



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019003600-1 A2



(22) Data do Depósito: 22/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 29/09/2020

(54) Título: DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO

(51) Int. Cl.: A01N 1/02.

(52) CPC: A01N 1/0215; A01N 1/0221; A01N 1/0226.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): RAQUEL PEREIRA FREITAS DA SILVA; RANILSON DE SOUZA BEZERRA; MARIA MADALENA PESSOA GUERRA; THIAGO BARBOSA CAHU; JULIANNE CORTIZO GONZALEZ; THALLES CLOVES MACIEL DE MOURA; ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA.

(57) Resumo: DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO. A presente invenção trata de um diluente para criopreservação do sêmen, contendo derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes; e seu processo de preparação. O diluente proposto promove efeitos benéficos nos parâmetros de motilidade, estabilidade e viabilidade espermática, podendo ser utilizado para prolongar a vida funcional do espermatozoide criopreservado e melhorar o seu desempenho reprodutivo. A invenção contribui para a eficiência dos atuais procedimentos de criopreservação empregados no campo técnico da reprodução assistida.

“DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO
CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE
PREPARAÇÃO DO MESMO”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve uma composição de diluente para criopreservação de sêmen e seu processo de preparação, contendo pelo menos um derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes. Esta composição pode ser utilizada sob diferentes condições de criopreservação visando prolongar a vida funcional dos espermatozoides, com aplicação no campo técnico da reprodução assistida, mais especificamente, no campo da tecnologia de criopreservação do sêmen.

Antecedentes da Invenção

[002] O avanço das investigações a respeito da tecnologia de criopreservação aplicada ao sêmen visando à melhoria da qualidade e viabilidade do sêmen tem ganhado notoriedade nos últimos anos, devido aos danos significativos sofridos pelos espermatozoides decorrentes, principalmente, de espécies reativas ao oxigênio geradas durante o procedimento (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009; GÓMEZ-TORRES et al., *Cryobiology*. 78:90-94, 2017; TONIOLLI & COSTA, *Investigação*. 16(8):22-29, 2017). A injúria oxidativa compromete a fertilidade da célula espermática e a eficiência dos resultados obtidos após os procedimentos de criopreservação (SOARES & GUERRA, *Tecnol. & Ciênc. Agropec.* 3(2):53-63, 2009). As propostas de aperfeiçoamento envolvendo a inclusão de substâncias antioxidantes aos diluentes para criopreservação de sêmen com o intuito de minimizar estes efeitos adversos e favorecer o desempenho do espermatozoide criopreservado tem sido amplamente estudadas, no entanto, ainda tem gerado resultados controversos e alguns inconvenientes por conta das particularidades das substâncias com ação protetora que

são utilizadas (SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; SAEEDNIA et al., *Reprod. Biol. Endocrin.* 14(1):29, 2016). Diante disto, torna-se importante desenvolver diluentes que promovam melhores condições de conservação e mantenham eficientemente o potencial de fertilização dos espermatozoides submetidos à criopreservação.

[003] A criopreservação do sêmen é uma das tecnologias de reprodução assistida (ARTs) que permite a conservação do gamoplasma masculino por um período prolongado, em condição de baixa temperatura, fora do trato reprodutivo animal (MOURA, SOUZA & SCHEFFER, *Rev. SBPH.* 12(2):23-42, 2009; TSAI & LIN, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55(3):425-434, 2012). Esta tecnologia tem como princípio básico a redução reversível da atividade metabólica e da motilidade dos espermatozoides por meio da diminuição gradativa da temperatura, podendo ser empregada de duas formas básicas: refrigeração ou congelamento do sêmen (YOSHIDA, *Anim. Reprod. Sci.* 60:349-355, 2000).

[004] Além de proporcionar a estocagem do sêmen por um longo período de tempo, a criopreservação do sêmen permite o uso do volume total do sêmen (maximiza o poder reprodutivo do macho), quesito importante quando o sêmen é de difícil obtenção; disponibiliza sêmen em períodos menos favoráveis, fora da estação reprodutiva fisiológica do animal (quando o volume e a qualidade do sêmen tendem a diminuir), e após a morte do animal; favorece a rápida difusão de material genético entre locais distantes; reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores; e minimiza o risco de propagação de doenças, através da erradicação do contato direto entre macho e fêmea (VARAGO et al., *Ciênc. Anim. Bras.* 1:1-17, 2009; SILVA & GUERRA, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35(4):370-384, 2011; GIBB, & AITKEN, *J. Equine Vet. Sci.* 43:S29-S36, 2016). Esta tecnologia tem sido essencial para a aplicação das técnicas de reprodução, tais como: inseminação artificial, fertilização *in vitro*, sexagem de esperma e engenharia genética, seja ela destinada a animais de interesse econômico, espécies ameaçadas de extinção ou ao tratamento da infertilidade masculina em humanos (GELAYENEW & ASEBE, *Global Journals Inc.* 16(8):51-56, 2016; GIBB & AITKEN, *J. Equine Vet. Sci.* 43:S29-S36, 2016; TORRA-MASSANA & ESBERT, *J.*

Reprod. Med. Clin. Embry. 3(3):159-168, 2016; COMIZZOLI, *Anim. Reprod.* 14(1):30-33, 2017).

[005] O espermatozoide é considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil quando possui morfologia, atividade metabólica e membranas íntegras (SILVA, *Dissertação de Mestrado*, USP, 2011). As organelas da célula espermática estão envolvidas por membranas que são particularmente vulneráveis a criopreservação, as membranas espermáticas mais afetadas por este procedimento, incluem: a membrana plasmática, a membrana acrossomal externa e as membranas mitocondriais (WATSON, *Reprod. Fert. Develop.* 7(4):871-891, 1995). A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização possam ocorrer, como: o metabolismo para produção de energia e sustento do movimento espermático, a capacitação espermática, a penetração do espermatozoide nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oócito (ARRUDA et al., *Acta Sci. Vet.* 33(1):145-150, 2005). Dessa forma, a criopreservação ideal do sêmen deve manter o maior número possível de células viáveis, bem como a integridade das suas diferentes estruturas (WATSON, *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-492, 2000).

[006] Com o intuito de propiciar um ambiente favorável às células espermáticas após sua colheita, nas condições térmicas do procedimento, foram desenvolvidos os diluentes para criopreservação do sêmen que, além de contribuírem para a manutenção da viabilidade dessas células, possibilitam o aumento volumétrico do ejaculado (MIES FILHO, *Reprodução dos animais e inseminação artificial*, 5(1-2):783, 1982). Os constituintes básicos destes diluentes, incluem: açúcares (p. ex. glicose e frutose) que servem de fonte energética aos espermatozoides; agentes tamponantes (p. ex. citrato de sódio e Tris) que ajustam possíveis alterações do potencial de hidrogênio (pH) dentro dos padrões fisiológicos da espécie; substâncias iônicas e aniônicas que asseguram a pressão osmótica aproximada ao sêmen puro; crioprotetores, classificados em função da sua capacidade de atravessar a membrana espermática em: penetrantes (p. ex. glicerol, dimetilsulfoxido, dimetilformamida, acetamida, lactamida) e não penetrantes (p. ex. lipoproteínas da gema de ovo, e lactose e as caseínas do leite), que atuam na

redução dos efeitos negativos ocasionados pelo processo de resfriamento do sêmen e na proteção contra a formação de cristais de gelo intracelular; e antibióticos (p. ex. penicilina, estreptomicina e gentamicina) que inibem o crescimento bacteriano (EVANS & MAXWELL, *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*, 2:194, 1987; SILVA; CARDOSO & SILVA, *Ciência Animal*. 11(2):119-129, 2001).

