

**Estudo do potencial crioprotetor de extrato de algaroba (*Prosopis juliflora*) na refrigeração de espermatozoides epididimários bovino****Study of the cryoprotective potential of the algaroba extract (*Prosopis juliflora*) in the refrigeration of bovine epididymal spermatozoa**

DOI:10.34117/bjdv6n8-217

Recebimento dos originais:08/07/2020

Aceitação para publicação:14/08/2020

**Willias Greison Silva Santos**

Graduando em Biotecnologia Pela Universidade Federal da Paraíba

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Centro de Biotecnologia, UFPB, Campus I, Castelo Branco, João Pessoa-PB, Brasil

E-mail: williaswg2@gmail.com

**Mariana de Sousa Santos Hempel**

Mestrando em Biotecnologia Marinha pelo Instituto de Estudos do Mar

Almirante Paulo Moreira da Universidade Federal Fluminense

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: R. Kioto, 253 - Praia dos Anjos, Arraial do Cabo - RJ, 28930-000

E-mail: marihempel@hotmail.com

**Camila Flávia Avelino de Farias**

Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Centro de Ciências Agrárias, UFPB, Campus II, Areia-PB, Brasil

E-mail: camillafafarias@gmail.com

**José Natanael Tavares da Silva**

Graduando em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Rua Lindolfo Gonçalves Chaves, 393 - Jardim São Paulo, João Pessoa - PB, Brasil

E-mail: natan.tavares03@gmail.com

**Luiz André de Araújo Silva**

Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPEFARM

UFPB, Campus I, Castelo Branco, João Pessoa-PB, Brasil.

Email: luiz32@gmail.com

**Clóvis Gouveia da Silva**

Doutor em Engenharia de Processos pela Universidade Federal de Campina Grande

Endereço: Laboratório de Análises e Pesquisas de Bebidas Alcoólicas, Departamento de Tecnologia Química e Alimentos - UFPB, Campus I, Castelo Branco, João Pessoa-PB, Brasil.

E-mail: algarobeira@gmail.com

**Sildivane Valcácia Silva**

Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Centro de Biotecnologia, UFPB, Campus I, Castelo Branco,

João Pessoa-PB, Brasil

E-mail: sildivane@cbiotec.ufpb.br

**RESUMO**

A algarobeira (*Prosopis juliflora*) é uma árvore da família das leguminosas pertencente ao gênero *Prosopis*. Devido a sua rusticidade e por frutificar na época mais seca do ano, a algarobeira foi inserida no Nordeste Brasileiro como fonte de alimentação, devido a polpa do fruto ser doce e utilizada como substituta ao açúcar na produção de cervejas, pães e farinhas artesanais. Assim, este trabalho objetivou estudar o potencial crioprotetor do extrato aquoso da algaroba (*Prosopis juliflora*) na refrigeração de espermatozoides epididimários bovino. No Experimento I, as vagens da algarobeira foram colhidas, separadas, pesadas, sanitizadas, fragmentados e congelados. Após, submetidos à hidratação e prensagem para a obtenção do extrato. Após esse processo foram separadas em dois grupos (1 e 2) com subgrupos contendo diferentes concentração do extrato: 1 (1A, 1B, 1C, e 1D) e 2 (2A, 2B, 2C e 2D). Este processo não será descrito devido proteção de patente. Para o grupo controle utilizou-se TRIS-gema. Na sequência, realizou-se as análises físico-químicas (fósforo total; dureza de cálcio e medição de pH), açúcar redutor, teste de viscosidade e teste microbiológico em todos os grupos experimentais. No Experimento II, espermatozoides epididimários bovinos foram recuperados e homogeneizados para formação dos grupos e submetidas às análises espermáticas: motilidade espermática, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, nos tempos 0, 24 e 48h sob refrigeração (5 °C). 1A apresentou melhor motilidade ( $p < 0,05$ ) que os demais grupos. Nos testes de integridade e funcionalidade de membrana não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os grupos após 48h. Com isso, conclui-se que o 1A pode ser um potencial crioprotetor, mantendo a célula viável, sem adição de frutose.

**Palavras-chaves:** Algaroba Análise físico-química, Cálcio, Criopreservação, Epidídimo, Fósforo.**ABSTRACT**

The *algarobeira* (*Prosopis juliflora*) is a tree of the legume family belonging to the genus *Prosopis*. Due to its rusticity and for fruiting in the driest time of the year, *algarobeira* was inserted in the Brazilian Northeast, being a source of food, due to the fruit's pulp being sweet and used as a substitute for sugar in the production of artisanal beers, breads and flours. The objective of this research was to study the cryoprotective potential of the aqueous extract of algaroba (*Prosopis juliflora*) in the refrigeration of bovine epididymal spermatozoa. The algaroba fruits were collected, separated, weighed, sanitized, fragmented and frozen. Afterward, submitted to hydration and pressing to obtain the extract. After this process, two groups (1 and 2) were selected, with separate subgroups of different concentrations: 1 (1A, 1B, 1C, and 1D) and 2 (2A, 2B, 2C and 2D). This process and the concentrations will not be described due to patent applications. For the control group, it was used the Buffer egg yolk. Then performed a physical-chemical test (total phosphorus; calcium hardness, and pH test), sugar reducer, viscosity test and microbial test of all experimental groups. In the second stage, there were bovine epididymal spermatozoa. These cells were recovered and homogenized for group formation and subjected to sperm analysis: sperm motility, plasma membrane integrity and functionality at times 0, 24 and 48h under refrigeration (5 °C). 1A showed better motility ( $p < 0.05$ ) than the other groups. In the membrane integrity and functionality tests, there were no differences ( $p > 0.05$ ) between groups after 48 hours. According to this, it can concludes that the 1A can be a potential cryoprotectant, keeping a viable cell without adding fructose.

