



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL**

ZELMA HOLANDA DO NASCIMENTO

**EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA: UMA ALTERNATIVA
PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS DE
VACAS**

**FORTALEZA – CEARÁ
2023**

ZELMA HOLANDA DO NASCIMENTO

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA: UMA ALTERNATIVA
PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS DE
VACAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Camila Calado de Vasconcelos.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Valesca Barreto Luz.

FORTALEZA – CEARÁ

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo SidUECE, mediante os dados fornecidos pelo(a)

Nascimento, Zelma Holanda do.

Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha: uma alternativa para o desenvolvimento de meios de conservação de ovários de vacas [recurso eletrônico] / Zelma Holanda do Nascimento. - 2023.

58 f.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Mestrado Profissional - Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof.^a Dra. Camila Caladô de Vasconcelos.

Coorientação: Prof.^a Dra. Valesca Barreto Luz.

1. Produtos naturais. 2. Antioxidantes. 3. Viabilidade celular. 4. Bos taurus. I. Título.

ZELMA HOLANDA DO NASCIMENTO

EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA: UMA ALTERNATIVA
PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CONSERVAÇÃO DE OVÁRIOS DE
VACAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 14 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Camila Calado de Vasconcelos (Orientadora)
Centro Universitário Cesmac

Prof.^a. Dr.^a. Valesca Barreto Luz (Co-Orientadora)
Centro Universitário Cesmac

Prof. Dr. Axel Helmunt Rulf Cofré
Centro Universitário Cesmac – Cesmac

Prof.^a Dr.^a Ana Soraya Lima Barbosa
Centro Universitário Cesmac – Cesmac

Aos meus pais: Manoel Francisco do Nascimento (*in memoriam*) e Zélia de Holanda Cavalcante por todo o amor e carinho que eles têm por mim e por todo o suporte e ajuda que me deram para que eu pudesse estar aqui. Aos meus filhos Norton José Badú Holanda, Nicolas Manoel Badú Holanda e Nicole Maria Holanda Lima e ao meu companheiro José Badú de Lima Irmão (Dinho) por todo o incentivo durante esta árdua caminhada na qual estivemos todos unidos e perseverantes. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Senhor nosso Deus, por ter me concedido o dom da Vida, por tudo que Ele tem me preparado, por esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal, e por sempre abençoar minha vida e minha família.

À minha mãe Zélia de Holanda Cavalcante, por tudo que ela é para mim e por todo o amor e carinho que ela dedica a mim e aos meus filhos, sempre me apoiando e incentivando em todos os caminhos que eu trilhei nos bons e nos maus momentos da minha vida, onde sem seu apoio e sua dedicação eu não conseguiria chegar onde cheguei e assim nada seria. Mamãe, esse mérito também é seu!

A todos os meus amigos(as) e anjos que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio e incentivo.

À minha estimada orientadora, Camila Calado de Vasconcelos, pela confiança, por toda dedicação, paciência e carinho, por estar sempre disponível a me ensinar e por sempre estar disposta a me ajudar; e pela amizade construída semelhante à de uma mãe-amiga que dispensa seu tempo, paciência e carinho em instruir formidavelmente seus filhos na idealização e execução deste trabalho, e apoio nos demais projetos vindouros. A você minha amizade, admiração, respeito e gratidão.

À minha co-orientadora, Valesca Barreto Luz, pela confiança, pela oportunidade de realizar o projeto e por toda a ajuda, paciência, dedicação e ensinamentos em todos os momentos e etapas de realização deste trabalho.

À amiga Marcileide por toda ajuda para a execução do projeto, pela paciência, pela confiança, por ceder o laboratório para realização dos experimentos e pelos ensinamentos.

À colega Farmacêutica Michelle da Silva Tavares Lobato Ramalho pela ajuda, paciência e dedicação; pelos ensinamentos e convívio durante a preparação e confecção do processamento histológico no Laboratório de histopatologia do Cesmac.

Aos alunos de graduação do curso de Medicina Veterinária que participaram do projeto, em especial ao Bruno, pela ajuda na execução do mesmo.

Aos alunos de graduação do curso de Farmácia, em especial Clíndia e Laís que ajudaram na realização das análises de atividade antioxidantes realizadas nos laboratórios de Líquidos da Farmácia Universitária do Cesmac.

A toda equipe do Frigorífico MAFRIAL, em especial ao Dr. Darlan Silva Costa, obrigada pela parceria e incentivo a pesquisa. Sua contribuição foi fundamental para

o nosso estudo, sem ele nada teria sido possível.

Ao professor Dr. João Gomes da Costa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Alimentos e Territórios, pela parceria na realização das análises estatísticas.

A todos os amigos que construí nesta jornada, especialmente aqueles que fizeram parte da turma III e IV do mestrado Programa de Pós-Graduação Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, e aos que já possuía e que estiveram ao meu lado com palavras de incentivo nas horas difíceis, pelo auxílio nos trabalhos e, por estarem presentes nesta caminhada cooperando direta ou indiretamente para concretização desta etapa. Saibam que vivi com vocês momentos de construção do saber, contentamento e alegria.

Ao meu terapeuta Allysson Lessa Santos pelo apoio e dedicação em me acompanhar nesse mergulho do autoconhecimento e transbordar de emoções que perpassaram essa trajetória. Obrigada pela condução no ressignificar de minha vida, especialmente, após o bloqueio intelectual pós COVID-19 que vivenciei, mediante do medo que me dominava e que temia ter me tornado analfabeto funcional. Voltar a ler e a escrever mesmo que a passos lentos, foi fundamental para eu alcançar meus objetivos. Meu muito obrigada.

A todos os professores que ministraram as disciplinas obrigatórias e optativas do programa do PPGBIOTEC do ponto focal Cesmac.

Aos preceptores do estágio obrigatório realizado no Hemocentro de Alagoas (HEMOAL), Prof. Valber e Prof. Humberto e a toda equipe do Laboratório de Imunohematologia, obrigada pelo acolhimento e pela partilha de conhecimento.

À professora Cristiane pelos conselhos para o bom andamento do projeto.

À professora Magna pela paciência na correção ortográfica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais este projeto de vida: muito obrigada!

“Tudo aquilo que sou ou espero ser,
devo a um anjo: minha mãe”.

(Abraham Lincoln)

RESUMO

A utilização de produtos naturais com elevado potencial antioxidante, como a própolis vermelha originária do Estado de Alagoas, podem constituir uma alternativa viável para a conservação de oócitos durante o transporte de ovários de animais de alto valor zootécnico, visto que minimizam os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo pela redução do aporte sanguíneo. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha como alternativa para conservação de folículos ovarianos de vacas. A amostra de própolis vermelha bruta foi adquirida em apiário localizado na cidade de Marechal Deodoro, Alagoas e, posteriormente realizou-se a obtenção do extrato hidroalcoólico através da técnica de maceração empregando o álcool etílico 70% v/v como solvente extrator. A capacidade antioxidante desta solução foi determinada a partir do conteúdo total de fenóis e da capacidade sequestradora de radicais frente ao radical 2,2-Difenil-1-picril-hidrazina (DPPH[•]). A partir desta solução estoque realizou-se diluições seriadas até se obter às concentrações de 1 (C1), 2 (C2), 5 (C5) e 10% v/v (C10), sendo estas utilizadas como meio de conservação de tecido ovariano. No estudo foram utilizados ovários (n=5 pares) de vacas adultas, que foram fragmentados e armazenados a 4° C durante 4 (T4) e 12 horas (T12), seguido de processamento histológico clássico. Após a obtenção dos dados foram realizadas análises multivariadas como a distância euclidiana média como uma medida de dissimilaridade (D²) e aplicado o método de otimização de Tocher. O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas produzido apresentou capacidade antioxidante capaz de preservar a morfologia folicular do tecido ovariano a depender da categoria avaliada nas condições experimentais investigadas. O extrato obtido apresentou conteúdo total de fenóis de 462,25 ± 14,99 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato seco e 32,12 % de inibição frente ao radical DPPH[•] e CI₅₀ de 10,06 µg mL⁻¹. Constatou-se que 27,8% dos folículos do controle a fresco se mantiveram intactos (normais), enquanto 72,2% foram classificados como degenerados. Quanto às condições experimentais investigadas, verificou-se que o percentual de folículos normais variou de 60,8% a 87,9%, respectivamente nas condições experimentais T12C2 e T4C5. Já os folículos classificados como degenerados variam de 11,53% a 42,56% equivalentes às condições experimentais T12C2 e T4C5, respectivamente. O número de folículos ovarianos identificados no estudo variou de 52 a 124, respectivamente nas condições

experimentais de T4C5 e T12C2. Na temperatura de 4°C com tempo de exposição de 4h a maior eficácia na conservação dos folículos (87,95%) foi na condição experimental que possuía como meio de conservação o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha à 5% (T4C5). Já com tempo de exposição de 12h a maior eficácia na conservação dos folículos (71,53%) foi na condição experimental que possuía como meio de conservação o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha à 5% (T12C5), implicando que a concentração de 5% mais recomendada como meio de conservação. A análise estatística indicou que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas preservou a morfologia folicular do tecido ovariano a depender da categoria avaliada nas condições experimentais investigadas. Entretanto, necessita-se de estudos mais detalhados para identificação da concentração mais viável do extrato frente a cada categoria folicular.

Palavras-chave: Produtos naturais; Antioxidantes; Viabilidade celular; *Bos taurus*.