[007] Contudo, os atuais métodos de processamento do sêmen para criopreservação ainda carecem de aperfeiçoamentos, uma vez que os procedimentos empregados, seja na refrigeração ou congelação, submetem as células espermáticas a etapas e condições atípicas, as quais envolve: manipulação do sêmen, exposição a temperaturas não fisiológicas, exposição a crioprotetores que ocasionam estresse osmótico e tóxico, e alta concentração espermática nas doses de sêmen (WATSON, *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-492, 2000; SILVA & GUERRA, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35(4):370-384, 2011; GÓMEZ-TORRES et al., *Cryobiology*. 78:90-94, 2017). Estes fatores induzem à geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS, de *reactive oxygen species*) que comprometem a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (WATSON, *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-492, 2000; GUERRA, EVANS & MAXWELL, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 28:187-195, 2004).

[008] Apesar do plasma seminal apresentar diferentes sistemas de defesa antioxidante que fornecem proteção ao espermatozoide e compensam a baixa concentração dos antioxidantes endógenos no seu citoplasma reduzido, quando o sêmen é lavado ou diluído, durante o processamento do sêmen para a criopreservação, ocorre uma redução de parte dessa proteção antioxidante fornecida pelo plasma seminal, tornando o espermatozoide vulnerável à ação de ROS (CARVALHO et al., *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 38:33-38, 2002; SIKKA, *J. Androl.* 25(1):5-18, 2004; SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012).

[009] A célula espermática é capaz de gerar e degradar ROS, as quais, em concentração reduzida, são necessárias à sua função fisiológica normal (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009). Nesta célula, as ROS desempenham papéis primordiais na capacitação espermática, regulação da taxa de

hiperativação, reação acrossômica e fusão dos pronúcleos do espermatozoide e oócito (SENGOKU et al., *Fertil Steril*. 69(3):522-527, 1998; NICHII, *Tese de Doutorado*, USP, 2003). Contudo, concentrações elevadas de ROS tem efeito prejudicial ao espermatozoide, pois desencadeiam uma cascata de peroxidação lipídica causando alterações nos componentes de membrana, provocando sua desestabilização, ruptura, perda de fluidez e da capacidade de regulação de íons envolvidos no controle do movimento espermático, resultando em declínio da motilidade, da viabilidade e, por fim, da sua função de fertilização (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009; COCCHIA et al., *Theriogenology*. 75(7):1201-1210, 2011). Estes fatores infligem danos funcionais irreversíveis à célula espermática e compromete a qualidade do sêmen (TONIOLLI & COSTA, *Investigação*. 16(8):22-29, 2017).

[010] Diante desta realidade, tem sido proposta a intervenção terapêutica com antioxidantes nos diluentes para criopreservação do sêmen como forma de aprimorar esta técnica e garantir melhor desempenho do espermatozoide criopreservado (SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; SAEEDNIA et al. *Reprod. Biol. Endocrin.* 14(1):29, 2016).

[011] O termo antioxidante abrange um conjunto heterogêneo de moléculas e substâncias químicas que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem prevenir ou reduzir os danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, com formação concomitante de produtos de baixa ou nenhuma toxicidade (DUARTE-ALMEIDA et al., *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(2):446-452, 2006; MAGALHÃES et al., *Anal. Chim. Acta*. 613(1):1-19, 2008; OLIVEIRA et al., *Quim. Nova*. 32(3):689-702, 2009). Os antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir, por mecanismos distintos, em diversas etapas do processo oxidativo: 1) prevenindo a produção das ROS; 2) interceptando as ROS produzidas pelo metabolismo celular ou fontes exógenas, impedindo que afetem os lipídeos, aminoácidos, as duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases de DNA; 3) reparando lesões, processo relacionado à remoção de danos ao DNA e

reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCHI & ANTUNES, *Rev. Nutr.* 12(2):123-130, 1999; LOBO et al., *Pharmacogn. Rev.* 4(8):118-126, 2010).

[012] Substâncias de origem natural ou sintética, de natureza lipofílica ou hidrofílica, enzimáticas ou não enzimáticas, apresentam potencial para atuar como antioxidantes no meio biológico, dentre elas estão: enzimas (p. ex. Glutathione Peroxidase, Catalase e Superóxido Dismutase); vitaminas e seus derivados (p. ex. ácido ascórbico e tocoferóis); compostos fenólicos que abrangem, principalmente, os flavonoides (p. ex. catequina, catequina-galato, quercetina, kaempferol e miricetina); carotenoides (p. ex. licopeno, β -caroteno, xantofilas, zeaxantina, cantaxantina e luteína); ácidos orgânicos naturais (p. ex. ácido gálico e ácido ferúlico) e alguns polissacarídeos bioativos de organismos vegetais e animais (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, *Visão Acadêmica.* 5(1):33-40, 2004; YEN, YANG & MAU, *Carbohydr. Polym.* 74(4):840-844, 2008; CAROCHO & FERREIRA, *Food. Chem. Toxicol.* 51:15-25, 2013; GUO, *J. South. Agric.* 44(3):493-496, 2013).

[013] Diversos estudos empenharam-se em melhorar a qualidade do sêmen criopreservado por meio da inclusão de antioxidantes aos diluentes seminais de diversas espécies de animais, em suínos (BURANAAMNUAY et al., *Anim. Reprod. Sci.* 127(1-2):56-61, 2011), bovinos (SARIÖZKAN et al., *Cryobiology.* 68(1):129-133, 2014), caninos (LUCIO et al., *Cryobiology.* 72(2):135-140, 2016), peixes (LIU et al., *Fish Physiol. Biochem.* 41(2):413-422, 2015), equinos (FRANCO et al., *J. Equine Vet. Sci.* 33(10):787-793, 2013), ovinos (ARRUDA et al., *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70:153-159, 2018) caprinos (SEIFI-JAMADI et al., *Cryobiology.* 75:15-20, 2017) e humanos (ZHANG et al., *Zygote.* 24(2):293-300, 2015).

[014] Apesar dos avanços nos protocolos de criopreservação, tanto em aditivos antioxidantes, quanto em métodos de processamento, ainda têm sido constatados resultados controversos e alguns inconvenientes nas diferentes substâncias antioxidantes atualmente empregadas, tais como: (1) efeitos deletérios em determinadas concentrações; (2) instabilidade às condições do processo; (3) dependência de metais para atuação; (4) conversão em pró-oxidantes quando exposto

a metais ou em doses elevadas; e (5) baixa durabilidade (SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; SAEEDNIA et al., *Reprod. Biol. Endocrin.* 14(1):29, 2016).

[015] Desta forma, nota-se que a proteção adicional às células espermáticas durante os procedimentos de criopreservação estabelecidos ainda constitui um desafio. Dentro desta abordagem e tendo em vista as limitações técnicas do procedimento, a presente invenção vem solucionar os problemas mencionados quando propõe um diluente para criopreservação de sêmen constituído essencialmente de derivados de quitosana em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico.