**Keywords:** *Algaroba*, Physical-chemical analysis, Calcium, Cryopreservation, Epididymis, Phosphorus.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2019, a agropecuária cresceu 1,3% em relação ao ano de 2018, sendo esta uma das responsáveis pela participação de 5,2% do Produto Interno Bruto Brasileiro (PIB). Dentre os destaques da agropecuária, a bovinocultura - criação e manejo de bovinos - apresentou crescimento de 11% em relação ao ano anterior (2018), com 6% desse montante, fechando o PIB em 2018 em 7,3 trilhões de reais (IBGE, 2019; 2020).

Devido a essa importância no mercado, técnicas aplicadas à reprodução são desenvolvidas com maior difusão obtendo, como resultado, um impacto no melhoramento genético de animais de exploração zootécnica. Uma técnica comumente utilizada é o processo de Inseminação Artificial, no qual se aplica a técnica de recuperação de espermatozoides (BORGES, 2011). Essa última técnica consiste na recuperação espermatozoides presentes na cauda do epidídimo, em animais recém-abatidos ou mortos. Isso ocorre, pois, mesmo após a orquiectomia (remoção dos testículos) em animais, a colheita de espermatozoide diretamente do epidídimo pode manter a viabilidade por até 24 horas *post mortem*, que permite facilmente a recuperação celular e criopreservação (BERGSTEIN-GALAN *et al.*, 2017).

Porém, o processo de criopreservação pode causar danos físicos e químicos à membrana plasmática do espermatozoide, devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS - do inglês *reactive oxygen species*), que causam um estado de estresse oxidativo, culminando em crioinjúrias. Estas, por sua vez, serão responsáveis pelos danos na função celular, com consequente redução na fertilidade (BRAGA, 2014; CARNEVALE, 2017).

A fim de evitar tal processo e garantir a sobrevivência espermática, é necessária a adição de crioprotetores. Essas soluções terão a função de manter a integridade e funcionalidade da membrana durante o processo de criopreservação. Os crioprotetores utilizados comercialmente são a base de gema de ovo e leite (BATISTA, 2015), porém, devido os compostos serem de origem animal, apresentam risco potencial na contaminação do sêmen (BRITO, 2017). Com o intuito de diminuir tais contaminações, crioprotetores de origem vegetal se tornaram foco de diversas pesquisas biotecnológicas da reprodução animal (SANTOS *et al.*, 2018). Diluidores a base de *Aloe vera* (FARIAS, 2019), hibisco (POSSIDONIO, 2017; HEMPEL, 2018), água de coco (BRITO, 2017),

dentre outros demonstraram bons resultados no processo de proteção da integridade espermática quando criopreservados.

Nesse direcionamento, o fruto da algarobeira, ou simplesmente algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC), foi selecionado para a busca de um potencial crioprotetor. A algarobeira, *Prosopis juliflora* é uma planta xerófita nativa das regiões áridas, distribuída entre o sudoeste americano até a patagônia, na Argentina, e pode ser encontrada em alguns desertos africanos. É uma árvore da família das leguminosas (*Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae*) pertencente ao gênero *Prosopis*, do qual são conhecidas mais de 40 espécies, distribuídas em três continentes: América, Ásia e África (FLORA BRASIL, 2019).

Devido à sua rusticidade e por frutificar na época mais seca do ano, a algaroba foi inserida no Nordeste Brasileiro, sendo fonte de alimentação humana, mas sendo utilizada na alimentação de caprinos e bovinos (SILVA, 2003). As vagens da algarobeira contém internamente uma polpa extremamente doce, muito utilizado na produção de melão e substituto do açúcar industrial (ROCHA, 2019).

É evidente a importância da algaroba no contexto da região nordeste, devido ao seu papel nutricional, tanto humana, quanto animal e a sua disseminação, sendo uma árvore comum em toda região nordeste. Portanto, o presente trabalho visa o estudo do potencial crioprotetor do extrato aquoso da vagem da algaroba (*Prosopis juliflora*) na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 EXPERIMENTO I - OBTENÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO DE ALGAROBA**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, sob o número de cadastro ACC23ED.

Novecentos gramas da vagem madura da algarobeira (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC), foram utilizadas neste experimento, gentilmente cedidas pelo Dr. Clóvis de Gouveia da Silva do Laboratório de Análises e Pesquisas de Bebidas Alcoólicas (LBA)/UFPB, colhidas em 2018, advindas da cidade de Serra Branca (7°28'58"S; 36°39'54"O), localizada na microrregião do Cariri Ocidental, no Oeste da Paraíba. As vagens foram coletadas, separadas, pesadas, sanitizadas, fragmentadas e congeladas, segundo protocolo padrão (SILVA *et al.*, 2003).

As vagens foram descongeladas e pesadas em balança eletrônica (Toledo Prix 3 Plus, 30 kg). Após o processo de pesagem, as vagens foram hidratadas em água aquecida a 60 °C, na proporção de 1:2 m/v (1,0 kg de vagem para dois litros de água) e mantidas em hidratação por 12 horas. Na

sequência, foi realizado outro processo de pesagem de rendimento, de acordo com a metodologia de Silva (2009).

Para a prensagem, utilizou-se prensa hidráulica manual, com capacidade máxima para 795,33 kg.cm<sup>-2</sup>, composta de um cilindro em aço inox perfurado, medindo 222,0 mm de altura x 155,0 mm de diâmetro interno. A vagem, já hidratada, foi adicionada ao copo coletor de inox (190 mm x 90 mm de altura), acoplado a parte inferior do cilindro, no qual foi aplicado a pressão de 106,00 a 530,20 Kgf.cm<sup>-2</sup>. O bagaço da algaroba sofreu o processo de reidratação e repouso por uma hora, com a finalidade aumentar a captação do açúcar presente na vagem e realizada nova prensagem.

