongelamento, quanto na avaliação após 1h. Para o grupo TG+20%EB, no pós-descongelamento apresentou um aumento, quando em comparação ao grupo controle, no número de células com membrana plasmática não-integras. Esta diferença estatística não apareceu quanto aos dados obtidos no tempo após 1h. Para T+10%EB e T+20%EB, houve um aumento ($P < 0,05$) no número das células coradas em vermelho, indicando perda da integridade da membrana plasmática nestes grupos. Este resultado apresenta interpretação semelhante ao teste de integridade da membrana plasmática avaliado anteriormente.

3.2.9.3 Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)

Os valores da média dos espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (corados em laranja) pós-descongelamento e após 1h estão indicados na Tabela 12.

Tabela 12: Potencial de membrana mitocondrial (PPM) de espermatozoides epididimários pós-descongelamento e pós 1 h a 37 °C

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-descong.	64,0±28,9 ^{aA}	65,5±17,7 ^{aA}	68,9±22,5 ^{aA}	4,8±3,4 ^b	1,3±1,2 ^b
Após 1h	64,5±28,4 ^{aA}	66,8±18,3 ^{aA}	64,6±26,9 ^{aA}	-	-

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Pós descong. – Média das células coradas em laranja pós-descongelamento; Após 1h – Média das células coradas em laranja após 1h; Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1h).

Para o PPM, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controle (Tris-gema), TG+10%EB e TG+20%EB, tanto para avaliação pós-descongelamento, quanto para o tempo após 1h. Também não houve diferença entre estes dois tempos para um mesmo grupo. Apenas os grupos T+10%EB e T+20%EB apresentaram diferença estatística dos demais, caracterizando uma diminuição do número de células com alto potencial de membrana.

3.2.9.4 Integridade de membrana acrossomal (iAC)

Os valores da média dos espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (corados em verde brilhante) pós-descongelamento e após 1 h estão indicados na Tabela 13.

Tabela 13: Integridade de membrana acrossomal (iAC) de espermatozoides epididimários pós-descongelamento e pós 1 h a 37 °C

	Tris-gema	TG+10%EB	TG+20%EB	T+10%EB	T+20%EB
Pós-descong.	69,5±17,3 ^{aa}	73,4±14,8 ^{aa}	74,5±16,8 ^{aa}	49,1±19,0 ^b	39,1±19,9 ^b
Após 1h	68,2±19,8 ^{aa}	70,9±12,8 ^{aa}	71,9±17,4 ^{aa}	-	-

Fonte: Autoria própria (2022). Legenda: Pós descong. – Média das células com acrossoma íntegro pós-descongelamento; Após 1h – Média das células com acrossoma íntegro após 1h; Letras minúsculas indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos de uma mesma condição (pós-descongelamento ou após 1h) e letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo grupo nas duas condições (pós-descongelamento e após 1h).

Assim como o teste anterior, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos controle (Tris-gema), TG+10%EB e TG+20%EB, tanto logo após a descongelamento, assim como na avaliação após 1h. Também não houve diferença ($P > 0,05$) para estes grupos entre os valores nos dois tempos. Houve diferença estatística para os grupos T+10%EB e T+20%EB, com uma diminuição do número de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra.

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

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

A ausência de proteção às estas estruturas (membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias) está relacionada com a perda da motilidade (total e progressiva) destas células, principalmente quando submetidas à técnica de congelamento (SILVA; GUERRA, 2011).

A adição de substâncias antioxidantes no diluidor seminal é um dos fatores que influenciam a melhora dos parâmetros de avaliação espermática, principalmente quanto à motilidade espermática (total e progressiva) (BOZZI, 2017; DANELUZ, 2016; TONIOLLI, 2012). O aumento destes parâmetros indica um aumento da qualidade do sêmen pós-descongelamento (KALTHUR *et al.*, 2011).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato etanólico da casca de laranja-pera apresenta alta concentração de carboidratos, entre eles os açúcares redutores, alta concentração de compostos fenólicos totais, assim como atividade antioxidante. Apesar do potencial antioxidante, os diluidores formulados com 10 e 20% do extrato adicionados ao Tris-gema não apresentaram melhoria em comparação à sua ausência quanto aos parâmetros de avaliação espermática pós-descongelamento. Os diluidores formulados apenas com Tris e adição do extrato bruto (10 e 20%) não são eficientes na conservação de espermatozoides epididimários submetidos à criopreservação. Apesar dos diluidores testados neste trabalho não apresentarem atividade crioprotetora, é necessário um aperfeiçoamento das metodologias utilizadas no



preparo dos diluidores, além de novos testes com diferentes concentrações do extrato etanólico, a fim de avaliar mais profundamente seu potencial crioprotetor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Paraíba pelo apoio financeiro para a execução deste projeto (Chamada Interna de Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB nº 03/2020).