[016] A quitosana é descrita como uma família de polissacarídeos de cadeia linear composta de unidades monoméricas de D-glucosamina (GlcN) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), em quantidades e sequência variáveis, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (RINAUDO, *Prog. Polym. Sci.* 31(7):603–632, 2006). Embora possa ser encontrada de modo natural na parede de fungos dos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*, o modo mais comum de obtê-la é a partir de uma reação de N-desacetilação da quitina (SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA, *Quim. Nova.* 29(4):776-785, 2006). A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na Terra com vasta distribuição na natureza, constituindo o principal componente estrutural em invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos, celenterados, diatomáceas e fungos (KURITA, *Mar. Biotechnol.* 8(3):203-226, 2006; DIAS et al., *J. Biotec. Biodivers.* 4(3):184-191, 2013).

[017] Na reação de N-desacetilação da quitina, que pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, os grupos acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) presentes na estrutura da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a quitosana (YOUNES & RINAUDO, *Mar. Drugs.* 13(3):1133-1174, 2015). O produto desta reação pode apresentar grau de médio de desacetilação (GD), expresso em percentagem molar, de 40% a 98% e massa molecular de 50.000 a 2.000.000 Da (HEJAZI & AMIJI, *J. Control. Release.* 89(2):151-165, 2003).

[018] O GD é o parâmetro que determina o conteúdo de grupos amínicos livres nos polissacarídeos e desempenha um papel primordial na determinação das

características químicas da quitosana, como as propriedades ácido-base e solubilidade (KHAN, PEH & CH'NG, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5(3):205-212, 2002; DAMIAN et al. *Alim. Nutr.* 16(2):195-205, 2005; HÉLIO et al., *Quim. Nova.* 29(4):776-785, 2006; DIAS et al., *J. Biotec. Biodivers.* 4(3):184-191, 2013). A solubilização da quitosana em meios aquosos ocorre pela protonação do grupo amino ($-NH_2$) do carbono 2 (C-2) dos resíduos de D-glucosamina, que confere a este polissacarídeo características policatiónicas e permite sua solubilidade em meio ácido ($pH \leq 6,0$), dado que o pK_a do grupo amino da glucosamina é de 6,3, e insolubilidade em meio neutro e alcalino ($pH \geq 7,0$) (KLINKESORN, *Food Rev. Int.* 29(4):371-393, 2013).

[019] A quitosana é reconhecidamente um polissacarídeo atóxico, biocompatível, biodegradável e antioxidante (AZEVEDO et al., *Rev. Eletrônica Mat. Process.* 2(3):27-34, 2007; DIAS et al., *J. Biotec. Biodivers.* 4(3):184-191, 2013). Seu potencial antioxidante tem sido atribuído à presença, em sua estrutura, de grupos funcionais reativos, um grupo amino, bem como dois grupos hidroxil nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente (ARANAZ et al., *Curr. Chem. Biol.* 3(2):203-230, 2009). Estes grupos possuem a capacidade de doar prótons e, assim, converter radicais livres instáveis em moléculas estabilizadas (KIM & RAJAPAKSE, *Carbohydr. Polymer.* 62(4):357-368, 2005; ARANCIBIA et al., *Food Hydrocoll.* 35:710-717, 2014). Outro mecanismo relatado está relacionado a capacidade da quitosana de mobilizar íons metálicos (que são capazes de interagir com radicais relativamente não-reativos e transformá-los em reativos) para a formação de complexos solúveis e estáveis (ADJIMANI & ASARE, *Toxicol. Rep.* 2:721-728, 2015).

[020] A partir de diversos estudos em culturas de células e modelos animais, foram descritas propriedades adicionais da quitosana, dentre elas: antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, analgésica, hemostática, anti-inflamatória, cicatrizante e bioadesiva (KURITA, *Mar. Biotechnol.* 8(3):203-226, 2006; WIJESEKARA, PANGESTUTI & KIM, *Carbohydr. Polymer.* 84(1):14-21, 2011).

[021] O potencial deste polissacarídeo versátil pode ser ainda mais explorado quando considerados os grupos funcionais reativos distribuídos na sua matriz

polimérica, os quais permitem inúmeras modificações químicas de substituição de grupos químicos, de alongamento de cadeia e de despolimerização (PRASHANTH & THARANATHAN, *Trends Food Sci. Tech.* 18(3):117-131, 2007). Como exemplo de tais modificações químicas, podem ser citadas as reações de quaternização, alquilação, carboxilação, acilação, ftalilação, sulfatação, sililação, tosilação, tiolação, glicosilação, fosforilação e amidação (KURITA, *Mar. Biotechnol.* 8(3):203-226, 2006; ZARGAR, ASGHARI & DASHTI, *ChemBioEng Rev.* 2(3):204-226, 2015). Estas reações são realizadas por meio de processos químicos, físicos ou enzimáticos entre os grupos amino e hidroxil da quitosana e reagentes adequados com o propósito de melhorar a efetividade das propriedades originais da quitosana ou introduzir características específicas, além de permitir sua solubilidade aquosa numa faixa mais ampla de pH, incluindo a faixa neutra (MOURYA & INAMDAR, *React. Funct. Polym.* 68(6):1013-1051, 2008). Os produtos resultantes destas referidas intervenções químicas são chamados de “derivados de quitosana”, e estes ampliam, significativamente, as perspectivas de uso da quitosana nos mais diversificados setores (SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA, *Quim. Nova.* 29(4):776-785, 2006).

[022] Com base nas propriedades intrínsecas mencionadas acima, o emprego dos derivados de quitosana tem sido sugerido e empregado com eficácia e segurança em uma grande variedade de propósitos como, por exemplo, no tratamento de águas contaminadas (PI 04043090 A2 (2004)); biomateriais (PI 04179749 A2 (2004)); composições cosméticas (PI 08041504 A2 (2008)); aditivos agrícolas (PI 09002073 A2 (2009)); biofungicidas (BR 1020120238594 A2 (2012)); tratamento farmacológico (BR 1120160037251 A2 (2014)); regeneração de tecidos (BR 1020150293577 A2 (2015)); e conservação de alimentos (CN 107586800 A (2017)).

[023] Um estudo conduzido por Silva (*Dissertação de Mestrado*, UFPE, 2014) revelou que os derivados quitosana carboximetilada, quitosana sulfatada, quitosana carboximetilada e sulfatada, e quito-oligossacarídeo exibiram propriedades funcionais relevantes, como atoxicidade, atividade antioxidante e efeito bacteriostático, apresentando, desta forma, potencial para contribuir significativamente como um

ingrediente ou suplemento alternativo em abordagens alimentar, biomédica, farmacêutica e biotecnológica.

[024] Na presente proposta, os componentes gema de ovo e ácido cítrico apresentam propriedades e funções benéficas específicas nos diluentes para criopreservação do sêmen. Substâncias presentes na constituição da gema de ovo promovem intervenções essenciais no espermatozoide durante o armazenamento do sêmen sob baixas temperaturas, garantindo proteção contra a ação deletéria do frio, redução nas perdas de enzimas acrossomais e prevenção de mudanças degenerativas do acrossoma (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000). O ácido cítrico, por sua vez, além de possuir ação antioxidante, atua na estabilização do pH e auxilia na manutenção do equilíbrio osmótico do diluente de criopreservação de sêmen (SILVA, *Tese de Doutorado*, UECE, 2005).