Após o processo de prensagem, o extrato da algaroba foi separado em quatro garrafas de vidro (A, B, C e D) de 500 mL cada. As garrafas A e B foram submetidas ao processo de pasteurização lenta e as C e D não foram submetidas. As garrafas A e C foram armazenadas sob refrigeração a 5 °C e as garrafas B e D foram armazenadas sob congelação, -6 °C. Assim, formou-se os grupos EPR (Extrato Pasteurizado Refrigerado), EPC (Extrato Pasteurizado Congelado); ENPR (Extrato Não-Pasteurizado Refrigerado) e ENPC (Extrato Não-Pasteurizado Congelado).

A mensuração do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizada antes e pós-pasteurização, utilizando-se fita simples de pH (Merck). Realizou-se a análise de umidade do bagaço, densidade do extrato pasteurizado e não-pasteurizado (BRASIL, 2010), e a quantidade de solutos totais - Brix° (CAVALCANTI *et al.*, 2006), assim como as análises dos íons cálcio e fósforo (dureza de cálcio e fósforo totais) (APHA, 2005; FERNANDES, 2015), açúcares redutores totais (MILLER, 1959) e ácido ascórbico (BRASIL, 1986).

A análise do potencial microbiológico de cada extrato (EPR, EPC, ENPR e ENPC) foi realizada segundo Greison *et al.* (2019).

## 2.2 EXPERIMENTO II - FORMAÇÃO DE GRUPOS EXPERIMENTAIS E TESTE COM ESPERMATOZOIDES

A diluição dos extratos em solução tampão (3,605 g de hidroximetilametano; 2,024 g de ácido cítrico; 100 mL de água bidestilada) está sob proteção da patente intitulada “DILUIDOR VEGETAL PARA PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO, CONGELAÇÃO E REFRIGERAÇÃO DE GAMETAS”, Número BR 1020200043161. Para entendimento da condução experimental, foram formados os seguintes grupos: grupo 1 (pasteurizado, refrigerado), grupo 2 (pasteurizado congelado), grupo 3 (não-pasteurizado refrigerado) e grupo 4 (não-pasteurizado congelado), com subgrupos contendo diferentes concentrações de cada extrato: 1A e 1B, 2A e 2B;

3A e 3B e 4A e 4B. Como grupo controle (GC), utilizou-se o diluidor padrão de sêmen bovino, o tris-gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose; 100 mL de água bidestilada; 20% de gema de ovo).

### 2.3 ENSAIO REOLÓGICO (TESTE DE VISCOSIDADE)

As viscosidades dos diluidores a base do extrato de algaroba citados acima e GC foram determinados através do reômetro (Brookfield LVDVIII Ultra, São Paulo), localizado no Laboratório de Petróleo do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, segundo Farias *et al.* (2019).

### 2.4 OBTENÇÃO DOS ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS

Foram utilizados complexos de testículos/epidídimos de bovinos sem raça definida obtidos em matadouros localizados na cidade de João Pessoa-Paraíba (7°08'20.3"S; 34°52'26.8"O). Após o abate, o complexo testículo-epidídimo foi separado, armazenado e encaminhado ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA), do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, Campus I. Os espermatozoides foram obtidos segundo a metodologia de fatiamento da cauda de epidídimo, descrito por Almeida *et al.* (2017).

### 2.5 ANÁLISE ESPERMÁTICA

Após a obtenção dos espermatozoides, amostras com motilidade mínima de 50% foram utilizadas neste estudo. As amostras de cada complexo testículo/epidídimo, após aprovação, foram homogeneizadas e formado o *pool*, com o objetivo de reduzir a variação individual (BUCAK; ATESSAHIN; YUCE, 2008). Deste *pool*, as amostras foram divididas em grupos experimentais formados de acordo com os resultados obtidos das análises microbiológicas, ou seja, aqueles com menor índice de contaminação, os extratos pasteurizados (1A, 2A, 1B e 2B). Assim, as amostras de espermatozoides bovinos foram submetidos à refrigeração à 5 °C, com avaliações a 0, 24 e 48 horas. Todas as avaliações com as células espermáticas foram realizadas por dois avaliadores e em triplicatas.

A motilidade foi realizada por avaliação subjetiva, expressa em porcentagem (0-100%), sendo realizada em microscópio óptico (Quimis, São Paulo), objetiva de 40x, sendo usada uma alíquota (10 µL) da amostra entre lâmina e a lamínula (CBRA, 2013).

Para a avaliação da integridade de membrana plasmática foi utilizada a metodologia de dupla coloração com eosina-nigrosina. Para a mensuração da funcionalidade da membrana plasmática,



utilizou-se o teste hiposmótico. Ambas as metodologias foram realizadas segundo a descrição do Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparações entre os tempos do mesmo tratamento foi utilizado o teste ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) pelo software da IBM, SPSS Statistics (versão 18.0 para Windows). Para dados não paramétricos usou-se o teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 EXPERIMENTO I

O pH dos extratos foi 5.0, tanto antes quanto depois do processo de pasteurização, não havendo influência da temperatura na manutenção do pH. Este valor foi superior ao encontrado por Nascimento e colaboradores (pH 4.69, 2013), e inferior do que a encontrado por Dias *et al.* (pH 5.6, 2018), ambos os grupos trabalharam com o extrato aquoso da algaroba. As diferenças de pH observadas podem ocorrer devido à origem de colheita das vagens em estados diferentes, Ceará e Rio Grande do Nordeste, respectivamente, o que, segundo Silva (2003), a variação de compostos presentes no extrato aquoso sofre alteração dependendo do clima da região. Outra variável apontada é método utilizado para mensuração, uma vez que estes autores utilizaram phmetro digital, e o nosso a fita de pH simples.

A umidade total do bagaço foi de 37,78%, sendo maior do que a encontrada por Cavalcanti e colaboradores (2020). No nosso trabalho, a algaroba sofreu um processo de hidratação, e devido a esse fato a umidade foi maior, enquanto que o grupo de Cavalcanti *et al.* (2020) trabalhou com a vagem *in natura* para teste de combustão.