ABSTRACT

The use of natural products with high antioxidant potential, such as red propolis from the State of Alagoas, may be a viable alternative for the conservation of oocytes during the transport of ovaries from animals of high zootechnical value, since they minimize the cellular damage caused by the oxidative stress by reducing blood supply. Thus, the aim of this study was to evaluate the use of red propolis hydroalcoholic extract as an alternative for conservation of cow ovarian follicles. The raw red propolis sample was purchased from an apiary located in the city of Marechal Deodoro, Alagoas, and subsequently the hydroalcoholic extract was obtained through the maceration technique using ethyl alcohol 70% v/v as extractor solvent. The antioxidant capacity of this solution was determined from the total phenol content and radical scavenging capacity against the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH•) radical. From this stock solution, serial dilutions were performed until concentrations of 1 (C1), 2 (C2), 5 (C5) and 10% v/v (C10) were obtained, which were used as a means of preserving ovarian tissue. The study used ovaries (n=5 pairs) of adult cows, which were fragmented and stored at 4° C for 4 (T4) and 12 hours (T12), followed by classic histological processing. After obtaining the data, multivariate analyzes were performed with the average Euclidean distance as a measure of dissimilarity (D2) and the Tocher optimization method was applied. The hydroalcoholic extract of red propolis from Alagoas produced showed antioxidant capacity capable of preserving the follicular morphology of the ovarian tissue depending on the category evaluated in the experimental conditions investigated. The extract obtained showed a total phenol content of 462.25 ± 14.99 mg of gallic acid equivalents/g of dry extract and 32.12% inhibition against the DPPH• radical and IC₅₀ of $10.06 \mu\text{g mL}^{-1}$. It was found that 27.8% of fresh control follicles remained intact (normal), while 72.2% were classified as degenerated. As for the investigated experimental conditions, it was verified that the percentage of normal follicles varied from 60.8% to 87.9%, respectively in the experimental conditions T12C2 and T4C5. The follicles classified as degenerated vary from 11.53% to 42.56% equivalent to experimental conditions T12C2 and T4C5, respectively. The number of ovarian follicles identified in the study ranged from 52 to 124, respectively in the experimental conditions of T4C5 and T12C2. At a temperature of 4°C with an exposure time of 4h, the greatest efficiency in the conservation of the follicles (87.95%) was in the experimental condition that had as a preservation medium the hydroalcoholic

extract of red propolis at 5% (T4C5). With an exposure time of 12 hours, the greatest effectiveness in preserving the follicles (71.53%) was in the experimental condition that had 5% red propolis hydroalcoholic extract (T12C5) as a preservation medium, implying that the 5% concentration recommended as a means of conservation. Statistical analysis indicated that the hydroalcoholic extract of red propolis from Alagoas preserved the follicular morphology of the ovarian tissue depending on the category evaluated in the experimental conditions investigated. However, more detailed studies are needed to identify the most viable concentration of the extract for each follicular category.

Keywords: Natural products; Antioxidants; Cell viability; *Bos taurus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática das etapas envolvidas na foliculogênese.....	22
Figura 2 -	Representação esquemática da obtenção das soluções trabalho de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.....	31
Figura 3 -	Reação do galato de sódio com o molibdato (VI), componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	32
Figura 4 -	Reação de redução do radical DPPH[•] por um antioxidante genérico RH.....	33
Figura 5 -	Representação esquemática do procedimento experimental proposto para as soluções trabalho contendo 1, 2, 5 e 10% de EHPV como meio de conservação.....	35
Figura 6 -	Microscopia de tecido ovariano de vacas com identificação de folículo antral (a) e primário (b) com morfologia normal em meio de conservação.....	42
Figura 7 -	Microscopia de tecido ovariano de vacas com identificação de folículo antral (a) e primário (b) degenerados em meio de conservação proposto.....	43
Quadro 1 -	Características morfológicas de cada categoria folicular.....	23
Quadro 2 -	Efeito da adição de diferentes extratos vegetais frente a conservação de tecido ovariano de diferentes espécies.....	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curva de calibração utilizando ácido gálico como representante de compostos fenólicos (6 – 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	37
Gráfico 2 -	Porcentagem de atividade sequestradora de radical frente ao DPPH• para solução mãe do EHPV obtido (21,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em função do tempo.....	38
Gráfico 3 -	Curva de calibração para solução mãe do EHPV obtido (7,2 – 21,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) após o tempo reacional de 30 minutos.....	39
Gráfico 4 -	Percentual de folículos morfologicamente normais e degenerados após conservação em diferentes condições experimentais.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Porcentagem de folículos morfologicamente normais e degenerados por categoria folicular.....	40
Tabela 2 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primordiais normais.....	44
Tabela 3 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primordiais degenerados.....	44
Tabela 4 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos de transição normais.....	44
Tabela 5 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos de transição degenerados.....	45
Tabela 6 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primários normais.....	45
Tabela 7 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primários degenerados..	45
Tabela 8 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos secundários normais....	45
Tabela 9 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos secundários degenerados.....	45
Tabela 10 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação às variáveis relacionadas à morfologia normal dos folículos primordial, transição, primário e secundário em conjunto.....	46
Tabela 11 –	Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação às variáveis relacionadas à morfologia degenerada dos folículos primordial, transição, primário e secundário em conjunto.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido Alfa Lipóico
CAT	Catalase
CTF	Conteúdo Total de Fenóis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
EAG/g	Equivalente de Ácido Gálico
GSH	Glutathiona
GPx peroxidase	Glutathiona peroxidase
GSH redutase	Glutathiona redutase
IC50	Concentração inibitória de 50%
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais
PBS	Phosphate Buffer Solution
SOD	Superóxido Dismutase
TCM 199	Meio de cultivo de tecido 199

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1	Conservação de tecido ovariano.....	20
3.1.1	Etapas limitantes do processo de refrigeração de tecido ovariano.....	23
3.1.2	Antioxidante e viabilidade celular de tecido ovariano.....	25
3.2	Produtos naturais como estratégia de conservação de tecido ovariano.....	26
3.2.1	Própolis vermelha.....	27
4	OBJETIVOS	29
4.1	Geral.....	29
4.2	Específicos.....	29
5	METODOLOGIA	30
5.1	Tipo de estudo.....	30
5.2	Local da pesquisa.....	30
5.3	Procedimentos.....	30
5.3.1	Aquisição da própolis vermelha	30
5.3.2	Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha	30
5.3.3	Avaliação da capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.....	31
5.3.3.1	<i>Determinação do conteúdo total de fenóis</i>	32
5.3.3.2	<i>Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH</i>	33
5.3.4	Coleta dos ovários e protocolo experimental.....	34
5.3.4.1	<i>Processamento histológico.....</i>	35
5.3.5	Análise estatística.....	36
6	RESULTADOS.....	37
7	DISCUSSÃO.....	48
8	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Os animais doadores de ovários destinados às biotécnicas reprodutivas encontram-se, comumente, em locais distantes dos laboratórios especializados. Neste sentido, a conservação de folículos ovarianos é de grande importância para preservá-los durante o transporte do tecido ovariano do local de colheita até o laboratório, garantindo, portanto, o fornecimento de folículos de boa qualidade para criopreservação e/ou cultivo que, posteriormente, podem ser destinados à maturação e fecundação *in vitro* (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; LIMA, 2015).

Segundo Castro *et al.* (2011) e Rodrigues *et al.* (2019) a conservação de tecido ovariano tem despertado interesse na comunidade científica que busca desenvolver excelência em protocolos experimentais que mantenham a viabilidade folicular durante o transporte de ovários do local da coleta ao laboratório. A qualidade dos oócitos depende da eficiência do meio de conservação, temperatura e tempo de transporte dos ovários, sendo considerados fatores limitantes na manutenção da qualidade folicular (MATOS *et al.*, 2004; GOMES; SENEDA, 2013; MOTTA *et al.*, 2019).

O armazenamento de ovários sem o suprimento sanguíneo pode afetar a qualidade oocitária, influenciando o desenvolvimento extracelular em torno do oócito (WONGSRIKEAO *et al.*, 2005 ; LIMA, 2011; ÁVILA, 2019;). Em geral, a hipotermia é aplicada para a conservação de tecidos no intuito de minimizar a taxa de energia consumida e, conseqüentemente, a taxa de autólise (SALEHI *et al.*, 2004; LIMA, 2011; MELO JÚNIOR, 2017; TAVARES, 2020). A autólise celular pode ocorrer em ovários durante um longo período de transporte a 35-38°C (HOLT; PICARD, 1999; MASSIP *et al.*, 2001; GOMES; SENEDA, 2013; MOTTA, 2016; MELO JÚNIOR, 2017).

Em temperaturas abaixo da temperatura corpórea, o metabolismo celular diminui e proteínas específicas que promovem a maturação oocitária são suprimidas. Estas proteínas são ativas quando os oócitos são colocados em meios adequados. Nesse contexto, ovários de bovinos devem ser submetidos a protocolos de resfriamento para manterem-se viáveis até a congelação que antecede as demais biotécnicas reprodutivas (RODRIGUES *et al.*, 2019).

A redução do metabolismo celular durante a conservação tem um efeito benéfico na manutenção da viabilidade folicular. A utilização deste protocolo facilita o transporte de ovários oriundos de animais de alto valor zootécnico, vivos ou mortos,

até os laboratórios especializados em biotécnicas de reprodução animal, facilitando também a troca de germoplasma entre laboratório (CASTRO *et al.*, 2011).

Produtos naturais, desde os tempos mais remotos, são empregados com diferentes finalidades, em função da diversidade de compostos bioativos. Considerando sua ampla aplicabilidade, estudos têm sido realizados com o intuito de investigar o efeito da adição de antioxidantes de origem natural aos meios de transporte para a produção de protocolos que venham a favorecer as pesquisas com tecidos, folículos ovarianos ou gametas masculinos (DUNDER *et al.*, 2013).

Neste contexto, a utilização de produtos naturais com elevado potencial antioxidante pode contribuir na conservação de oócitos a fim de minimizar os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (LUZ *et al.*, 2011). Dentre os produtos naturais de interesse científico destaca-se a própolis vermelha originária do Estado de Alagoas por sua composição química ser diferente das demais própolis brasileiras, apresentando as isoflavonas dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'-isoflavona, sendo os flavonoides mais abundantemente encontrados (SILVA, 2015).

Desta forma, a utilização do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha pode constituir uma alternativa para minimizar possíveis alterações celulares em oócitos durante o transporte dos ovários e, conseqüentemente, otimizar o potencial reprodutivo de animais de alto valor zootécnico, além de que protocolos utilizando ovários bovinos oriundos de descartes de abatedouros pode servir de modelo experimental para posteriores testes de conservação de ovários humanos.