[025] O requerente verificou que o diluente que apresenta, em sua constituição, uma associação que alia as propriedades dos derivados de quitosana, da gema de ovo e do ácido cítrico origina uma composição antioxidante e crioprotetora que pode ser eficientemente capaz de manter parâmetros primordiais para a persistência do potencial de fertilização dos espermatozoides, após a condição de criopreservação. A invenção proporciona redução dos prejuízos ocasionados pelo método sobre a motilidade, estabilidade e viabilidade espermática, oferece uma alternativa eficaz aos diluentes para criopreservação de sêmen atualmente disponíveis, e contribui para a eficiência dos procedimentos de preservação empregados no campo técnico da reprodução assistida.

[026] Estudos envolvendo a inclusão de substâncias antioxidantes e crioprotetoras aos diluentes para preservação de sêmen visando combater os danos oxidativos às células espermáticas durante o procedimento de criopreservação foram desenvolvidos, e são apresentados em algumas patentes e artigos científicos descritos a seguir:

[027] O documento RU 2223718 C2 (2002) revela um método de processamento para sêmen bovino, compreendendo diluição do sêmen em meio crioprotetor à base de

lactose-glicerol-gema, seguido de etapa de equilíbrio e congelação em vapor de nitrogênio líquido, caracterizado pela introdução de 0,1 a 0,3% de quitosana succinato ao meio de diluição do sêmen. O método minimiza o dano biológico ocasionado às estruturas membranosas dos espermatozoides durante o congelamento e aumenta sua viabilidade após o descongelamento. O documento difere da presente invenção por apresentar uma formulação crioprotetora distinta qualitativamente da presente invenção, a qual não contém ácido cítrico na constituição do meio de diluição do sêmen, e integra a lactose e o glicerol na mesma. Estes dois últimos componentes não constam na composição para criopreservação de sêmen proposta na presente invenção.

[028] O documento EP 1627565 A1 (2004) descreve um meio para armazenar amostra biológica, incluindo espermatozoides, em estado refrigerado, congelado ou vitrificado. O referido meio compreende uma solução salina balanceada e um 4-tioderivado de flavan-3-ol com efeito crioprotetor. A invenção promove recuperação da motilidade espermática de alta qualidade pós-descongelamento. O documento difere da presente invenção por apresentar uma formulação de preservação caracterizada pela inclusão de flavonoides e não fazer qualquer referência a incorporação de derivados de quitosana na mesma.

[029] Hu et al. (*Cryobiology*. 59:244-249, 2009) investigaram os efeitos crioprotetores do polissacarídeo extraído da planta herbácea *Gynostemma pentaphyllum* (GPP) sobre a qualidade do sêmen suíno congelado-descongelado. O diluente de criopreservação de sêmen foi constituído de: Tris, ácido cítrico, glicose, antibiótico, gema de ovo, GPP e glicerol. A suplementação do diluente com GPP proporcionou melhoras nos parâmetros de qualidade de sêmen, como: motilidade espermática, integridade de membrana, integridade do acrossoma e atividade mitocondrial. Os efeitos da adição de outros polissacarídeos presentes na alga *Laminaria japonica* (HU et al., *Anim. Reprod. Sci.* 139:95-100, 2013) e em plantas da espécie *Salvia miltiorrhiza* (SHEN et al., *Anim. Reprod. Sci.*, 159:25-30, 2015) e *Rhodiola rosea* (YANG et al., *Carbohydr. Polym.* 135:44-47, 2016) em diluentes com constituição semelhante ao desenvolvido no estudo acima descrito também foram investigados e apresentaram

resultados similares. Os documentos diferem da presente invenção por conterem polissacarídeos estruturalmente distintos dos derivados de quitosana, além de incluírem glicerol como crioprotetor na constituição do diluente para preservação de sêmen.

[030] O documento US 20170367324 A1 (2011) descreve composições e métodos para o tratamento do sêmen processado, com propósito de aumentar qualidade dos espermatozoides, incluindo sua viabilidade, motilidade, fertilidade, integridade do DNA e longevidade *in vitro*. A invenção compreende diluição do sêmen em meio constituído de: Tris, vitamina B12 e alfa-cetoglutarato e glicerol, podendo também incluir substâncias orgânicas, como: monossacarídeos e dissacarídeos, gema de ovo, leite, albumina e antibióticos. O documento difere da presente invenção por agregar vitamina B12, alfa-cetoglutarato e glicerol nas composições, além de não conterem qualquer derivado de quitosana, juntamente com o ácido cítrico nas mesmas.

[031] O documento WO 2016009363 A1 (2014) descreve um diluente para a proteção, preservação e criopreservação de sêmen, contendo pelo menos um agente citoprotetor do grupo isopropilfenol, juntamente com agentes crioprotetores e coadjuvantes. O diluente, de acordo com este documento, contém: leite semidesnatado, caseinatos de sódio, sacarose, frutose, glicose, antibiótico, derivados de isopropilfenol (timol, carvacrol, isoespintanol e misturas destes), gema de ovo e dimetilformamida. A invenção reduz o estresse oxidativo no sêmen e prolonga a sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides após a criopreservação. O documento difere da presente invenção, principalmente, pela inclusão dos compostos fenólicos na proposta do diluente; além de não apresentarem qualquer derivado de quitosana, juntamente com o ácido cítrico, associado a gema de ovo na mesma.

[032] Júnior et al. (*Rev. Bras. Ciênc. Vet.* 22(2):114-118, 2015) avaliaram os efeitos da adição de tocoferol (vitamina E) ao diluidor de congelação de sêmen bovino quanto a redução dos danos causados pelo estresse oxidativo, melhoria da capacidade fertilizante do sêmen e taxas de prenhez após inseminação artificial. O diluente foi constituído de: Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo, antibiótico, glicerol e tocoferol. A adição de tocoferol ao meio crioprotetor do sêmen não melhorou a qualidade do

sêmen congelado, nem a taxa de prenhez após a inseminação artificial. O documento difere da presente invenção por apresentar tocoferol e glicerol na constituição do diluente e não envolver qualquer derivado de quitosana na mesma.

[033] O documento BR 1120160279980 A2 (2015) propõe a enzima antioxidante aleno óxido sintase como um conservante para sêmen fresco ou congelado nos procedimentos reprodutivos assistidos em seres humanos e outros animais. A invenção proporciona maior tolerância e estabilidade do esperma ao processamento e criopreservação. O documento difere da presente invenção por apresentar uma composição caracterizada pela presença da aleno óxido sintase e não abranger qualquer associação de derivado de quitosana com a gema de ovo e o ácido cítrico na mesma.

[034] Kia et al. (*Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 6(4):783-789, 2016) relataram os efeitos do extrato da planta aromática *Origanum vulgare*, detentor de altos níveis de compostos fenólicos, sobre os parâmetros de qualidade do sêmen congelado-descongelado em touros. O diluente para criopreservação foi constituído de: citrato de sódio, antibiótico, gema de ovo, glicerol e extrato de *Origanum vulgare*. Os autores obtiveram melhora na motilidade, viabilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides após descongelamento do sêmen. Um estudo semelhante foi realizado por Sobeh et al. (*Molecules.* 22(11):1993, 2017) envolvendo extrato de folhas de *Albizia harveyi*. De acordo com esta investigação, o diluente para criopreservação foi constituído de: Tris, ácido cítrico, frutose, glicerol, gema de ovo, antibiótico e extrato de *Albizia harveyi*. Ambos os diluentes propostos promoveram melhora nos parâmetros de motilidade espermática, viabilidade e integridade de membrana dos espermatozoides. Os documentos diferem da presente invenção por apresentarem uma formulação para preservação de sêmen baseada na incorporação de extratos vegetais ricos em compostos fenólicos, bem como não conterem qualquer derivado de quitosana associado ao ácido cítrico e a gema de ovo na mesma.