Na aferição da quantidade de solutos totais (°Brix), do extrato pasteurizado foi de 21,0 °Brix e do extrato não-pasteurizado foi 21,5 °Brix. Estes achados corroboram com os achados por Dias *et al.* (2018), quando trabalhou com o extrato aquoso. Na avaliação de densidade, o extrato pasteurizado apresentou valor de 1.069 g/mL, enquanto o extrato não-pasteurizado foi de 1.051g/mL, o que corrobora com os achados de Carvalho (2018), quando trabalhou com a vagem da algaroba em pó. O processo de pasteurização não foi capaz de interferir nas avaliações dos componentes °Brix e densidades encontrados neste trabalho.

**Tabela 1.** Resultado de análises físico-químicas do extrato bruto aquoso de *Prosopis juliflora* por mg/100 mL

Amostras	FÓSFORO	CÁLCIO	ART	Ácido Ascórbico (mL)
CG	13,19 ± 0,45a	24,05 ± 0,05a	669,51 ± 63,62a	1,21
EPC	19,67 ± 0,98a	30,73 ± 4,63b	101340,31 ± 679,82b	2,02
ENPC	16,56 ± 2,68a	24,05 ± 0,01a	10052,91 ± 614,56b	6,06
EPR	50,78 ± 0,45b	28,06 ± 0,01b	11680,91 ± 428,80bc	3,03
ENPR	25,12 ± 4,86a	20,04 ± 0,01a	9645,91 ± 800,66b	4,54

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). ART: açúcares redutores totais. CG: Grupo Controle (tampão TRIS); EPC: extrato pasteurizado congelado; ENPC: extrato não-pasteurizado congelado; EPR: extrato pasteurizado refrigerado; ENPR: extrato não-pasteurizado refrigerado.

Quanto à presença de íons no extrato aquoso (tabela 1), na análise de fósforo, apenas o grupo EPR diferiu dos demais ( $p < 0,05$ ). O fósforo foi maior do que encontrado por Oliveira e colaboradores (2016), que trabalhou com a vagem *in natura* da algaroba e menor do que encontrado por Gonzáles-Galán (2009), quando avaliou a farinha e a goma da algaroba. Para o cálcio, não houve diferença entre a solução tampão usada como controle e os grupos ENPC e EPC ( $p > 0,05$ ). Os grupos que sofreram pasteurização apresentaram maior quantidade de íons cálcio ( $p < 0,05$ ). Os grupos não pasteurizados corroboram com os achados de Oliveira e colaboradores (2016). Todos os valores dos grupos foram menores do que os achados por Gusmão e colaboradores (2018), na farinha da algaroba.

Devido a alta concentração de açúcares presente no extrato aquoso, foi necessário a diluição do extrato em 40 vezes para as análises de açúcar redutor. Um açúcar redutor é qualquer açúcar que, em solução básica, apresenta um grupo carbonílico livre aldeído (derivado de uma aldose). Sua capacidade de redução se dá pela presença de um grupo aldeído ou cetona livre. Os exemplos mais comuns são sacarose, glicose e maltose (LEHNINGER *et al.*, 2019; p. 281). No trabalho, todos os grupos divergiram do controle e houve diferença entre os grupos EPR e ENPR ( $p < 0,05$ ). Os grupos EPC, ENPC e EPR corroboram com os estudos de Dias e colegas (2018) e o grupo ENPR corrobora com os achados de Nascimento e colaboradores (2013).

Os resultados das análises físico-químicas do fósforo, do cálcio e do açúcar redutor diferiram dos relatados por Borges (2003), no melaço de algaroba, Muniz e colaboradores (2009), na farinha de algaroba e Nogueira (2016), na produção de cerveja. Segundo Silva (2009), essa diferenciação ocorre devido ao local de origem das vagens, por apresentar uma baixa umidade, o que influencia



na capacidade da algarobeira de absorver a água e obter elevados níveis de minerais e açúcares na sua vagem.

Em todos os grupos foi verificada a presença do ácido ascórbico, corroborando com os achados de Felker e colaboradores (2012) e Moura Neto (2016), quando analisaram a vagem *in natura*. Esse metabólito desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de plantas, atuando como cofator enzimático e composto antioxidante no seu metabolismo celular (SZARKA *et al.*, 2012) e pode ter a mesma atuação protetiva na membrana plasmática do espermatozoide.

Nas análises microbiológicas (tabela 2), o grupo controle não apresentou crescimento microbiológico em ambos os meios. O grupo controle contendo o tampão TRIS (GCT) apresentou 19 UFC em BDAP e 93 UFC em meio BDA. O grupo EPC não apresentou crescimento no meio BDAP, porém apresentou 1 UFC no meio BDA. Foi possível observar que, após 48h em meio BDA, os grupos pasteurizados não obtiveram crescimento, mantendo suas UFCs após 72h.

**Tabela 2.** Resultado das análises microbiológicas de diferentes concentrações do extrato de algaroba

Amostras	T24 BDAP	T24 BDA	T48 BDAP	T48 BDA	T72 BDAP	T72 BDA
CG	0	0	0	0	0	0
CGT	0	80	17	83	19	93
EPC	0	0	0	1	0	1
EFC	3	32	7	37	16	43
EPR	2	66	16	70	21	70
EFR	21	24	26	28	35	29

CG: Grupo Controle (apenas o meio de cultura); CGT: Grupo Controle (meio de cultura e TRIS); EPC: extrato pasteurizado congelado; ENPC: extrato não pasteurizado congelado; EPR: extrato pasteurizado refrigerado; ENPR: extrato não pasteurizado refrigerado. T24= Refrigeração dos diluidores à 5 °C por 24 horas; T48= Refrigeração dos diluidores à 5 °C por 48 horas; T72=Refrigeração dos diluidores à 5 °C por 72 horas. BDA (Meio Batata-Dextrose-Ágar). BDAP (Meio padrão Batata-Dextrose-Ágar).