2 JUSTIFICATIVA

A utilização de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas pode ser uma alternativa economicamente mais viável para minimizar os danos celulares em folículos ovarianos de animais de alto valor zootécnico ou ainda aqueles ameaçados de extinção, durante o transporte dos ovários do momento da coleta até o laboratório. A própolis vermelha é um produto natural com propriedades bioativas, especialmente, atividade antioxidante que contribui para manutenção da viabilidade celular e, conseqüentemente, favorece a aplicação das biotécnicas reprodutivas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Conservação de tecido ovariano

A conservação de material genético iniciou na década de 50 e vem evoluindo através das biotécnicas, especialmente a partir de pesquisas envolvendo mamíferos (LIMA; SANTOS, 2010). Na conservação de ovários, várias pesquisas foram realizadas e muitos avanços têm surgido com o intuito de aprimorar os protocolos experimentais de manutenção da viabilidade folicular durante o transporte de ovários do local da coleta ao laboratório (MATOS; BEZERRA; VICENTE *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2019).

As biotécnicas vinculadas as áreas da reprodução desenvolveram-se extensivamente nos últimos anos e têm possibilitado a empregabilidade do material genético de animais (NEVES; MIRANDA; TORTORELLA, 2010; CARRILHO, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2019). O manejo reprodutivo é de fundamental importância para a conservação das espécies, garantindo assim, o maior número de descendentes e conseqüente perpetuação da espécie, principalmente daqueles de alto valor zootécnico e ameaçados de extinção (LIMA; SILVA, 2017; FIORI, 2022).

O estoque folicular de células germinativas em mamíferos é limitado, e com o passar dos anos ele vai reduzindo, de forma natural, pela atresia. É imprescindível frisar que um grande montante de oócitos presentes no ovário ao nascimento não atinge a fase de ovulação. Portanto, o resgate desses oócitos e o emprego em biotécnicas se fazem necessários, a fim de maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas em estado de superioridade ou que estejam ameaçadas de extinção, podendo preservar esses oócitos para uma futura utilização (GONTIJO, 2018; FIGUEIREDO; LIMA, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Desta forma, os avanços de técnicas reprodutivas assistidas requerem melhores entendimentos no que cerne a fisiologia ovariana, mesmo com a enorme quantidade de informações científicas que a comunidade tem produzido e descoberto nos últimos anos (PRAXEDES *et al.*, 2018; ROSSETTO *et al.*, 2011). Figueiredo e Lima (2017) em suas observações constatou que em decorrência da perda fisiológica dos folículos ovarianos, houve a necessidade de implantar a técnica de “ovário artificial”, ao qual resgata folículos pré-antrais e os cultivam até maturação a fim de produzirem oócitos aptos a serem usados na produção *in vitro* de embriões, técnica

conhecida como manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA).

A literatura reporta inúmeros estudos acerca da conservação de tecido ovariano de mamíferos que é uma das etapas de MOIFOPA, em diferentes espécies como: suínos (BRITO, 2008), caprinos (CHAVES, 2007), catetos (LIMA *et al.*, 2014), caninos (PEREIRA; BERSANO; LOPES, 2015), gatas (TAVARES, 2020), ovinos (SILVA, 2017), bovinos (MORAIS, 2018; ROCHA, 2017), dentre outros (GONTIJO, 2018).

Os protocolos de conservação de tecido ovariano ainda não foram completamente padronizados (SANTOS; SILVA, 2022). No entanto, muitos foram os avanços conquistados quanto às biotécnicas reprodutivas, nas quais ao longo do tempo conduziram ao desenvolvimento e a eficiência reprodutiva frente à biotecnologia e a fisiologia ovariana utilizando a MOIFOPA como base para alcançar a viabilidade dos folículos ovarianos (BIZARRO-SILVA; SENEDA, 2021).

Os ovários de mamíferos desempenham papel crucial a favor do sistema reprodutor feminino, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento dos folículos. O ovário é constituído pelo córtex e pela medula ovariana com comprimento variando de 3 a 4,5 cm e a largura de 1,5 a 2,0 cm, sendo revestido por epitélio germinativo ou superficial acostado sob a membrana basal (BIZARRO-SILVA; SENEDA, 2021).

A região cortical do ovário situa-se na porção mais externa que caracteriza a região funcional do ovário, onde são encontrados diferentes tipos de células, como: células da granulosa, que corresponde às células de acúmulo ou murais, e células da teca que se diferenciam em camada interna e externa (BIZARRO-SILVA; SENEDA, 2021).

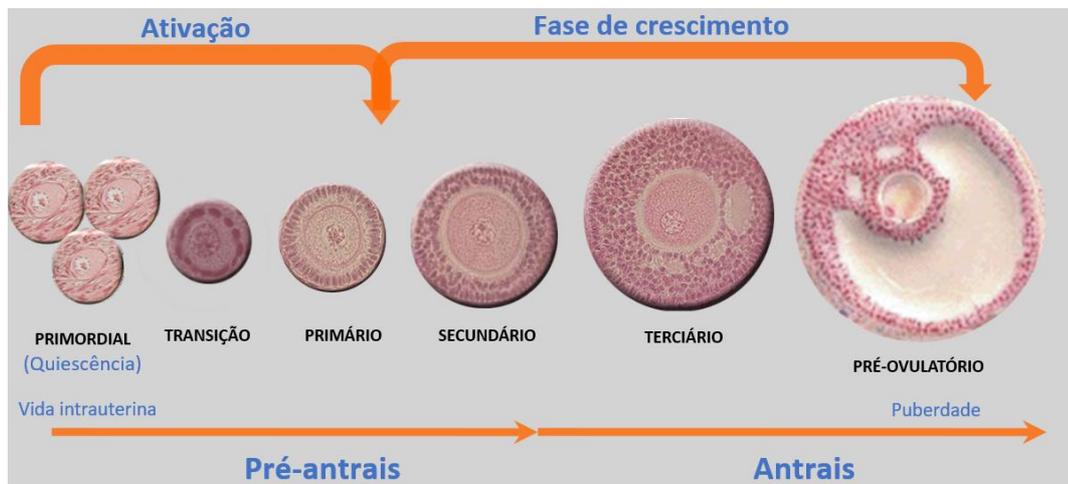
Os folículos ovarianos são a unidade morfofuncional encarregadas de facilitar, favorecer, assegurar um ambiente adequado para a manutenção e viabilidade, além do crescimento e maturação do oócito para o processo de ovulação. A formação e o desenvolvimento dos oócitos nas fêmeas são regulados por dois processos distintos e complementares, a oogênese e foliculogênese (SILVA, 2021; LIMA *et al.*, 2016).

A foliculogênese envolve a formação, o crescimento e a maturação folicular, se inicia com o folículo primordial e se encerra com o folículo pré-ovulatório. O objetivo primordial da foliculogênese é liberar o oócito maduro para que seja fecundado (SILVA, 2021).

No oócito a primeira fase meiótica ocorre entre 91 e 144 dias em bovinos. Quando os folículos passam a apresentar uma camada completa de células da granulosa de forma cúbica, após sua ativação, passam a ser primários com diâmetro folicular de $40,4 \pm 5,1\mu\text{m}$ e diâmetro oocitário de $27,3 \pm 2,8\mu\text{m}$ (SILVA, 2011; PLAZA, 2015).

Os folículos ovarianos podem ser classificados em dois grandes grupos, os folículos pré-antrais ou não cavitários e os folículos antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais compreendem os folículos primordiais, transição (intermediários), primários e secundários, enquanto os folículos antrais incluem os folículos terciários e os folículos pré-ovulatórios ou maduros (SILVA, 2021; LIMA *et al.*, 2016). A figura 1 representa as etapas envolvidas na foliculogênese e o quadro 1 contém as principais características morfológicas de cada categoria folicular.

Figura 1 – Representação esquemática das etapas envolvidas na foliculogênese.



Fonte: Adaptado de Gonçalves; Figueiredo; Freitas (2008).

Quadro 1 – Características morfológicas de cada categoria folicular.

Categoria folicular	Características morfológicas
Primordial	Oócito circundado por uma única camada de células somáticas de formato pavimentoso dispostas de forma irregular.
Transição	Oócito circundado por uma camada de células da granulosa, no qual pelo menos 3 destas células modificaram seu formato para cúbicas e as demais permaneceram no formato pavimentoso.
Primário	Oócito circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico.
Secundário	Oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico. Neste estágio há formação de camada da teca interna e membrana basal que delimita o espaço entre as células da granulosa e teca em proliferação.
Terciário	Conhecido como folículo antral inicial, neste estágio há formação de pequenos vacúolos entre as células da granulosa. Ainda, há a presença de células da teca interna e externa. O oócito já atingiu seu tamanho máximo.
Pré-ovulatório	Presença da grande cavidade antral com diferenciação de células murais (camada da granulosa fina circundada pela membrana basal) e células do <i>cumulus</i> (que circundam o oócito). O oócito está totalmente em posição excêntrica. As camadas de células da teca mantêm a espessura e circundam todo o folículo.

Fonte: Adaptado de Gonçalves; Figueiredo; Freitas (2008).

3.1.1 Etapas limitantes do processo de refrigeração do tecido ovariano

O desenvolvimento de protocolos de conservação visa melhorar as condições de transporte do material genético, a fim de manter a viabilidade celular, pois o grande obstáculo deste processo é o fato dos laboratórios estarem distantes de zoológicos e criatórios (GONTIJO, 2018). Uma vez que o estresse celular será minimizado pelas condições de conservação durante a etapa de transporte até o laboratório, aumenta-se a probabilidade deste material genético manter-se viável (LIMA, 2015; MOTTA *et al.*, 2019).

De acordo com Plácido (2009) a comunidade científica apresenta como método de escolha o resfriamento ao iniciar pesquisas com folículos pré-antrais, inclusos em tecido ovariano, como alternativas de conservá-lo em período curto, razão pela qual causa diminuição da temperatura tecidual que promoverá redução do metabolismo energético da célula, retardando o processo de degeneração celular.

No entanto, muitas pesquisas precisam ser exploradas no campo científico para que haja melhorias nos protocolos de conservação, pois eles necessitam de aprimoramento, especialmente ao que se refere ao meio de conservação, a temperatura e o tempo de transporte, a fim de apresentar uma melhor condição de conservação do tecido folicular ovariano e, conseqüentemente, dar continuidade ao

processo de desenvolvimento *in vitro* (CHAVES, 2007; MELO JÚNIOR, 2017; TAVARES, 2020; SANTOS; SILVA, 2022).