[035] Souza et al. (*Biopreserv. Biobank.* 15(3):220-227, 2017) investigaram o efeito da adição do carotenoide cantaxantina a um diluente de criopreservação de sêmen ovino. A preparação do diluente consistiu de: Tris, ácido cítrico, frutose, gema de

ovo, glicerol e cantaxantina. Os resultados deste estudo revelaram que o diluente produzido é capaz de proteger os espermatozoides ovinos de alterações cinéticas pós-descongelamento, contudo não foi observado efeito sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, produção de ROS intracelular em espermatozoides viáveis e peroxidação lipídica. O documento difere da presente invenção por apresentar uma formulação de criopreservação caracterizada pela inclusão de carotenoides e glicerol, e não fazer qualquer referência ao acréscimo, no referido diluente, de derivados de quitosana.

[036] Ardeshirnia, Zandi & Sanjabi (*S. Afr. J. Anim. Sci.* 47(2):237-244, 2017) avaliaram os efeitos da quercetina, como um suplemento antioxidante, na qualidade de espermatozoides descongelados de carneiros. O diluente foi constituído de: Tris, ácido cítrico, glicose, glicerol gema de ovo, antibiótico e quercetina. Este estudo revelou que a suplementação com quercetina aumentou significativamente a quantidade de espermatozoides viáveis após o descongelamento, embora não tenha exercido efeitos nos parâmetros de motilidade total e progressiva dos mesmos. Arruda et al. (*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70:153-159, 2018) avaliaram o efeito da miricetina no diluente de sêmen ovino contra os danos ocasionados aos espermatozoides congelados-descongelados. O diluente de criopreservação do sêmen foi constituído de: Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo, glicerol, antibiótico e miricetina. Os resultados deste estudo evidenciaram que a suplementação do diluidor com 10 e 100nM de miricetina afetou a cinética espermática sem provocar alterações na estrutura geral do gameta, enquanto que maiores concentrações acarretam efeitos adversos sobre os espermatozoides, associados ao dano peroxidativo. Os documentos diferem da presente invenção por incorporarem flavonoides e glicerol na formulação do diluente para criopreservação, além de não apresentarem derivados de quitosana na mesma.

[037] De acordo com o exposto, os ensinamentos descritos na presente invenção não foram antecipados, de forma que o diluente para criopreservação do sêmen e seu processo de preparação aqui propostos representam novidade frente ao atual estado da técnica.

Descrição da Invenção

[038] O diluente para criopreservação de sêmen revelado na presente invenção compreende ao menos um derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes. Esta formulação pode ser utilizada para prolongar a vida funcional dos espermatozoides, com menor comprometimento na estrutura espermática decorrente do procedimento de criopreservação do sêmen; e garantir melhor desempenho reprodutivo do espermatozoide criopreservado.

[039] A invenção poderá ser melhor compreendida pela descrição detalhada abaixo.

[040] O diluente para criopreservação de sêmen de que trata a presente invenção é constituído de: (1) entre 0,015 e 25 mg/mL de derivado de quitosana em solução tamponada, (2) entre 5 e 30% (v/v) de gema de ovo; (3) entre 10 e 30 g/L de ácido cítrico; e (4) agentes coadjuvantes.

[041] Os derivados de quitosana, na presente invenção, atuam, especialmente, com propriedades protetivas antioxidantes na prevenção e minimização do processo peroxidativo ocasionado pelas ROS (geradas durante o procedimento de criopreservação) aos espermatozoides *in vitro*. O papel das ROS e as suas implicações na função, sobrevivência e desempenho reprodutivo dos espermatozoides, bem como na qualidade do sêmen são reconhecidos e amplamente reportados na atualidade (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009; COCCHIA et al., *Theriogenology*. 75(7):1201-1210, 2011; SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; GÓMEZ-TORRES et al., *Cryobiology*. 78:90-94, 2017). Assim, os derivados de quitosana no diluente proposto tem por função melhorar a tolerância da célula espermática às diferentes condições a que são submetidas durante o procedimento de criopreservação do sêmen.

[042] Nesta composição, a gema de ovo tem como principal atribuição estabilizar as membranas biológicas dos espermatozoides de mamíferos, reduzindo os efeitos

negativos do choque térmico durante o processo de refrigeração inicial do sêmen (WILHELM, GRAHAM & SQUIRES, *Cryobiology*. 33(3):320-329, 1996; NEVES & HENRY, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 36(4):209-214, 2012). Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na gema de ovo aderem-se, por meio das suas porções fosfolipídicas, à membrana plasmática das células espermáticas formando uma película de proteção na superfície dessas células, restaurando fosfolipídios perdidos e induzindo alterações estruturais transitórias na membrana plasmática, de forma a prevenir a sua ruptura e favorecer a adaptação do espermatozoide a condição de baixa temperatura (FARSTAD, *Anim. Reprod. Sci.* 42(1-4):251-260, 1996; MANJUNATH, *Anim Reprod.* 9(4):809-815, 2012). Além de proteger a membrana espermática, a gema de ovo também atua na prevenção contra as mudanças degenerativas do acrossoma e na redução das perdas de enzimas acrossomais durante a estocagem do sêmen no estado líquido (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000).

[043] O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) é um ácido orgânico fraco que possui ação antioxidante, atua na estabilização do pH (pois serve como doador de prótons na produção do citrato) e auxilia na manutenção do equilíbrio osmótico do diluente (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000; SILVA, *Tese de Doutorado*, UECE, 2005).

[044] Os agentes coadjuvantes da composição da invenção são compreendidos de ao menos uma fonte de energia, ao menos um agente tamponante em solução aquosa e ao menos um antibiótico.

[045] Na presente proposta, ao menos uma fonte de energia compreende um ou mais monossacarídeos pertencentes ao grupo consistido de: frutose, manose, glicose, galactose, dextrose, xilose ou uma combinação destes. Preferencialmente, a fonte de energia consiste de 10 a 25 g/L de frutose.

[046] Os açúcares de baixa massa molecular, como os monossacarídeos, atuam como substrato energético para o metabolismo espermático, ou seja, são utilizados pelos espermatozoides *in vitro*, durante o armazenamento do sêmen, como fonte direta de energia através da via glicolítica e da fosforilação oxidativa mitocondrial para a

manutenção da motilidade espermática (NAING et al., *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2):23-28, 2010). Estes açúcares também desempenham importante papel na manutenção da pressão osmótica do diluente (HOLT, *Theriogenology*. 53(1):47-58, 2000).

[047] Ao menos um agente tamponante que pode ser empregado na presente invenção, pertence ao grupo consistido de: bicarbonato de sódio (NaHCO_3), citrato de sódio, fosfato de sódio, glicina, PBS (tampão fosfato salina), Tris (tris(hidroximetil)aminometano), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino etanossulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico), MOPSO (ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxi propanossulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxiethyl)-2-aminoetanossulfônico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfônico)), seus derivados ou uma combinação destes. Preferencialmente, o agente tamponante consiste de 20 a 40,0 g/L de Tris.