REFERÊNCIAS

- AHMED, I. *et al.* Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v.9, n. 2, p. 148-154, 2016.
- ALMEIDA, F.C. *et al.* Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. *Andrologia*, v.49, p.e12623, 2017.
- ARAÚJO SILVA, R.A.J. *et al.* Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat sêmen related with seminal plasma removal. *Animal Reproduction*, v.16, p.895–901, 2019.
- ARRUDA, R.P. *et al.* Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 2, p.145-151, 2011.
- ASOKAN, G. V. *et al.* WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of MedlinePubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Medical Journal*, v. 34, n. 3, p. 184-193, 2019.
- AYALA, J.R. *et al.* Characterization of Orange Peel Waste and Valorization to Obtain Reducing Sugars. *Molecules*, v. 26, n. 1348, 2021.
- BABA, J. *et al.* Antibacterial activity of sweet Orange *Citrus sinensis* on some clinical Bacteria species isolated from wounds. *Journal of Family Medicine and Community Health*, v. 5, n. 4, 2018.
- BERNARDI, J. *et al.* Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening. *Journal of Plant Physiology*, v. 167, n. 4, p. 301-310, 2010.
- BORGES, J. C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro. Mestrado em Medicina Veterinária (Dissertação), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP, 2008.
- BOZZI, A. R. Adição de sucos de frutas e beterraba no diluente de sêmen criopreservado ovino. Dissertação (Mestrado) – APTAA/SAA, 2017.
- BRAND-WILLIAMS, W. *et al.* Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. 2010. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm>
- CARVALHO, V.H.S.; PINTO, S.C.C.; CARMO, R.B. Impacto das biotécnicas da reprodução animal e o melhoramento genético na pecuária de corte. *Pubvet*, v. 17, n. 08, p. e1427, 2023. DOI: 10.31533/pubvet.v17n8e1427. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/3201>. Acesso em: 23 set. 2024.
- CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal: manual de orientação. CBRA: Belo Horizonte, 3ª edição, 2013.
- CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2024. Panorama do Agro. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>. Acesso em: 23 set. 2024.



DANELUZ, L. O. Efeito dos compostos fenólicos Quercetina e Kaempferol sobre a função espermática bovina. TCC (Graduação) – UFP, 2016.

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

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

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

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

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

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

GENHARTDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KIEG, N. R. *Methods for general and molecular bacteriology*. 1 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 791p.

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

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

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

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

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*. v. 37, p. 153-161, 2002.

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

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



- MELO, E. A. *et al.* Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 2, 2018.
- MELO, M. S. da S.; *et al.*. Efeito da adição do extrato de capim-santo (*Cymbopogon citratus*) sobre a refrigeração de espermatozoides epididimários bovinos. *Cuadernos de Educación y Desarrollo*, [S. l.], v. 16, n. 2, p. e3505, 2024. DOI: 10.55905/cuadv16n2-122. Disponível em: <https://cuadernoseducacion.com/ojs/index.php/ced/article/view/3505>.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORAES, C. R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Animal Reproduction Science*, v. 194, p. 71–80, 2018.
- NWANKWO, I.U.; ONWUAKOR, C.E.; ANINWEZE, O.N. Antibacterial activity of Ethanolic extracts of *Citrus sinensis* peels on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, v. 3, n. 4, p. 941-947, 2014.
- OIKEH, E.I.; ORIAKHI, K.; OMOREGIE E.S. Proximate analysis and phytochemical screening of *Citrus sinensis* fruit wastes. *The Bioscientist*, v. 1, n. 2, p.164–170, 2013.
- OIKEH, E.I *et al.* Quantitative phytochemical analysis and antimicrobial activities of fresh and dry ethanol extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet Orange) peels. *Clinical Phytoscience*, v. 6, n. 46, 2020.
- OLIVEIRA, E. M. D. Perfil de compostos fenólicos do suco de laranja Pera Rio orgânica. *Dissertação (Mestrado) – FCFAR*, 2017.
- PAVIA, D. L. *et al.* *Introdução à Espectroscopia*. São Paulo: Cengage Learning, 4ª Ed, 2016.
- PEI, Y. *et al.* Compositional Analysis of Four Kinds of Citrus Fruits with a NMR-Based Method for Understanding Nutritional Value and Rational Utilization: From Pericarp to Juice. *Molecules*, v. 27, n. 2579, 2022.
- RAHMAN, S. *et al.* Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water. *Bangladesh Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 10, n. 10, 2011.
- RIVAS, B. *et al.* Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 2380-2387, 2008.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SANTOS, E. R. Q. Óleos essenciais ricos em linalol (*aniba rosaeodora*, *a. parviflora* e *aeollanthus suaveolens*) na amazônia e seus efeitos neurocomportamentais em roedores. *Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Pará*, 2017.
- SHETTY, S. B. *et al.* Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental caries bacteria: An in vitro study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, v.8, n.1, p.71-77, 2016.



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

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

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

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

TORRADO, A.M. *et al.* Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 394-409, 2011.

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