Naves (2020) em seus experimentos confirma a necessidade de maior atenção para o parâmetro temperatura, pois ela afeta diretamente a eficiência e a qualidade dos oócitos. Já Rosa et al (2011) relatam que a viabilidade dos folículos tem relação direta com o meio ao qual foi utilizado para conservação e temperatura, sendo essa mais satisfatória a 4°C.

Outros estudos reduziram a temperatura a 4°C e 20°C como forma de favorecer a conservação ou preservação do material biológico e manter a viabilidade folicular durante o transporte até sua manipulação. Desta forma, esta etapa tem a intenção de reduzir o metabolismo celular, diminuindo as necessidades metabólicas e favorecendo a resistência dos folículos, resultando na preservação *in vitro* (CHAVES, 2007; MISSIO *et al.*, 2014; CAVALCANTE *et al.*, 2017).

Queiroz Neta *et al.* (2018) relata que a temperatura mais satisfatória é a de 4°C, permitindo uma boa preservação de folículos pré-antrais por períodos de até 18h ou 24h em bovinos. Segundo Gomes e Seneda (2013) a conservação da viabilidade folicular do tecido ovariano em equinos depende significativamente do armazenamento e transporte ao que se refere a eficiência dos gametas, onde para tal é necessária a manutenção da temperatura em 4°C em *phosphate buffer solution* (PBS) por 4h.

Diversos meios de preservação têm sido utilizados como forma de preservar o tecido ovariano, tais como: solução salina a 35°C, solução salina suplementada com gentamicina a 37°C, solução salina a 38°C, PBS com penicilina e estreptomicina a 39°C, solução salina 0,9% suplementada com penicilina G sódica, sulfato estreptomicina e anfotericina B refrigerada a 4°C e solução à base de água de coco com o meio TCM 199 (Sais de Hanks) (CHAVES, 2007; SILVA *et al.*, 2011).

A literatura apresenta uma diversidade de protocolos de conservação devido à variabilidade da resposta celular das diferentes espécies de mamíferos. Desta forma, pesquisas continuam sendo desenvolvidas a fim de propor novos protocolos que garantam a conservação do tecido ovariano por curto período e com maior custo benefício (LIMA, 2015).

3.1.2 Antioxidantes e viabilidade celular de tecido ovariano

A manutenção da viabilidade celular está associada à composição do meio para garantir o fornecimento adequado de nutrientes, eletrólitos, hormônios, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, fatores de crescimento e antioxidantes. Desta forma, para o bloqueio do estresse oxidativo do folículo ovariano são utilizados antioxidantes como forma de preservação das membranas plasmáticas para a manutenção da viabilidade celular, garantindo a continuidade do metabolismo celular *in vitro* (CORREIA, 2019).

Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de encontrar alternativas que conservem, ao máximo, a viabilidade folicular e oocitária durante o transporte até o laboratório, pois o transporte e o armazenamento dos ovários são fatores que afetam diretamente na estabilidade do mesmo (SILVA *et al.*, 2011).

A adição de antioxidantes ao meio de conservação tem sido uma alternativa para otimizar os protocolos, já que eles previnem ou reduzem a extensão do dano oxidativo quando utilizados em baixas concentrações. A nível celular, os antioxidantes atuam por meio de sistema enzimático ou não enzimático (LUZ *et al.*, 2011). Os antioxidantes enzimáticos mais comumente utilizados são: glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009). Já os antioxidantes não enzimáticos são as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (SILVA, 2017).

As células do tecido ovariano precisam de antioxidantes para seu adequado funcionamento, sendo estes obtidos *in vivo*. Após a recuperação do ovário, com vista ao emprego em biotécnicas, faz-se necessário a adição de um antioxidante artificial como quercetina, cisteamina, carnitina, ácido ascórbico e resveratrol ao meio de conservação para reduzir o estresse oxidativo (LUZ *et al.*, 2011; SOVERNIGO, 2015 SILVA *et al.*, 2011; SILVA, 2020).

A literatura reportou a utilização do resveratrol associado a sacarose para conservação morfológica de folículos pré-antrais submetidas a vitrificação e reaquecimento (RODRIGUES, 2020). Silva *et al.* (2020) em seus estudos com folículos ovarianos pré-antrais observaram que a suplementação de antioxidantes do tipo ácido alfa lipóico ou ácido tióctico (ALA) e catalase (CAT) em soluções prévias ou posteriores a criopreservação promove o controle da oxidação celular.

Maciel (2018) avaliou o efeito do extrato etanólico de folhas de graviola (*Annona muricata*) na conservação ovariana de camundongos fêmeas, sendo observado a não toxicidade do extrato frente à reserva ovariana. Já o uso da *Aloe vera* reduziu o estresse oxidativo quando inserido na solução de vitrificação, melhorando a qualidade dos folículos ovarianos e promovendo a ativação do desenvolvimento folicular (COSTA, 2020).

3.2 Produtos naturais como estratégia de conservação de tecido ovariano

Os produtos naturais são utilizados para diferentes fins desde as civilizações mais remotas. Contudo, ainda na atualidade, diversas áreas das Ciências despertam interesse na investigação da aplicabilidade destes produtos, inclusive àquelas relacionadas às biotécnicas reprodutivas (CUNHA *et al.*, 2016). Estudos apontam a relevância de produtos naturais que apresentam em sua composição substâncias bioativas com propriedades antioxidantes, visto que previnem ou reduzem a extensão do dano oxidativo frente as células germinativas (OLIVEIRA *et al.*, 2009; GONTIJO, 2018).

Neste contexto, a avaliação do efeito na adição de antioxidantes oriundos de produtos naturais em meios de transporte para conservação do tecido ovariano, torna-se amplamente requerido como etapa preliminar da aplicabilidade das biotécnicas (CASTAÑEDA, 2018). O Quadro 2 apresenta o efeito da adição de extratos vegetais frente a conservação de tecido ovariano de diferentes espécies.

Os dados apresentados no Quadro 2 demonstram que extratos vegetais de amora preta e cerejeira com propriedades antioxidantes foram utilizados como meio de conservação para o transporte de tecido ovariano em caprinos e ovinos, destacando a temperatura de armazenamento de 4° C por um período de até 6h para os extratos. (CAVALCANTE *et al.*, 2017; GOUVEIA *et al.*, 2015).

A literatura também reportou o efeito da adição dos antioxidantes resveratrol e melatonina ao meio de manutenção sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mantidos a 36°C em diferentes tempos de simulação de transporte e constatou aumento na viabilidade (SILVEIRA, 2019).

Quadro 2 – Efeito da adição de diferentes extratos vegetais frente a conservação de tecido ovariano de diferentes espécies

Vegetal (nome popular)	Tipo de extrato	Espécie animal	Condição do meio de conservação (meio, temperatura e tempo)	Efeito sobre a conservação do tecido ovariano	Referência
<i>Morus nigra</i> (amora preta)	Extrato etanólico bruto das folhas diluído em solução salina 0,9%	Ovinos	As concentrações do extrato investigadas foram 0,025, 0,05 e 0,1 mg/mL a 4°C por 6, 12 e 24 h.	A concentração do extrato de 0,05 mg/mL de <i>M. nigra</i> preservou o tecido ovariano (folículos pré-antrais) por até 6h.	Cavalcante <i>et al.</i> (2017)
<i>Amburana cearensis</i> (cerejeira)	Extrato etanólico bruto das folhas frescas diluído em solução salina 0,9%	Caprinos	As concentrações do extrato investigadas foram 0,1, 0,2 e 0,4 mg/mL a 4°C por 6, 12 e 24 h.	A concentração do extrato de 0,2 mg/mL de <i>A. cearensis</i> preservou o tecido ovariano (folículos pré-antrais) por até 6h a 4°C.	Gouveia <i>et al.</i> (2015).

Fonte: elaborado pela autora.

3.2.1 Própolis vermelha

A própolis, mistura resinosa recolhida pelas abelhas de botões e exsudatos de várias plantas, é um produto natural com uma diversidade de compostos químicos bioativos que, por sua vez, sofre influência da variedade da abelha, da ecoflora de cada região e do período de coleta (BARRETO *et al.*, 2020; TORETI *et al.*, 2013).

A própolis apresenta uma variedade de atividade biológica (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antitumoral, antiprotozoária, antiviral, cicatrizante, anestésica, antinociceptiva, anticariogênica, anti-inflamatória, imunomoduladoras - anti-herpes e anti-HIV) (PICCININI *et al.*, 2022), em decorrência dos diversos compostos, principalmente, ácidos fenólicos e seus ésteres, flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonóis, chalconas), terpenos, β -esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (RIBEIRO, 2011; SILVA, 2015, PEREIRA *et al.*, 2022).

Até o momento foram catalogados 13 tipos de própolis brasileira, sendo a própolis vermelha produzida a partir da planta *Dalbergia ecastophyllum L.*, conhecida

popularmente como rabo-de-bugio, típica de regiões de mangues de Alagoas (LUSTOSA *et al.*, 2008; SILVA, 2019). A própolis vermelha de Alagoas tem se destacado por apresentar em sua composição química isoflavonas (dihidroisoflazona, homopterocarpina, medicarpina e 4', 7-dimetoxi-2'-isoflavona) não identificadas nos demais tipos, o que justifica seu elevado potencial antioxidante (ARRUDA, 2019).

Outro diferencial da própolis vermelha alagoana é a presença de componentes específicos como o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) e o ácido caféico, responsáveis pela prevenção de reações inflamatórias (SILVA *et al.*, 2016). Desta forma, o alto teor de compostos fenólicos e a presença de componentes específicos como aqueles supracitados, justificam este tipo de própolis apresentar maior potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano quando comparado aos demais (MELO, 2014).

A própolis vermelha de Alagoas tem sido utilizada para fins como suplemento alimentar, produtos para proteção da saúde e prevenção de doenças, biofármacos e como constituinte de (bio)cosméticos, produtos agroindustriais e outros (SFORCIN; BANKOVA, 2011; GROOT, 2013), sendo considerado um produto natural promissor para investigação técnico-científica em diferentes áreas de atuação e viável para inovação biotecnológica (ARAÚJO; RODRIGUES; MEDEIROS, 2021).

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o uso do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha como alternativa para conservação de folículos ovarianos de vacas.