[048] Os sistemas tampões, nos diluentes de criopreservação do sêmen, são responsáveis pela manutenção do pH favorável à sobrevivência espermática e da capacidade fecundante do espermatozoide. Valores de pH considerados ótimos para os meios de preservação espermática estão entre 6,8 e 7,1 (BORGES, *Tese de Doutorado*, UNESP, 2008). Metabólitos produzidos pelos próprios espermatozoides, bem como por possíveis bactérias presentes no sêmen diluído são os principais fatores que tendem a reduzir o pH no meio extracelular (YÁNIZ, MATEOS & SANTOLARIA, *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2):142-149, 2011). Dentre os sistemas tampões, os de origem orgânica, como o Tris, demonstram melhor capacidade de regulação devido a capacidade que possuem de ultrapassar a membrana plasmática e reduzir variações intracelulares de pH, não influenciando na mobilidade e no metabolismo dos espermatozoides (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000).

[049] Na presente proposta de diluente, pode se fazer necessária a utilização de um agente capaz de impedir ou inviabilizar o crescimento microbiano, tal como um antibiótico inibidor da parede celular ou inibidor da síntese proteica bacteriana. Ao menos um antibiótico que pode ser empregado na presente invenção é pertencente ao

grupo consistido de: gentamicina, penicilina, estreptomicina, seus derivados ou uma combinação destes. Preferencialmente, o agente antimicrobiano é uma combinação de antibióticos consistida de 1 a 50 UI/mL de penicilina e 0,05 a 0,5 mg/mL de estreptomicina ou gentamicina de 0,0005 a 0,25 mg/mL.

[050] A incorporação aos diluentes seminais de substâncias de efeito antimicrobiano é recomendado, uma vez que o procedimento de coleta de sêmen está, inevitavelmente, propenso à contaminação microbiana a partir do prepúcio, uretra e pênis do animal, mesmo quando técnicas assépticas e medidas de higiene são empregadas (YÁÑIZ et al., *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2):142-149, 2010). Além disso, a gema de ovo, utilizada no diluente para criopreservação do sêmen, também apresenta susceptibilidade à contaminação (BOUSSEAU et al., *Theriogenology*. 50(5):699-706, 1998). O comprometimento da qualidade espermática, nos casos de contaminação bacteriana, pode afetar negativamente a fertilidade dos espermatozoides pela própria presença de bactérias, pela produção bacteriana de toxinas, pela degradação bacteriana dos componentes do diluente, ou ainda, pela utilização bacteriana dos substratos metabólicos presentes no diluente (SILVA, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31(1):119-127, 2007).

[051] O diluente da presente invenção é constituído pelos componentes mencionados anteriormente, solubilizados em água bidestilada, osmose reversa, deionizada ou ultrapura.

[052] O segundo objeto da presente invenção trata de um processo de preparação de diluente para criopreservação de sêmen consistido das etapas: (a) Dissolução de ácido cítrico, (b) Adição de gema de ovo e (c) Adição de ao menos um derivado de quitosana em solução tamponada de pH entre 6,8 e 7,5.

[053] A preparação do diluente para a preservação de sêmen ocorre em um ambiente estéril, no qual o agente tamponante, o ácido cítrico e ao menos uma fonte de energia são dissolvidos em água primeiramente.

[054] Para fins desta invenção, o agente tamponante é consistido de uma solução aquosa de bicarbonato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio, glicina, PBS, Tris, HEPES, MOPS, MOPSO, MES, BES, PIPES, seus derivados ou uma mistura destes. Preferencialmente, o agente tamponante é constituído de 20 a 40,0 g/L de Tris.

[055] O ácido cítrico presente nesta preparação está na faixa de concentração consistida de 10 a 30 g/L.

[056] A fonte de energia é um ou mais monossacarídeos pertencentes ao grupo consistido de: frutose, manose, glicose, galactose, dextrose, xilose ou uma combinação destes. Preferencialmente, a fonte de energia consiste de 10 a 25 g/L de frutose.

[057] Após dissolução do agente tamponante, ácido cítrico e um ou mais monossacarídeos, adiciona-se a gema de ovo à formulação, para que a mesma apresente proporção entre 5 e 30% (v/v) do volume final da preparação.

[058] O diluente da invenção compõe-se de ao menos um derivado de quitosana em uma concentração entre 0,015 e 25 mg/mL.

[059] Para fins desta invenção, o derivado de quitosana é um polissacarídeo ou oligossacarídeo produzido por reação de modificações química de substituição de grupos químicos, de alongamento de cadeia, de despolimerização da quitosana ou uma combinação destas. Exemplos destes tipos de reações, incluem: quaternização, alquilação, carboxilação, acilação, ftalilação, sulfatação, sililação, tosilação, tiolação, glicosilação, fosforilação e amidação. Em qualquer que seja o caso, o derivado de quitosana deve apresentar solubilidade aquosa na faixa de pH compreendida entre 6,8 e 7,5, que garante sua atuação em conformidade com os diluentes de preservação espermática.

[060] Em uma modalidade deste aspecto da invenção, o derivado de quitosana é, em particular, a quitosana carboximetilada, quitosana sulfatada, quitosana carboximetilada e sulfatada, quito-oligossacarídeo ou uma combinação destas.

[061] O pH da formulação final é ajustado entre 6,8 e 7,5 e a osmolaridade é ajustada de acordo com as características inerentes ao sêmen de cada espécie, conforme os métodos conhecidos pelos versados na área técnica. Ao final deste processo, se obtém o diluente para criopreservação de sêmen proposto na invenção.

[062] A invenção pode ser empregada na área técnica de biotecnologia aplicada à reprodução, especificamente, na reprodução assistida; mais especificamente ainda, na tecnologia de criopreservação do sêmen nas diferentes condições de criopreservação.

[063] A abrangência da presente invenção está estabelecida nos termos definidos nas reivindicações anexas. Portanto, os exemplos descritos a seguir devem ser considerados com uma das inúmeras maneiras de se concretizar a invenção e comprovar sua eficácia sem limitar o escopo da mesma, bem como os direitos dos titulares.

[064] As técnicas utilizadas nos exemplos que ilustram a invenção são convencionalmente bem estabelecidas entre os especialistas nas formas de realização e os reagentes utilizados são comercialmente disponíveis.

[065] Os versados na técnica e empresas com interesse no segmento valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção na modalidade apresentada ou em seus equivalentes contemplados pelas reivindicações.

Exemplo 1: Preparação de diluentes para a refrigeração de sêmen ovino

[066] A presente invenção foi utilizada para preparar diluentes para refrigeração de sêmen ovino baseado na associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico. Quitosana foi obtida a partir de subprodutos do processamento industrial de camarão, com base na metodologia descrita por Cahú et al. (*Process Biochem.* 47(4):570–577, 2012). Posteriormente, foram empregadas metodologias de modificação química para a produção de diferentes derivados de quitosana: quitosana carboximetilada, conforme Ramesh, Viswanatha & Tharanathan (*Carbohydr. Polym.* 58(4):435-441, 2004); quitosana sulfatada, de acordo com Mariappan et al. (*Wound. Repair. Regen.* 7(5):400-406, 1999); quitosana carboximetilada e sulfatada, seguindo as

duas metodologias citadas anteriormente; e quito-oligossacarídeos, segundo Roncal et al. (*Carbohydr. Res.* 342(18):2750-2756, 2007).