O meio BDA apresentou maior número de UFCs quando comparado ao ágar industrial. Os grupos experimentais apresentaram UFCs em menor quantidade que o GCT. Isso se deve, segundo Silva (2009), a presença de metabólitos secundários presente na algaroba que agem como antimicrobianos e antifúngicos. Os principais metabólitos secundários descritos na algaroba foram

as saponinas (GONZÁLES-GALÁN, 2009), terpenos, caratenoides e taninos (MALIK *et al.*, 2018; RUTO *et al.*; 2018).

### 3.3 EXPERIMENTO II

Na análise de viscosidade (tabela 3), apenas as amostras 2B e 3A divergiram do controle em 10 °C. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre as amostras e o controle em 37 °C. Porém houve diferença ( $P<0,05$ ) entre as temperaturas 10 °C e 37 °C.

**Tabela 3.** Ensaio reológico de diferentes concentrações do extrato da algaroba diluídos para a conservação de espermatozoides bovinos refrigerados

Amostras	10° C	37° C
CG	1,5 ± 0,2Aa	0,6 ± 0,1Ba
1A	1,4 ± 0,3Ab	0,7 ± 0,1Ba
1B	1,3 ± 0,2Aa	0,6 ± 0,1Ba
2A	1,4 ± 0,2Aa	0,7 ± 0,3Ba
2B	1,2 ± 0,2Ab	0,6 ± 0,1Ba
3A	1 ± 0,2Ab	0,5 ± 0,1Ba
3B	1,4 ± 0,2Aa	0,7 ± 0,1Ba
4A	1,2 ± 0,3Aa	0,6 ± 0,2Ba
4B	1,3 ± 0,1Aa	0,6 ± 0,1Ba

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre as temperaturas ( $p<0,05$ ). CG: Grupo Controle (tampão TRIS); Grupo 1: Extrato pasteurizado refrigerado; Grupo 2: Extrato pasteurizado congelado; Grupo 3: Extrato não pasteurizado refrigerado; Grupo 4: Extrato não pasteurizado congelado.

A viscosidade de um líquido é uma resposta das forças intermoleculares que restringem o movimento molecular. Essas forças dependem dos espaçamentos intermoleculares que determinam o volume livre e são afetados pelas mudanças na temperatura e na pressão (HOLDSWORTH, 1971). Maia (2012) ainda salienta que a viscosidade é um fator que se altera com o processo de pasteurização. Nos nossos achados, os todos os apresentaram diminuição na viscosidade após 37 °C (pasteurizados e não pasteurizados), enquanto que em 10 °C todos os grupos aumentaram sua viscosidade. Essa mudança, segundo Anacleto (2015), ocorre devido à presença de cálcio no meio.

Ele ainda enfatiza que a variação da viscosidade de um líquido está diretamente ligada a diferentes concentrações de cálcio presente. Como foi demonstrado, todos os grupos possuem cálcio na sua composição, então, isto explica a variação encontrada entre os grupos.

Nas análises espermáticas, a motilidade (tabela 5) não sofreu variação no grupo controle em relação ao tempo de refrigeração, mas divergiu entre os grupos acrescidos do extrato em diferentes tratamentos e armazenamentos. O grupo 2A apresentou a maior taxa de motilidade após 48h e a 1B, a menor. A amostra 1B, apesar de apresentar o maior nível de açúcar, não conseguiu manter a motilidade dos espermatozoides após 48h de refrigeração.

O grupo 1B, em 24h, apresentou motilidade maior do que em 0h. Isso se deve ao fato do extrato apresentar açúcares que são capazes de penetrar na célula espermática e aumentar o seu vigor, agindo como promotor de ativação mitocondrial.

Dentre as amostras do extrato aquoso, o melhor resultado após 48h, segundo o manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA, 2013), foi da amostra 2A. Segundo o manual, a motilidade pós-criopreservação deverá ser igual ou superior a 30% e o da amostra foi de  $45,8 \pm 4,3$ , sendo menor apenas que o controle. As demais amostras, com exceção do controle, não apresentaram essa motilidade.

**Tabela 5.** Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de motilidade total subjetiva de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados em diferentes concentrações do extrato aquoso de algaroba

Tempo	CG	1A	2A	1B	2B
0h	84,0 $\pm$ 5,9 Aa	88,0 $\pm$ 5,7 Aa	37,0 $\pm$ 5,7 Ab	30,8 $\pm$ 3,8 Ab	30,8 $\pm$ 3,0 Ab
24h	82,4 $\pm$ 5,9 Aa	51,3 $\pm$ 15,1 Bb	54,0 $\pm$ 7,4 Ab	12,5 $\pm$ 2,9 Ac	28,0 $\pm$ 18,1 Ac
48h	72,0 $\pm$ 5,4 Aa	11,8 $\pm$ 7,0 Bc	45,8 $\pm$ 4,3 Ab	12,5 $\pm$ 2,9 Ac	15,6 $\pm$ 13,7 Ac

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tempos de avaliação ( $p < 0,05$ ). CG: Grupo Controle (tampão TRIS); Grupo 1: Extrato pasteurizado refrigerado; Grupo 2: Extrato pasteurizado congelado.

Na análise da integridade da membrana (Tabela 6), observou-se que em 48h não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais e o controle, demonstrando que o extrato foi capaz de manter a membrana intacta após esse período de tempo.

Na análise do teste de funcionalidade da membrana plasmática (Tabela 7), apenas o 2B apresentou diferença em 0h em relação ao grupo controle. Em 24h, apenas o grupo 1A não obteve

diferença em relação ao grupo controle. Em 48h, nenhum grupo apresentou diferença significativa comparada ao controle.