4.2 Específicos

- a) Avaliar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha obtido (solução mãe);
- b) Investigar a influência da concentração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre a morfologia folicular e oocitária de vacas após resfriamento;
- c) Verificar a influência do tempo de refrigeração sobre a morfologia folicular e oocitária de vacas.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Tratou-se de uma pesquisa experimental do tipo quali-quantitativa.

5.2 Local da pesquisa

O preparo do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha foi realizado no Laboratório de Líquidos da Farmácia Escola do Centro Universitário Cesmac e a avaliação da capacidade antioxidante foi realizada no Laboratório Multidisciplinar do Campus I da mesma instituição. A coleta dos ovários foi realizada no Matadouro Frigorífico de Alagoas S/A (MAFRIAL) localizado na Rodovia BR-101 SUL, km 98, Tabuleiro Martins, Maceió-AL e o processamento histológico realizado do Laboratório de Histopatologia do Campus I do Centro Universitário Cesmac.

5.3 Procedimentos

5.3.1 Aquisição da própolis vermelha

A amostra de própolis vermelha bruta, já limpa, foi adquirida por compra direta de produtor de apiário localizado na cidade de Marechal Deodoro, zona litorânea do Estado de Alagoas, Brasil. Após aquisição, a própolis bruta foi armazenada a -10°C (CASACA, 2010).

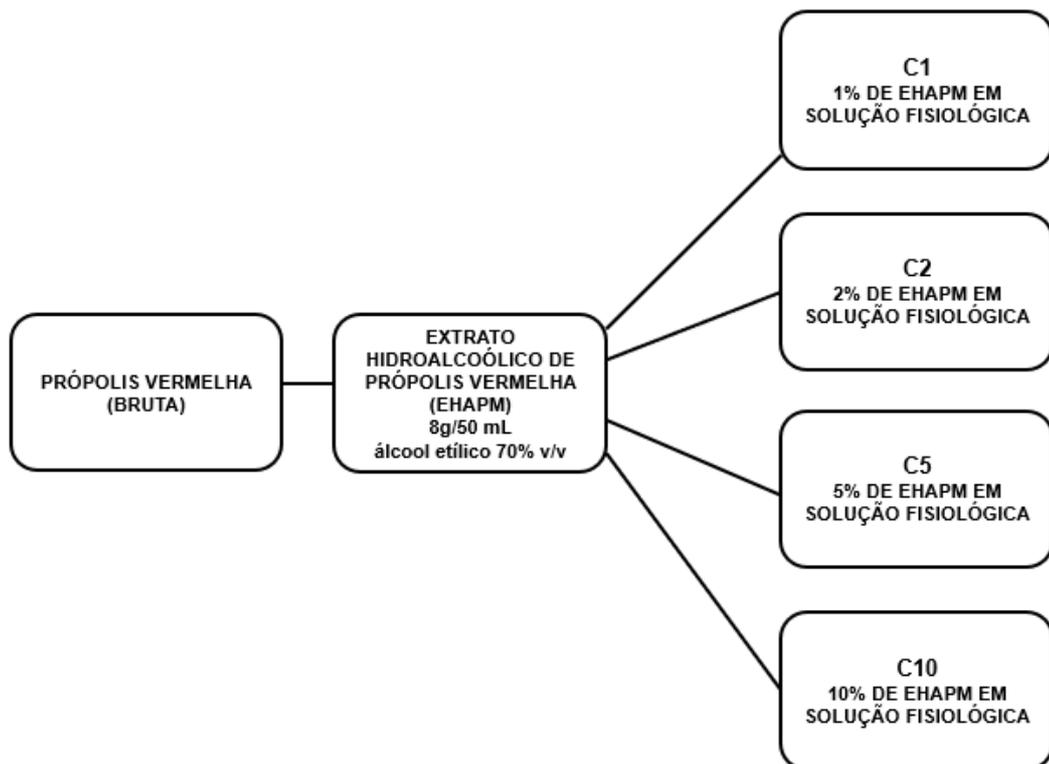
5.3.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha

A obtenção do extrato de própolis vermelha foi realizada pela técnica de maceração empregando o álcool etílico 70% v/v como solvente extrator, visto que tem sido amplamente utilizado para extrair a maioria dos compostos bioativos da própolis com o menor percentual de ceras (MERGULHÃO *et al.*, 2019). Para tal, 8g da própolis bruta limpa foi colocada em um frasco âmbar e, em seguida, foram adicionados 25mL de álcool de etílico 70% (v/v). Posteriormente, foi realizada a agitação manual do frasco durante três minutos, seguido do repouso a 25°C . Esse processo de agitação

foi repetido a cada 6 horas durante 24h.

Em seguida, o sobrenadante foi removido por filtração em papel de filtro (100 mm) acondicionando-o em frasco âmbar. Ao filtrado foram adicionados 25mL do álcool etílico 70% (v/v) e o processo foi repetido, resultando no total de 48 horas de maceração. O extrato obtido foi acondicionado em frasco âmbar à temperatura ambiente, a fim de impedir a foto-oxidação. Para a utilização no procedimento experimental como meio de conservação de tecido ovariano foram realizadas diluições seriadas até se obter às concentrações desejadas de 1 (C1), 2 (C2), 5 (C5) e 10% v/v (C10) a partir da solução mãe, conforme figura 2 a seguir:

Figura 2 – Representação esquemática da obtenção das soluções trabalho de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha



Fonte: elaborada pela autora.

5.3.3 Avaliação da capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha

Para avaliar a capacidade antioxidante da solução trabalho do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha realizou-se a determinação do conteúdo total de

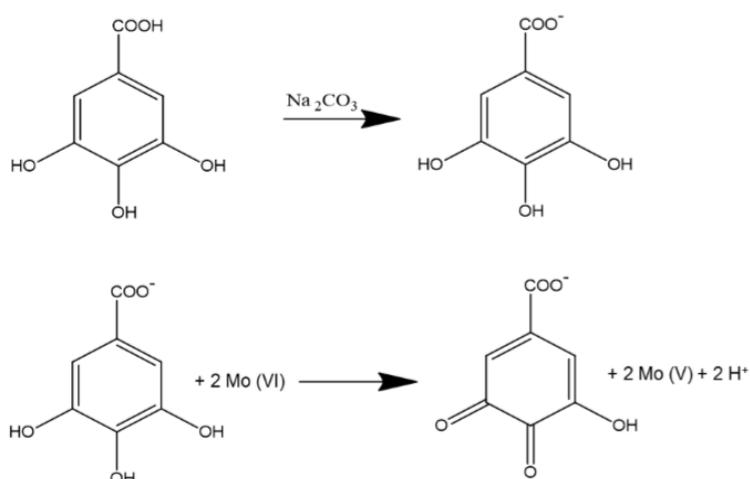
fenóis e a capacidade sequestradora de radicais frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

5.3.3.1 Determinação do conteúdo total de fenóis

O conteúdo total de fenóis foi obtido através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Cicco e colaboradores (2009) com algumas modificações. Foi construída uma curva de calibração utilizando o ácido gálico (6 a 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$) como padrão (representando os compostos fenólicos) e os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico/grama de extrato seco (mg de EAG/g de extrato seco).

Para o método, adicionou-se aos tubos, 120 μL da solução trabalho (21,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 180 μL de água, 300 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% (m/v), totalizando um volume de 3 mL. Para a análise do branco, substituiu-se a alíquota do extrato por etanol. Os tubos foram colocados em banho-maria a 40° C no escuro por 20 minutos. Em seguida, a mistura reacional (Figura 3) foi colocada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e medida a absorvância a 760 nm, utilizando espectrofotômetro UV-Vis (Agilent 8453).

Figura 3 – Reação do galato de sódio com o molibdato(VI), componente do reagente de Folin-Ciocalteu



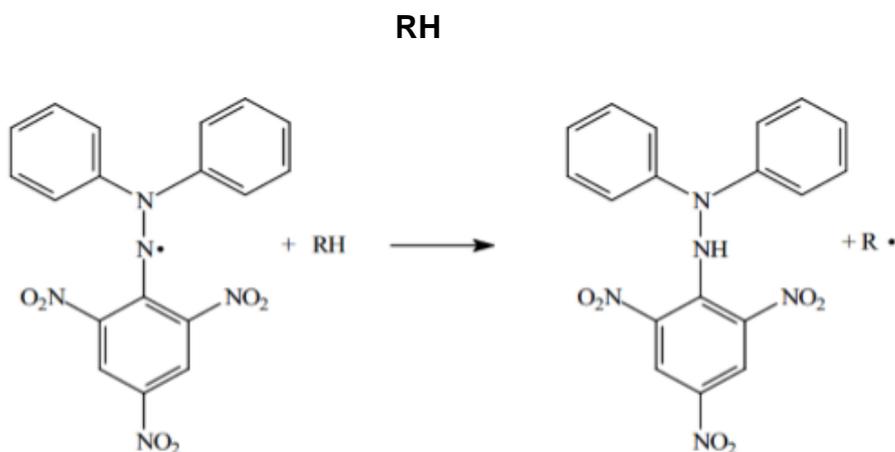
Fonte: Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999).

5.3.3.2 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•

Este método consiste em avaliar a capacidade antioxidante sequestradora de radicais, ou seja, a capacidade em doar hidrogênio para o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). A avaliação da capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha foi realizada monitorando-se a redução do radical DPPH• de coloração púrpura a DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) de coloração amarela (Figura 4), por meio da medida do decréscimo da absorvância a 516 nm por espectrofotometria.

O método consistiu em preparar uma solução de DPPH• ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) em metanol que foi protegida da luz e mantida em banho de gelo durante todo procedimento. Desta, 2,7 mL foram misturados a 180 μL de etanol e 120 μL da solução trabalho do extrato resultando na concentração em cela de 21,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 4 – Reação de redução do radical DPPH• por um antioxidante genérico



Fonte: Adaptado de Ferreira (2013).

As análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como atividade sequestradora do radical DPPH (ASR%) em função do tempo (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 minutos) e em CI_{50} , ou seja, a quantidade de extrato necessária para reduzir 50 % do radical livre DPPH, conforme descrito por Saánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1999).