[067] Os diluentes de refrigeração de sêmen ovino foram constituídos de: 36,05 g/L de Tris; 20,24 g/L de ácido cítrico; 14,88 g/L de frutose, 20%(v/v) de gema de ovo, derivados de quitosana, 1 UI/mL de penicilina e 0,5 mg/mL de estreptomicina. Os três primeiros componentes foram pesados numa escala analítica, adicionados a um recipiente com 400 mL de água ultrapura e homogeneizados durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionada à formulação 100 mL de gema de ovo para um total de 500 mL de diluidor que foi novamente homogeneizado durante 20 minutos. Posteriormente, o diluente foi subdividido em cinco tratamentos, incluindo um grupo controle e quatro grupos de teste modificados quanto ao tipo de derivado de quitosana adicionado. No tratamento controle, não houve complementação do diluidor com derivado de quitosana. Nos grupos de teste, além dos antibióticos, foram adicionados os derivados de quitosana na concentração final de 15 µg/mL.

[068] Os tratamentos experimentais, conforme descrito acima, foram identificados quanto ao tipo de derivado de quitosana adicionado, sendo: o tratamento ChS, o diluente com adição de quitosana sulfatada; tratamento ChCm, diluente com adição de quitosana carboximetilada; tratamento ChCmS, diluente com adição de quitosana carboximetilada e sulfatada; e o tratamento Oligo, diluente com adição de quito-oligossacarídeos. Após as suplementações, os diluentes foram homogeneizados durante 20 minutos a 25 °C, e tiveram seu pH e osmolaridade mensurados e ajustados para faixas compatíveis com o sêmen da espécie ovina. Os tratamentos controle, ChS, ChCm, ChCmS e Oligo apresentaram pH 7,0 e osmolaridade de 482 mOsm/L; 476,5 mOsm/L; 465,5 mOsm/L; 475 mOsm/L; e 453,5 mOsm/L, respectivamente.

Exemplo 2: Efeitos dos diluentes para a refrigeração de sêmen ovino preparados sobre os parâmetros cinemáticos dos espermatozoides

[069] Este estudo foi realizado para avaliar o efeito de diluentes constituídos de uma associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico na refrigeração de sêmen ovino durante o acondicionamento de sêmen ovino à 5 °C, sobre os

parâmetros cinemáticos dos espermatozoides. Foi utilizado sêmen ejaculado de 4 ovinos da raça Santa Inês (sexualmente maduros e com histórico de fertilidade) manejados sob as mesmas condições ambientais, alimentados com feno de capim Tifton e 400 g/dia de ração comercial, além de água e sal mineral *ad libitum*. As coletas de sêmen foram realizadas em dias alternados, totalizando 5 coletas por animal (20 ejaculados). Os ejaculados foram obtidos usando-se uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39 °C e acoplada a um tubo coletor graduado estéril, na presença de uma fêmea como manequim. Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob o número de licença 031/2018. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram submetidos a avaliações microscópicas para movimento de massa, vigor e motilidade, em microscópio de contraste de fase. Os ejaculados que apresentaram movimento de massa e vigor ≥ 3 e valores de motilidade $\geq 70\%$ foram aprovados e destinados à formação do *pool* (n=5). Após esta etapa, foi determinada a concentração dos espermatozoides no *pool* de sêmen em Câmara de Neubauer, seguindo a proporção de 1:400 de solução salina formolizada a 1% (v/v).

[070] Os diluentes para refrigeração de sêmen foram preparados de acordo com o Exemplo 1, e o volume de sêmen recém coletado foi diluído em todos os grupos experimentais para uma concentração espermática padrão de 200×10^6 espermatozoides viáveis/mL. Amostras de cada tratamento experimental foram envasadas em palhetas de 0,25 mL, etiquetadas e armazenadas em refrigerador (previamente estabilizado à temperatura de 5 °C para o resfriamento do sêmen) até o momento da análise. Quando a temperatura das amostras atingiu 5 °C (aproximadamente, duas horas após refrigeração) foi determinado o tempo 0 (T_{0h}) e os parâmetros cinemáticos dos espermatozoides de cada tratamento foram avaliados individualmente. As análises subsequentes foram realizadas 24 (T_{24h}), 48 (T_{48h}), 72 (T_{72h}) e 96 horas (T_{96h}) depois. A cinemática espermática foi avaliada utilizando um Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (Computer-Assisted Semen Analyses - CASA). Para este estudo, as amostras experimentais foram inicialmente aquecidas em banho-

maria a 37 °C, durante 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 10 µL de cada tratamento foi rediluída em diluidor, sem derivado de quitosana, para atingir uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL, e incubada em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos. Após esta etapa, alíquotas de 2,5 µL foram depositadas entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37 °C em microscópio de contraste de fase e um mínimo de 500 espermatozoides foram capturados em cinco campos aleatórios e avaliados pelo CASA. Os parâmetros espermáticos considerados neste estudo foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), rápidos (RAP, %), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento cruzado (BCF, Hz). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

[071] Após análise da cinemática espermática do sêmen ovino refrigerado com os diferentes diluentes, observou-se que, a partir de T_{0h} , o tratamento ChCmS apresentou maior percentual no parâmetro MP ($30,5 \pm 3,6\%$) e diferiu significativamente do tratamento controle ($24,4 \pm 1,9\%$). Na análise de RAP, em T_{24h} , o tratamento ChS ($48,7 \pm 9,2\%$) obteve maior percentual, diferindo significativamente dos tratamentos ChCm e ChCmS ($30,0 \pm 7,1\%$ e $29,4 \pm 8,8\%$). Na avaliação de VCL, em T_{0h} , foi constatada diferença significativa entre o tratamento ChS ($142,5 \pm 4,9$ µm/s) e o tratamento ChCm ($126,1 \pm 4,6$ µm/s). Ainda neste parâmetro, em T_{24h} , observou-se que os espermatozoides dos tratamentos ChS e Oligo obtiveram maiores índices de velocidade ($131,9 \pm 4,7$ µm/s e $122,4 \pm 8,7$ µm/s, respectivamente) em relação ao tratamento controle ($106,4 \pm 5,2$ µm/s), diferindo significativamente deste. Quanto a VSL, em T_{72h} , o tratamento Oligo registrou valor superior ($61,2 \pm 5,0$ µm/s) ao tratamento ChCmS ($50,4 \pm 2,9$ µm/s) e, em T_{96h} , os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo registraram valores superiores ($58,4 \pm 6,4$ µm/s; $57,1 \pm 6,2$ µm/s; $56,9 \pm 6,0$ µm/s e $63,9 \pm 6,2$ µm/s; respectivamente) ao tratamento controle ($53,6 \pm 0,9$ µm/s). Na análise de VAP, em T_{24h} , os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo apresentaram maiores índices ($82,7 \pm 1,8$ µm/s; $77,4 \pm 7,3$ µm/s; $76,1 \pm 5,3$ µm/s e $75,3 \pm 7,4$ µm/s; respectivamente) em relação ao tratamento controle ($72,8 \pm 3,8$ µm/s).