**Tabela 6.** Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) da integridade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados em diferentes concentrações do extrato aquoso de algaroba

Tempo	CG	1A	2A	1B	2B
0h	38,8 $\pm$ 6,8 Aa	41,3 $\pm$ 1,0 Aa	37,5 $\pm$ 2,1Aa	41,3 $\pm$ 1,7 Aa	42,3 $\pm$ 3,2 Aa
24h	49,0 $\pm$ 2,2 Ba	39,3 $\pm$ 3,0 Aa	39,0 $\pm$ 2,9 Aa	42,3 $\pm$ 4,1 Aa	42,0 $\pm$ 8,8 Aa
48h	44,8 $\pm$ 4,6 Aa	34,0 $\pm$ 2,4 Ab	36,5 $\pm$ 3,1 Aab	39,5 $\pm$ 2,9 Aab	38,0 $\pm$ 4,2 Aab

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tempos de avaliação ( $p < 0,05$ ). CG: Grupo Controle (tampão TRIS); Grupo 1: Extrato pasteurizado refrigerado; Grupo 2: Extrato pasteurizado congelado.

**Tabela 7.** Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) da funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados em diferentes concentrações do extrato aquoso de algaroba

Tempo	CG	1A	2A	1B	2B
0h	77,0 $\pm$ 5,3 Aa	68,2 $\pm$ 7,9 Aa	73,2 $\pm$ 5,7 Ab	71,5 $\pm$ 2,9 Aa	60,7 $\pm$ 2,9 Ab
24h	55,7 $\pm$ 11,9 Ba	43,2 $\pm$ 5,4 Ba	41,0 $\pm$ 1,2 Bb	38,0 $\pm$ 4,0 Bb	42,5 $\pm$ 2,1 Bb
48h	42,5 $\pm$ 2,1 Ca	41,7 $\pm$ 1,3 Ba	37,5 $\pm$ 1,3 Ba	40,5 $\pm$ 8,3 Ba	41,2 $\pm$ 1,0 Ba

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os tempos de avaliação ( $p < 0,05$ ). CG: Grupo Controle (tampão TRIS); Grupo 1: Extrato pasteurizado refrigerado; Grupo 2: Extrato pasteurizado congelado.

Não foi encontrado diferença ( $P > 0,05$ ) do mineral fósforo (P) dentre os grupos utilizados para a avaliação seminal. O P é um dos componentes da membrana celular, participando do processo de formação de fosfolipídios juntamente ao ácido graxo e glicerol e uma molécula nitrogenada (ALBERTS *et al.*, 2017). O extrato aquoso apresentou quantidade de P maior do que a encontrada no sêmen de galos (GHANIEI *et al.*, 2018). Outro estudo demonstrou a relação positiva entre os elementos Cobre (Cu) e o P, no plasma seminal de touros, quando se analisou os parâmetros de qualidade dos ejaculados (MÁCHAL *et al.*, 2002).

Máchal e colaboradores (2002), demonstraram, ainda, que a alta concentração do íon cálcio afeta de forma negativa a motilidade dos espermatozoides. A presença do cálcio extracelular é capaz

de ativar canais de cálcio, dependentes de voltagem (Cav), fazendo com que esse elemento entre no citosol da célula e inicia uma cascata, resultando no processo de contração (SILVERTHORN, 2017; p. 415). O cálcio, também, participa do processo de capacitação espermática, ativando as enzimas hidrolases ácidas, presente no acrossoma do espermatozoide, no processo de fecundação (ALBERTS *et al.*, 2017; p. 779). No extrato aquoso da algaroba, entretanto, o cálcio não apresentou diferença significativa entre os grupos, porém todos se diferenciam do controle. A quantidade de cálcio presente no controle ( $24,048 \pm 0,005$ ), foi maior do que os demais grupos. Assim como o fósforo, neste trabalho não foi possível associar de forma direta a ação cálcio nos resultados das avaliações seminais.

Diferente dos dois elementos acima, a presença dos açúcares no extrato aquoso foi um fator que pode ser notado nas avaliações seminais. Esse carboidrato, participa da via da glicólise, transformando a molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, e conseqüentemente, duas de trifosfato de adenosina (ATP), que fornecerá para a célula energia livre. No espermatozoide, essa energia será utilizada para a movimentação da cauda (LEHNINGER, 2019, p. 443). Em diluidores seminais, o açúcar fornece proteção extracelular, evitando assim danos à membrana plasmática do espermatozoide, causada pelo processo de criopreservação e das ROS (HERDIS *et al.*, 2019).

O grupo que apresentou maior quantidade de açúcares (EPR), após 48h apresentou a menor motilidade entre os grupos, o que evidenciou que o excesso de açúcar a longo prazo não é benéfico para a célula espermática. Todos os grupos que continham o extrato, após 48h tiveram redução da motilidade, porém apresentavam alto vigor. No teste de integridade de membrana plasmática, após 48h, todos os grupos, incluindo o controle, conseguiram manter a membrana íntegra. Assim, a presença do carboidrato agiu como crioprotetor externo na célula espermática. Na funcionalidade de membrana todos os grupos, após 48h, divergiram do controle, estando porém dentro do padrão aceitável.

Alguns estudos demonstraram que a presença de carboidratos (sacarose, lactose e frutose), em diluidores foram benéficos para criopreservação de sêmen de peixes (VASCONCELOS *et al.*, 2018), bovino (FARIAS *et al.*, 2019) e equinos (HEMPEL, 2019). Nosso estudo acredita que o  $Ca^{2+}$  pode ter uma participação indireta com o processo de motilidade espermática, uma vez que não conseguimos descrever o mecanismo de ação desse elemento, nas condições deste estudo.