A atividade sequestradora do radical (ASR%) foi calculada usando a seguinte equação para um tempo de 30 min.:

$$\%ASR = [(Abs_{\text{padrão}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{padrão}}] \times 100$$

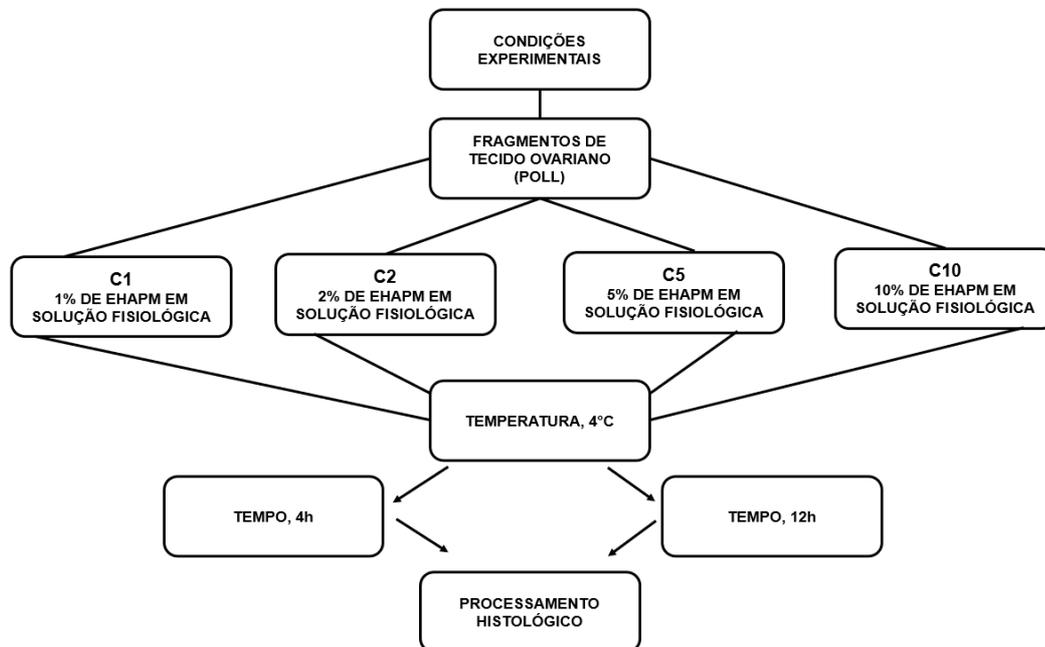
Onde, $Abs_{\text{padrão}}$ é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH• e Abs_{amostra} é a absorvância da mistura reacional (DPPH• + amostra). A medida da absorvância do padrão correspondeu à concentração de DPPH• da solução (36 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

5.3.4 Coleta dos ovários e protocolo experimental

Foram utilizados ovários (n=5 pares) de vacas adultas, sem raça definida, oriundos de abatedouro local, não sendo, portanto, necessário parecer de comitê de ética animal. Uma vez coletados, os ovários foram removidos do tecido adjacente e lavados uma vez em álcool 70% durante 10 segundos e duas vezes em solução fisiológica durante o mesmo tempo.

Em seguida, foram obtidos fragmentos de aproximadamente (3mm x 3mm x 1mm) do córtex de cada ovário, sendo os fragmentos colocados em tubo cônico (50 mL) contendo solução fisiológica para obtenção do *pool*. Posteriormente, a cada solução trabalho (30 mL em tubo cônico), foram adicionados seis fragmentos, e armazenados a 4°C. Após 4 e 12 horas, as caixas foram abertas e os fragmentos de tecido ovariano foram transferidos, individualmente, para um microtubo (1,5 mL) contendo *Carnoy* como fixador para posterior processamento histológico, conforme esquematizado na figura 5. É importante destacar que dois fragmentos de ovário foram fixados imediatamente em *Carnoy* anterior ao processamento, sendo estes considerados o grupo controle fresco.

Figura 5 – Representação esquemática do procedimento experimental proposto para as soluções trabalho contendo 1, 2, 5 e 10% de EHPV como meio de conservação



Fonte: elaborado pela autora.

5.3.4.1 Processamento histológico

Os fragmentos de tecido ovariano do controle a fresco e daqueles refrigerados em meio de conservação contendo EHPV (1, 2, 5 e 10%) foram destinados à histologia clássica. Após a fixação foram desidratados, diafanizados e inclusos em parafina. Seções seriadas de 5µm de espessura foram obtidas, montadas em lâminas e coradas com hematoxilina-eosina através da técnica adaptada de Luz *et al.* (2016). Todas as secções foram examinadas utilizando um microscópio óptico no aumento de 400x, e um número mínimo de 120 folículos foram avaliados em cada tratamento.

No tocante ao aspecto morfológico, a classificação dos folículos foi baseada na integridade do oócito, das células da granulosa e da membrana basal, sendo os folículos classificados como morfológicamente normais (folículos contendo oócito e células da granulosa intactas), ou degenerados (folículos apresentando retração citoplasmática e/ou núcleo do oócito picnótico, bem como desorganização das células da granulosa e destacamento da membrana basal). Quanto ao

desenvolvimento foram classificados em primordiais, desenvolvimento (transição, primários, secundários) ou em antrais (terciários e pré-ovulatórios), de acordo com a morfologia do oócito e das células da granulosa. Apenas os folículos que apresentaram o núcleo do oócito visível foram analisados, a fim de evitar a contagem do mesmo folículo em secções diferentes.

5.3.5 Análise estatística

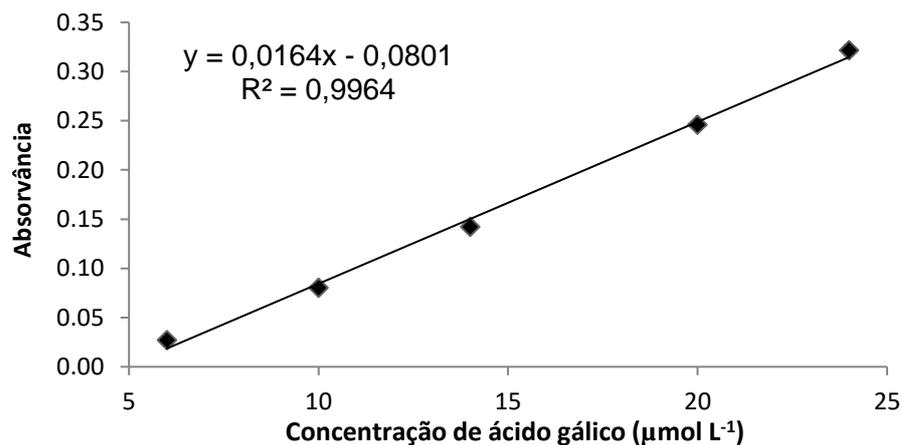
As análises dos dados obtidos foram realizadas utilizando os diferentes conjuntos de variáveis: morfologia normal ou degenerado dos folículos (primordial, transição, primário e secundário), em função dos tratamentos realizados (T4C1; T12C1; T4C2; T12C2; T4C5; T12C5; T4C10; T12C10 e CONTROLE A FRESCO).

Foram realizadas análises multivariadas como a distância euclidiana média como uma medida de dissimilaridade (D^2) e aplicado o método de otimização de Tocher. Com essas análises objetiva-se agrupar tratamentos com características semelhantes. Assim, dentro de cada grupo os tratamentos são similares e entre grupos existe diferença entre eles. Na execução dos procedimentos estatísticos foi utilizado o programa GENES (CRUZ, 2013; CRUZ, 2016).

6 RESULTADOS

O método Folin-Ciocalteu é muito utilizado para quantificação de compostos fenólicos em extratos de própolis, pois é simples e reprodutível (ZIA-UL-HAQ *et al.*, 2011). O conteúdo total de fenóis (CTF) obtido para o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (solução mãe) foi de $462,25 \pm 14,99$ mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato seco. O valor foi obtido a partir da equação da reta determinada pela curva de calibração (Gráfico 1) realizada para o padrão ácido gálico, a partir da equação da reta: $y = 0,0164x - 0,0801$.

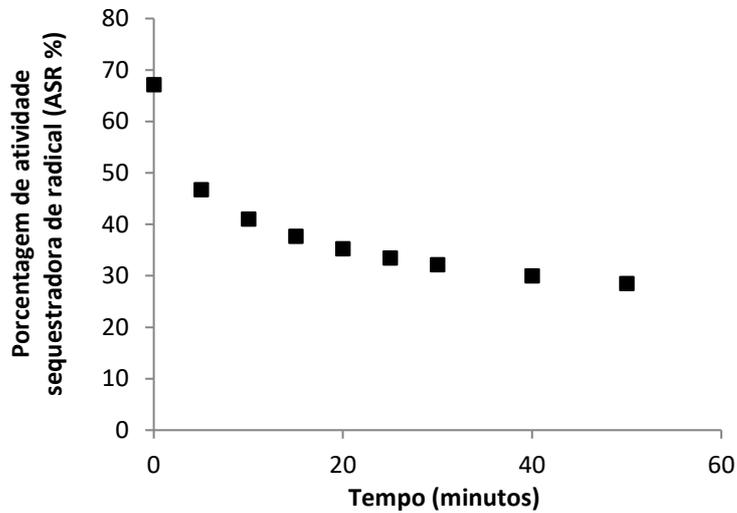
Gráfico 1 - Curva de calibração utilizando ácido gálico como representante de compostos fenólicos ($6 - 24 \mu\text{mol L}^{-1}$)



Fonte: elaborado pela autora.

O perfil antioxidante frente ao radical DPPH• foi determinado a partir da porcentagem de atividade sequestradora de radical (% ASR), em função do estudo cinético (Gráfico 2).