Os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo também obtiveram, em T_{96h}, maiores percentagens em LIN (54,2±4,8%; 56,0±3,5%; 53,0±5,1% e 56,7±4,8%; respectivamente), STR (81,9±2,4%; 81,7±1,7%; 80,7±3,1% e 83,0±3,0%; respectivamente) e WOB (66,0±5,2%; 68,6±3,6%; 65,8±4,3% e 69,3±5,6%; respectivamente) quando comparados com os resultados alcançados pelo tratamento controle (48,5±6,0%; 76,2±3,6% e 61,3±6,4% para LIN, STR e WOB, respectivamente). Nos parâmetros MT e ALH não foram observadas diferenças significativas. Com relação ao BCF, em T_{72h}, foi observada diferença significativa entre o grupo ChCmS (15,6±0,3 Hz) e o grupo controle (14,6±0,6 Hz), tendo este último menor frequência de batimento flagelar cruzado que o primeiro. Estabelecendo uma correlação entre todos os parâmetros cinéticos avaliados, com exceção de MT e ALH, foi observado que no quinto dia de armazenamento (T_{96h}), os tratamentos que continham a associação derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico apresentaram melhor conservação das características cinemáticas dos espermatozoides quando comparados com o tratamento controle.

Exemplo 3: Efeitos dos diluentes para refrigeração de sêmen ovino preparados sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e viabilidade espermática

[072] Este estudo foi realizado para avaliar o efeito de diluentes constituídos de uma associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico na refrigeração de sêmen ovino durante o acondicionamento de sêmen ovino à 5 °C, sobre os parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e viabilidade espermática. Os diluentes foram preparados de acordo com o Exemplo 1 e a coleta e refrigeração de sêmen foi conduzida como descrito no Exemplo 2. Após estes procedimentos, as avaliações pós-refrigeração foram realizadas. Os parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e viabilidade dos espermatozoides foram identificados e investigados utilizando-se sondas fluorescentes, em conformidade com Arruda et al. (*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70: 153-159, 2018). As amostras foram examinadas por citometria de fluxo utilizando-se os *softwares* INSPIRE® e IDEAS® para as aquisições e análises dos dados,

respectivamente. Todas as amostras foram analisadas e as populações foram divididas por meio de gráficos de pontos e histogramas, além da confirmação visual mediante as imagens das células. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

[073] Na análise quanto a integridade de membranas plasmática e acrossomal foi constatado, em T_{96h} , que os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo apresentaram melhores percentagens neste parâmetro ($42,1 \pm 5,6\%$; $43,2 \pm 3,7\%$; $40,9 \pm 4,5\%$ e $43,2 \pm 3,4\%$; respectivamente) em relação ao tratamento controle ($36,6 \pm 6,0\%$). No que diz respeito à estabilidade de membrana plasmática, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos que continham a associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico e o tratamento controle nas primeiras 24 horas. No entanto, em T_{48h} , o tratamento ChCmS apresentou maior percentual de espermatozoides com membrana estável ($32,4 \pm 4,1\%$) comparado ao tratamento controle ($24,3 \pm 3,3\%$) e não diferiu significativamente dos grupos ChS e Oligo ($27,0 \pm 3,6\%$ e $29,8 \pm 2,6\%$, respectivamente). Ainda neste parâmetro, em T_{72h} , foi verificado maior percentual de espermatozoides com membrana estável no tratamento ChCm ($30,4 \pm 5,0$) em relação ao tratamento controle ($26,5 \pm 3,4\%$), não diferindo significativamente dos demais tratamentos ChS, ChCmS e Oligo ($27,4 \pm 1,9\%$; $27,6 \pm 1,9\%$ e $27,5 \pm 2,2\%$; respectivamente). Com relação à viabilidade espermática, a partir de T_{72h} , os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo exibiram maiores percentagens de espermatozoides viáveis ($29,1 \pm 1,3\%$; $29,8 \pm 5,2\%$; $28,9 \pm 2,4\%$ e $30,5 \pm 4,9\%$; respectivamente) quando comparados ao tratamento controle ($27,9 \pm 1,2\%$).

[074] Portanto, considerando os parâmetros padrão de qualidade de sêmen avaliados, o diluente proposto e seu processo de preparação promoveram efeitos crioprotetores benéficos à vitalidade, longevidade e fertilidade dos espermatozoides submetidos ao procedimento de refrigeração. Propõe-se, desta forma, que uma composição contendo a associação de derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico possa ser utilizada como diluente para criopreservação de sêmen.

REIVINDICAÇÕES

1. “DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO” **caracterizado por** constituir um produto diluente formado de entre 0,015 e 25 mg/mL de derivado de quitosana em solução tamponada, entre 5 e 30% (v/v) de gema de ovo, entre 10 e 30 g/L de ácido cítrico, e agentes coadjuvantes.
2. “DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** os agentes coadjuvantes compreenderem ao menos um ou mais monossacarídeos pertencentes ao grupo consistido de frutose, manose, glicose, galactose, dextrose, xilose ou uma combinação destes; ao menos um agente tamponante em solução aquosa pertencente ao grupo consistido de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), citrato de sódio, fosfato de sódio, glicina, PBS (tampão fosfato salina), Tris (tris(hidroximetil) aminometano), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino etanossulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico), MOPSO (ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxi propanossulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanossulfônico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfônico)), seus derivados ou uma combinação destes; e ao menos um antibiótico inibidor da parede celular ou inibidor da síntese proteica bacteriana pertencente ao grupo consistido de gentamicina, penicilina, estreptomicina, seus derivados ou uma combinação destes.
3. “DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO” de acordo com a reivindicação 2,

caracterizado por ao menos um monossacarídeo ser consistido de 10 a 25 g/L de frutose.

4. “DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO” de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por**, ao menos, um agente tamponante em solução aquosa ser consistido de 20 a 40,0 g/L de Tris.
5. “DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO”, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** conter uma combinação de antibióticos consistida de 1 a 50 UI/mL de penicilina e 0,05 a 0,5 mg/mL de estreptomicina ou gentamicina de 0,0005 a 0,25 mg/mL.
6. “DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO” **caracterizado por** processo para obtenção do produto definido na reivindicação incluir as etapas de (a) Dissolução de ácido cítrico, (b) Adição de gema de ovo e (c) Adição de, ao menos, um derivado de quitosana em solução tamponada de pH entre 6,8 e 7,5.
7. “DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO” de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** processo para obtenção do produto definido na reivindicação utilizar ao menos um derivado de quitosana produzido por reação de modificações química de substituição de grupos químicos, de alongamento de cadeia, de despolimerização da quitosana ou uma combinação destas; com solubilidade aquosa na faixa de pH compreendida entre 6,8 e 7,5.
8. DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO” de acordo com a reivindicação 7,

caracterizado por processo para obtenção do produto definido na reivindicação utilizar como derivado de quitosana uma quitosana carboximetilada, quitosana sulfatada, quitosana carboximetilada e sulfatada, quito-oligossacarídeo ou uma combinação destas.

RESUMO

“DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO”.

A presente invenção trata de um diluente para criopreservação do sêmen, contendo derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes; e seu processo de preparação. O diluente proposto promove efeitos benéficos nos parâmetros de motilidade, estabilidade e viabilidade espermática, podendo ser utilizado para prolongar a vida funcional do espermatozoide criopreservado e melhorar o seu desempenho reprodutivo. A invenção contribui para a eficiência dos atuais procedimentos de criopreservação empregados no campo técnico da reprodução assistida.