#### **4 CONCLUSÃO**

Baseado no exposto, a pasteurização do extrato de algaroba não altera os componentes importantes para a preservação de amostras seminais em refrigeração e diminui o crescimento

microbiológico do meio. O extrato preserva os parâmetros de motilidade, integridade e funcionalidade de membrana plasmática de espermatozoides bovinos refrigerados. Desta forma, conclui-se que o extrato aquoso pasteurizado e congelado da algaroba *Prosopis juliflora*, diluído em solução tampão pode ser utilizado como um potencial crioprotetor vegetal de células espermáticas durante a refrigeração, como substituto à gema de ovo e o leite.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos laboratórios da UFPB, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp); Laboratório de Tecnologia de Alimentos/Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças (LTA); Laboratório de Bioquímica de Alimentos (LABA); Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), Laboratório de Saneamento Ambiental (LabSam), por todo apoio prestado à execução deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre. 5ª. 2017. 1464p.
- ALMEIDA, F.C.; SILVA, S.V.; SOUZA, H.M.; GOMES, W.A.; LIMA FILHO, J.A.; WICKE, A.A.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. **Andrologia**, v.49, n.3, p.1-9, 2017.
- ANACLETO, J.V.T. **Avaliação da influência de cálcio e magnésio nas propriedades dos fluidos de perfuração**. 2015. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química do Petróleo), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.
- APHA - American Public Health Association. Water. Environment Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, DC, USA. 21ª. 2005. 2671p.
- BATISTA, R.I.T.P. **Criopreservação de sêmen**. 2015. 26 slides. Disponível em: <<http://www.uece.br/lfcr/dmdocuments/criopreservacao%20semen.pdf>>. Acesso em: 22 de julho de 2020.
- BERGSTEIN-GALAN, T.G. WEISS, R.R. KOZICKI, L.E. BICUDO, S.D. Espermatozoides epididimário: refrigeração e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.3, p.659-664, jul./set. 2017.
- BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.303-314, 2011.
- BORGES, M.F. Extrato de algaroba como fonte de carbono para obtenção de celulose bacteriana. In: **Anais do XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos; X Simpósio de Hidrólise Enzimática De Biomassas**, 2013, Foz de Iguaçu, PR, Brasil.



BRAGA, M.F.C. Efeito de diferentes concentrações de antioxidantes na proteção contra o stress oxidativo e na viabilidade espermática durante a criopreservação do sêmen equino. 2014. 74f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica)**. Departamento de Ciências Agrárias. Universidade dos Açores. Ponta Delgada - Portugal.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 5ª ed. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.

BRITO, B.F. Criopreservação de sêmen ovino em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) adicionada de óleo de coco extravirgem. 2017. 64f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária, concentração Reprodução e Sanidade Animal)** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE. 2017.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128–134, 2008.

CARNEVALE, R.F.; MURO, B.B.D; MONTEIRO, M.S.; TORRES, M.A.; MARTINS, S.M.M.K.; PASSARELLI, M.S.; PAPA, F.O; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; MEIRELLES, F.V.; ANDRADE, A.F.C. A fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides suínos é afetada por diferentes tempos de holding time? In: XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2017, Santos, SP. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2017. v.41. p.526-526.

CARVALHO, L.C. **Produção de cerveja artesanal com uso de algaroba (*Prosopis juliflora*) como adjunto fermentável**. 55 f. 2018. Monografia (Graduação em Gastronomia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB. 2018.

CAVALCANTI, A.L.; OLIVEIRA, K.F.; PAIVA, P.S.; RABELO, M.V.D.; COSTA, S.K.P.; VIEIRA, F.F. Determinação dos sólidos Totais (°BRIX) e Ph em Bebidas Lácteas e Sucos de frutas Industrializados. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.6, n.1, p.57-64. jan.-abr., 2006.

CAVALCANTI, I.L.R.; MOURA, I.A.A.; CRUZ, .D.A.; SILVA, M.C.D.; LOPES, R.M.B.P. Caracterização química do resíduo da biomassa da algaroba para fins de estudos energéticos. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.1, p.872-881, jan, 2020.

CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal: manual de orientação**. 3ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

DIAS, E.C.; ANDRADE, A.S.A.; SILVA, A.L.; DIAS, C.H.A.; SOUSA, A.C.B.; ALMEIDA, A.F. Utilização do extrato aquoso da algaroba na produção de biossurfactantes por bacillus subtilis. **Revista Saúde & Ciência Online**. v.7, n.2, p.397-412, 2018.

FARIAS, C.F.A.; TORK, A.L.P.; RIQUE, A.S.; QUEIRÓZ, A.F.; SILVA. S.V. Estudo da eficácia da Aloe vera como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.3, p.787-794. jul./set. 2019.

FELKER, P.; TAKEOKA, G.; DAO, LAN. Pod Mesocarp Flour of North and South American Species of Leguminous Tree Prosopis (Mesquite): Composition and Food Applications. **Food Reviews International**, v.29, p.1-29, 2012.

FERNANDES, P.C.L. **Validação e Controlo de Qualidade do Fósforo Total em Águas Residuais Análise da Qualidade da Água**. 145 f. Dissertação (Mestre em Química Industrial), Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal. 2015.

FLORA BRASIL. *Prosopis juliflora*. Disponível em: <<http://inct.florabrasil.net/herbario-virtual/>> Acesso em 22 de julho de 2020.

GHANIEI, A.; ESLAMI, M.; BABAEI-MARZANGO, S.S. Determination of calcium, magnesium, phosphorus, iron, and copper contents in rooster seminal plasma and their effects on semen quality. **Comparative Clinical Pathology**, v. 27, p. 427–431. 2018.

GONZÁLES GALÁN, A. **Estudo da farinha e da goma de algaroba (*Prosopis spp*)**. 2009. 166 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, UFLA. Lavras, MG. 2009.

GREISON, W.S.S.; SILVA, J.N.T.; HEMPEL, M.S.S.; SILVA, C.G.; SILVA, S.V. Comparação entre o meio padrão batata ágar dextrose (BDAP) e o meio batata dextrose ágar a base de caldo de batata (BDA) em análise microbiológica de diluidores seminais. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 23, Gramado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.732, abr./jun., 2019.

GUSMÃO, R.P.; GUSMÃO, T.A.S.; MOURA, H.V.; DUARTE, M.E.M.; CAVALCANTI-MATA, M.E.R.M. Caracterização tecnológica de cookies produzidos com diferentes concentrações de farinha de algaroba durante armazenamento por 120 dias. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.21. p.1-9, 2018.