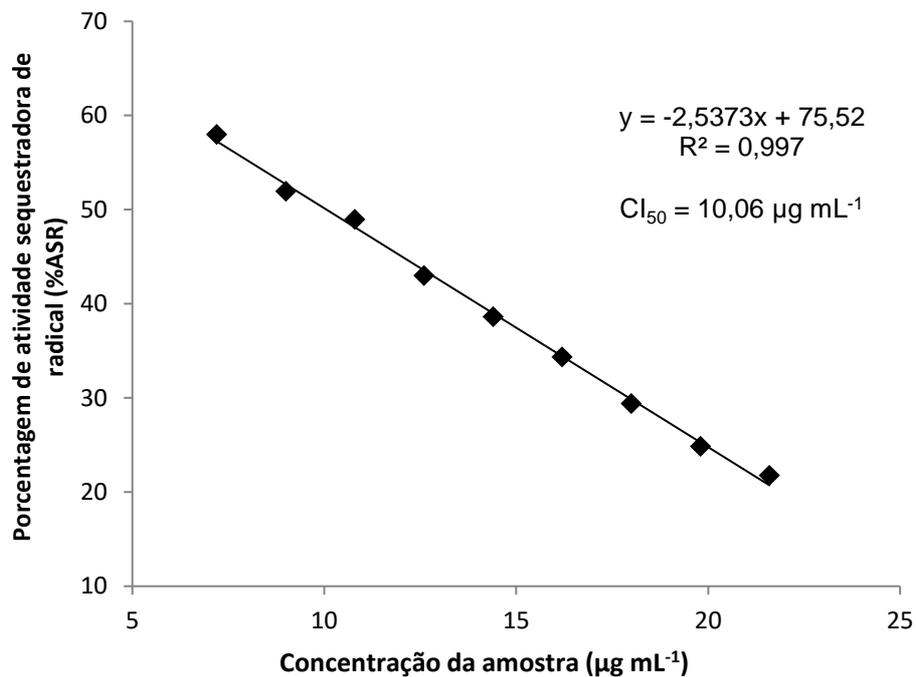
Gráfico 2 – Porcentagem de atividade sequestradora de radical frente ao DPPH• para solução mãe do EHPV obtido (21,6 µg mL⁻¹) em função do tempo



Fonte: elaborado pela autora.

Portanto, admitindo-se o tempo reacional de 30 minutos, o extrato obtido apresentou 32,12 % de inibição frente ao radical DPPH•. Também foi determinada a capacidade antioxidante a partir da quantidade necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH• em 50%, parâmetro conhecido por IC₅₀. Este foi obtido a partir da equação da reta definida pela curva de calibração a seguir, resultando na IC₅₀ de 10,06 µg mL⁻¹ (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Curva de calibração para solução mãe do EHPV obtido (7,2 – 21,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) após o tempo reacional de 30 minutos



Fonte: elaborado pela autora.

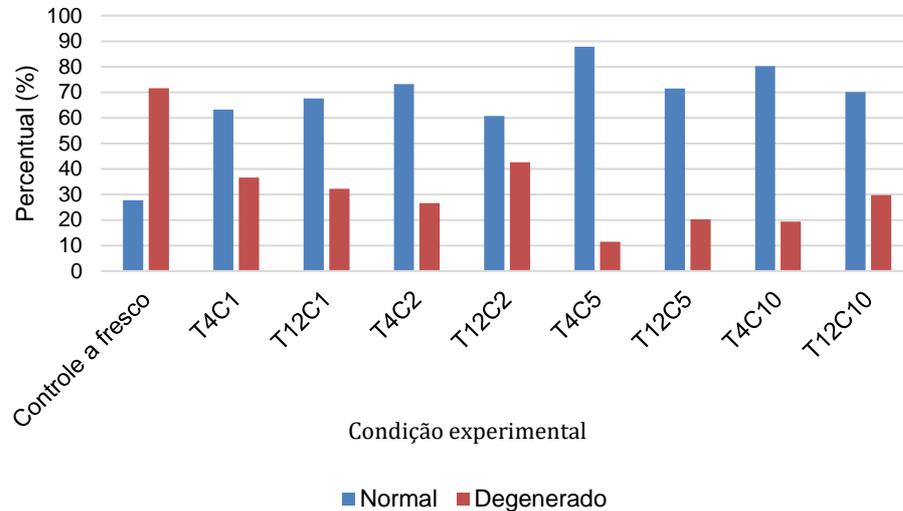
O percentual de folículos morfologicamente normais e degenerados por categoria folicular estão apresentados na Tabela 1 e no Gráfico 4 exibe o percentual total de folículos morfologicamente normais e degenerados obtidos nas condições experimentais investigadas.

Tabela 1 – Porcentagem de folículos morfologicamente normais e degenerados por categoria folicular

Condição experimental	N	Classificação	% Primordial	% Transição	% Primário	% Secundário
Controle a fresco	95	Normal	15,7	10,0	2,1	0
		Degenerado	29,5	28,4	10,5	3,15
T4C1	90	Normal	22,2	33,33	6,66	1,1
		Degenerado	20	14,4	2,2	0
T12C1	94	Normal	26,5	30,42	8,51	2,12
		Degenerado	6,38	22,7	3,19	0,0
T4C2	120	Normal	29,16	30,8	12,5	0,8
		Degenerado	11,6	10,0	4,16	0,8
T12C2	124	Normal	26,6	20,3	12,3	1,6
		Degenerado	12,09	24,83	4,03	0,8
T4C5	52	Normal	38,4	36,5	9,61	3,84
		Degenerado	1,92	7,69	1,92	0
T12C5	81	Normal	26,5	25,3	18,5	1,23
		Degenerado	2,46	14,11	3,70	0
T4C10	77	Normal	25,9	36,3	12,9	5,19
		Degenerado	6,49	10,3	1,29	1,29
T12C10	101	Normal	27,72	25,64	14,8	1,9
		Degenerado	6,9	18,91	2,97	0,9

Fonte: elaborado pela autora.

Gráfico 4 – Percentual de folículos morfologicamente normais e degenerados após conservação em diferentes condições experimentais



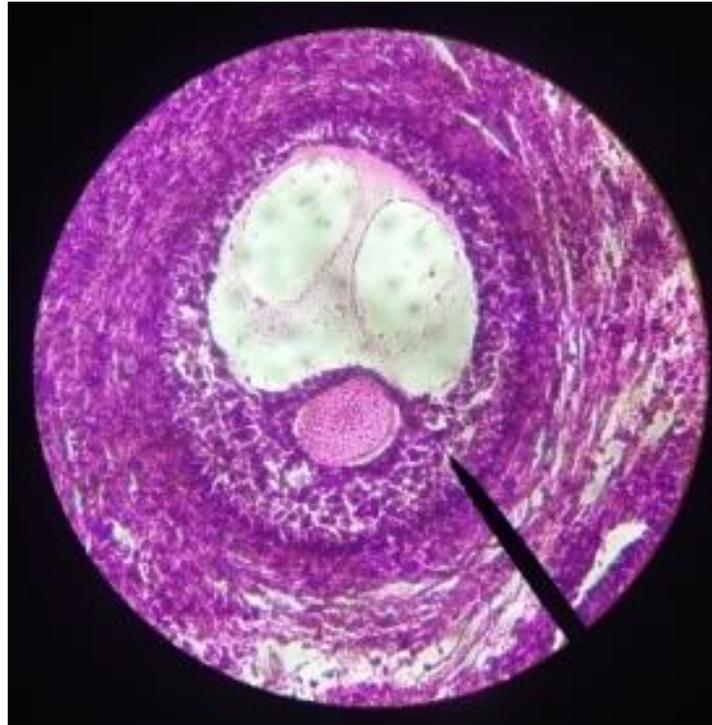
Fonte: elaborado pela autora.

Constatou-se que 27,8% dos folículos do controle a fresco se mantiveram intactos (normais), enquanto 72,2% foram classificados como degenerados por apresentarem retração citoplasmática e/ou núcleo do oócito picnótico, bem como desorganização das células da granulosa e destacamento da membrana basal.

Quanto às condições experimentais investigadas, verificou-se que os folículos normais identificados se apresentaram esféricos, com as células da granulosa bem organizadas circundando o oócito e núcleo sem picnose (Figura 6), variando de 60,8% a 87,9%, respectivamente nas condições experimentais T12C2 e T4C5. Já os folículos classificados como degenerados (Figura 7) variam de 11,53% a 42,56% equivalentes às condições experimentais T12C2 e T4C5., respectivamente.

Figura 6 – Microscopia de tecido ovariano de vacas com identificação de folículo antral (a) e primário (b) com morfologia normal em meio de conservação

(a)



(b)