HEMPEL, M.S.S. **Efeito do extrato de algas na refrigeração de sêmen equino**. 38 f., 2019. Monografia (Trabalho de conclusão de curso). Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB. 2019.

HEMPEL, M.S.S.; TORR, A.L.P.; BANDEIRA, L.B.P.; BARROS, L.; FREIRE, K.R.L.; SILVA, S.V. Hibiscus sabdariffa extract for use in stallions semen refrigeration. In: VII International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2019, Aracaju. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2018. v.16. p.149-149.

HERDIS.; SURACHMAN, M.; DARMAWAN, W.A.; AFIFAH. The role of sucrose as extracellular cryoprotectant in maintaining the Garut rams' frozen semen quality. **AIP Conference Proceedings**. v. 20, n. 21. p. 1-6. 2019.

HOLDSWORTH, S.D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v.2, p.393–418. 1971.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Painel de indicadores**. 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/indicadores#variacao-do-pib>> Acesso em 22 de julho de 2020.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produto Interno Bruto**. 2020. Disponível em:

<<https://www.ibge.gov.br/explica/pib.php#:~:text=O%20PIB%20%C3%A9%20a%20soma,cidade%2C%20geralmente%20em%20um%20ano.&text=O%20PIB%20do%20Brasil%20em,%24%201%20803%2C4%20bilh%C3%B5es.>> Acesso em 22 de julho de 2020.

- LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7ª Edição, 2019. Ed. Artmed.
- MÁCHAL, L.; CHLÁDEK, G.; STRAKOVÁ, E. Copper, phosphorus and calcium in bovine blood and seminal plasma in relation to semen quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.11, n.3, p.425-435, 2002.
- MALIK, S.K.; AHMED, M.; KHAN, F. Identification of novel anticancer terpenoids from *Prosopis juliflora* (Sw) DC (Leguminosae) pods. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research April**, v.17, n.4, p.661-668, 2018.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MOURA NETO, L.G. **Preparação e aplicação de revestimento comestível em laranjas cv. valência delta a partir de galactomananas de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora* (sw) D.C.)**. 86 f. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 2016.
- MUNIZ, M.B.; SILVA, F.L.H.; ALMEIDA, M.M.; SAMPAIO, P.M.; ROCHA, A.S.; SILVA, C.G. **Avaliação do processo de enriquecimento nutricional da vagem da algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC)**. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM 2009), 2009, Natal. Anais do SINAFERM 2009. Natal: UFRN, 2009. v. CD. p. 1-6.
- NOGUEIRA, E.T.S. **Uso de algaroba (*Prosopis juliflora*) como adjunto do malte na elaboração de cerveja artesanal**. 55 f. 2016. Monografia (Especialização). Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina - PE. 2016.
- NASCIMENTO, E.S.; LIMA, H. S. L.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I.; ROSA, M.F.; BORGES, M. F. Extrato de algaroba como fonte de carbono para obtenção de celulose bacteriana. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos/Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2013, Foz do Iguaçu. Simpósio Nacional de Bioprocessos/Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2013.
- OLIVEIRA, L.F.B.; SILVA, A.P.F.; DANTAS, D.L.; COSTA, J.D.; MACEDO, A.D.B.; SANTANA, R.A.C.; CAMPOS, A.R.N. Elaboração de farinha de algaroba por secagem em forno de micro-ondas. **Revista Saúde & Ciência Online**, v.5, p.225-231. 2016.
- POSSIDONIO, A.P.V.; FARIAS, C.F.A.; RIQUE, A.S.; TORK, A.L.P.; BATISTA, J.I.L.; MARCONE, J.P.F.; FREIRE, K.R.L.; SILVA, S.V. Preparação de um extrato alcoólico de *Hibiscus sabdariffa* para estudos em espermatozoides caprinos. In: XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2017, Santos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2017. v.41. p.501-501.
- ROCHA, D. Potencialidades biotecnológicas das vagens da algarobeira. 2019. Disponível em: <<http://www.ct.ufpb.br/lba/contents/menu/algarobeira/aguardente-de-algaroba>> Acesso em 23 de julho de 2020.
- RUTO, M.C.; NGUGI, C.M.; KARERU, P.G.; CHERUIYOT, K.; RECHAB, S. O. MADIVOLI, E. S.; MUTEMBEI, J.; KAIRINGO, P.K.; MAINA, E.G. Antioxidant activity and antimicrobial properties of *Entada leptostachya* and *Prosopis juliflora* extracts. **Journal of Medicinal Plants for Economic Development**, v. 2, n.1, p.1-8, 2018.

SZARKA, A., TOMASSKOVICS, B., BÁNHEGYI, G. The ascorbate-glutathione-  $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p. 4458-83. 2012.

SANTOS, B.M.B.; BRITO, B.F.; MAIA, L.C.P.; PIRES, R.S.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. Congelamento do sêmen de pequenos ruminantes sem uso de gema de ovo utilizando bases vegetais em substituição à gema de ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.42. n.3-4. p.96-100. jul.-dez. 2018.

SILVA, C.G.; MATA, M.E.R.M.C.; BRAGA, M.E.D.; QUEIROZ, V.S. Extração e Fermentação do Caldo de Algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) para obtenção de aguardente. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.1, p.51-56, 2003.

SILVA, C.G.M.; FILHO, A.B.M.; PIRES, E.F.; STAMFORD, T.L.M. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.733-36, oct./dec, 2007.

SILVA, C.G. **Otimização do processo de produção da aguardente de algaroba e aproveitamento dos resíduos sólidos em produtos alimentares**. 219 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. PB. 2009.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 960p.

VASCONCELOS, A.C.N.; FELIZARDO, V.O.; CARVALHO, A.F.S.; GARCIA, R.R.F.G.; RAMOS, S.E.; MURGAS, L.D.S. Cryopreservation of *Prochilodus lineatus* semen: effect of cryoprotectants combination. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.41, p.817-824, nov., 2018.