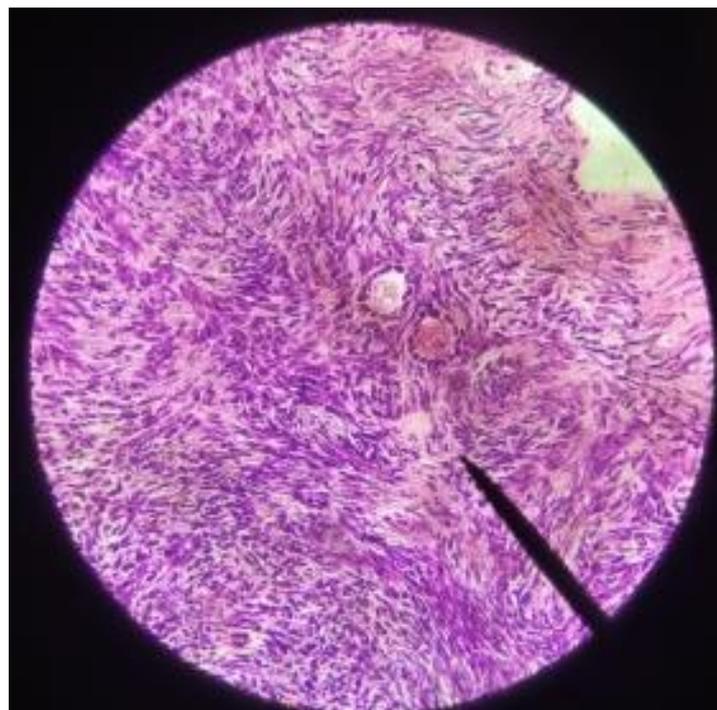
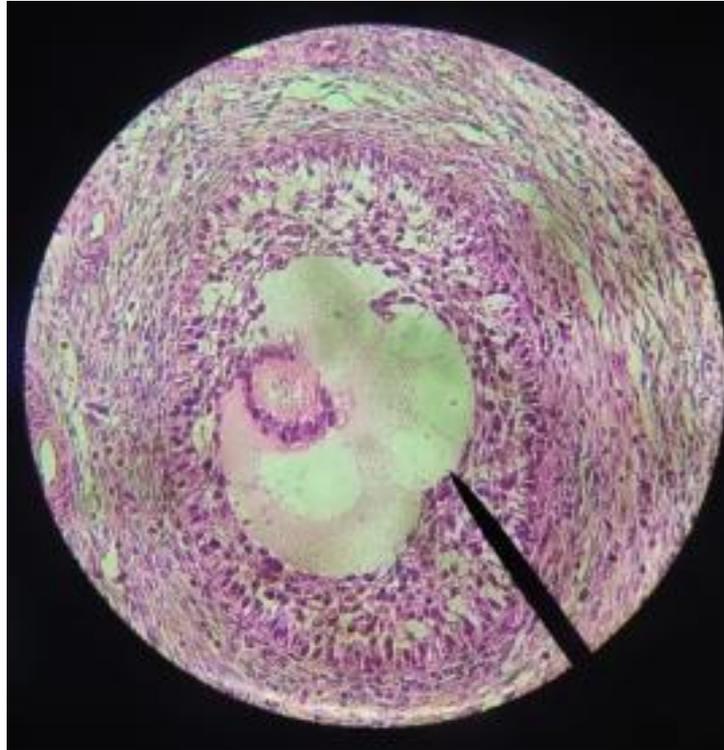
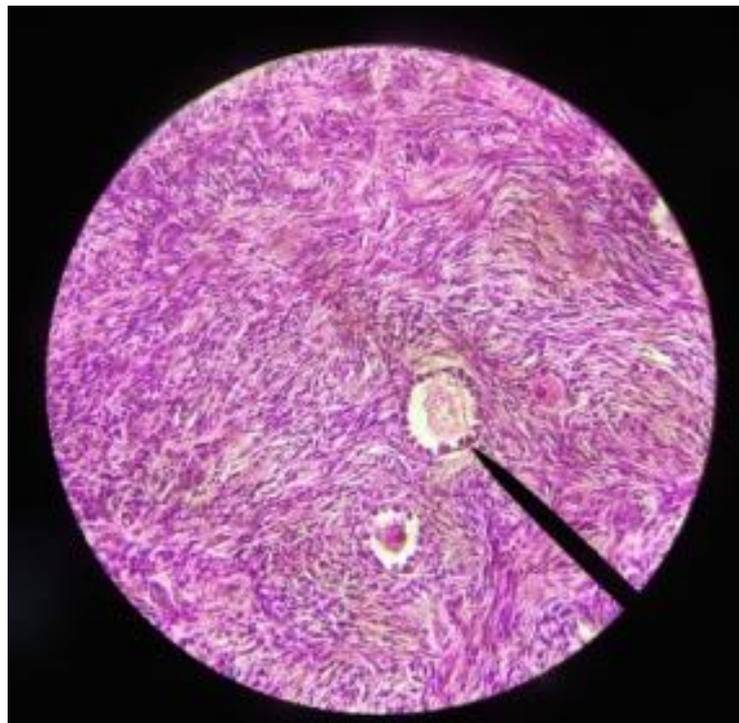


Figura 7 – Microscopia de tecido ovariano de vacas com identificação de folículo antral (a) e primário (b) degenerados em meio de conservação proposto

(a)



(b)



O número de folículos ovarianos identificados no estudo variou de 52 a 124, respectivamente nas condições experimentais de T4C5 e T12C2. Na temperatura de 4°C com tempo de exposição de 4h a maior eficácia na conservação dos folículos (87,95%) foi na condição experimental que possuía como meio de conservação o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha à 5% (T4C5).

Já com tempo de exposição de 12h a maior eficácia na conservação dos folículos (71,53%) foi na condição experimental que possuía como meio de conservação o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha à 5% (T12C5), implicando que a concentração de 5% mais recomendada como meio de conservação.

Após a realização da análise estatística pelo método de Tocher (Tabela 2 a 11) observou-se que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha no meio de conservação de tecido ovariano preservou a morfologia folicular a depender da categoria folicular avaliada.

Tabela 2 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primordiais normais

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C1; T4C2; T12C2; T12C5; T4C10; T12C10; CONTROLE A FRESCO
2	T4C5

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 3 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primordiais degenerados

Grupo	Condição experimental
1	T12C1; T4C2; T12C2; T4C5; T12C5; T4C10; T12C10
2	T4C1; CONTROLE A FRESCO

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 4 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos de transição normais

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C1; T4C2; T4C5; T4C10
2	T12C2; T12C5; T12C10
3	CONTROLE A FRESCO

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos de transição degenerados

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C5
2	T4C2; T4C10; T4C5
3	CONTROLE A FRESCO
4	T12C1; T12C2
5	T12C10

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 6 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primários normais

Grupo	Condição experimental
1	T4C2; T12C2; T4C10; T12C10; T4C5; T12C1
2	T4C1
3	T12C5
4	CONTROLE A FRESCO

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 7 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos primários degenerados

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C1; T4C2; T12C2; T4C5; T12C5; T4C10; T12C10
2	CONTROLE A FRESCO

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 8 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos secundários normais

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C1; T4C2; T12C2; T12C5; T12C10; CONTROLE A FRESCO
2	T4C5; T4C10

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 9 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação a variável folículos secundários degenerados

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C1; T4C2; T12C2; T4C5; T12C5; T4C10; T12C10
2	CONTROLE A FRESCO

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 10 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação às variáveis relacionadas à morfologia normal dos folículos primordial, transição, primário e secundário em conjunto

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C1; T4C2; T12C2; T12C5; T12C10
2	CONTROLE A FRESCO
3	T4C5; T4C10

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 11 – Agrupamento das diferentes condições experimentais em relação às variáveis relacionadas à morfologia degenerada dos folículos primordial, transição, primário e secundário em conjunto

Grupo	Condição experimental
1	T4C1; T12C1; T4C2; T12C2; T4C5; T12C5; T4C10; T12C10
2	CONTROLE A FRESCO

Fonte: elaborado pela autora.

A análise multivariada aplicada permitiu diferenciar as condições experimentais, sendo possível destacar se os tratamentos foram ou não diferentes do controle a fresco. As tabelas 2, 4, 6, 8 e 10 apresentam os agrupamentos das condições experimentais investigadas quanto a categoria dos folículos pré-antrais normais (folículos contendo oócito e células da granulosa intactas).

De acordo com a tabela 2 foi possível verificar que todas as condições experimentais apresentaram similaridade com o controle a fresco, com exceção da que utilizou o tempo de conservação de 4h e a concentração de EHPV em 5% (T4C5). Desta forma, constatou-se que o meio de conservação proposto permitiu a manutenção da integridade em folículos primordiais na maioria das condições investigadas.

No tocante aos folículos de transição, todas as condições testadas diferiram estatisticamente do controle a fresco frente, sendo T12C2, T12C5, T12C10, aquelas condições que mais se aproximaram do controle, ou seja, tempo de refrigeração de 12h e concentração de EHPV em 2%, 5% e 10%, respectivamente (tabela 4).

Na categoria dos folículos primários todas as condições testadas também

diferiram ao controle a fresco, sendo a T12C5 a condição que mais se aproximou do controle, ou seja, tempo de refrigeração de 12h e concentração de EHPV em 5% (tabela 6).

Na tabela 8 as condições experimentais T4C1, T12C1, T4C2, T12C2, T12C5 e T12C10 apresentaram similaridade com o controle a fresco de forma que se observou a integridade dos folículos pré-antrais secundários, com exceção de T4C5 e T4C10 que utilizaram o tempo de conservação de 4h e a concentração de EHPV em 5% e 10%, respectivamente.

A tabela 10 nos mostra que nenhuma das condições experimentais apresentaram similaridade com o controle a fresco, no entanto, as condições experimentais T4C1; T4C2; T12C1; T12C2; T12C5; T12C1 e T4C5; T4C10 foram as que mais se aproximaram ao controle a fresco.

Já as tabelas 3, 5, 7, 9 e 11 apresentam o perfil de degeneração das categorias foliculares nas diferentes condições experimentais investigadas. A tabela 3 evidenciou que o EHPV a 1% utilizado em folículos primordiais apresentou similaridade ao controle fresco quanto ao perfil de degeneração, diferentemente das demais condições. A tabela 5 demonstrou que nenhuma das condições experimentais apresentou similaridade com o controle a fresco quanto aos folículos de transição degenerados. Porém, o grupo 2 e 4 foram aqueles que mais se aproximaram do controle.

As tabelas 7 e 9 apresentam o perfil de degeneração de folículos primários e secundários, respectivamente, o qual não apresenta similaridade com o controle a fresco. A tabela 11 também demonstrou que o perfil de degeneração de todas as categorias foliculares em conjunto não apresentou similaridade ao controle a fresco em todas as condições experimentais.

7 DISCUSSÃO

Foi possível verificar que o extrato de própolis vermelha em estudo apresentou valor de CTF maior do que o reportado na literatura. Cabral *et al.* (2009) e Frozza *et al.* (2013) reportaram valores de 257,98 e 151,50 mg de EAG/g de extrato seco, respectivamente para a própolis vermelha do Estado de Alagoas no mesmo solvente.

Oldoni (2007) encontrou para o extrato etanólico de própolis produzido por tintura 50,5% de inibição frente ao radical DPPH•, enquanto que Dausch *et al.* (2007) encontrou valores de inibição entre 19,2 e 39,1%. Desta forma, verificou-se que o extrato obtido apresentou valores próximos ao reportado na literatura, demonstrando efetiva capacidade antioxidante.

De acordo com os dados apresentados na seção anterior, verificou-se que temperatura de resfriamento de 4°C utilizada no protocolo experimental corrobora com os resultados apresentados por Wongsrikeao *et al.* (2005), visto que proporciona redução no metabolismo celular, minimiza as necessidades metabólicas e aumenta a resistência de folículos à redução de nutrientes e oxigênio durante a preservação *in vitro* (MOTTA *et al.*, 2017). A literatura reporta que a temperatura de 4°C pode ser utilizada com sucesso na conservação de folículos pré-antrais por até 24 horas em diversas espécies animais (CELESTINO *et al.*, 2007; MISSIO *et al.*, 2014).

Estudos reportaram a conservação de ovários de vacas zebuínas a 4°C por até 18h sem danos morfológicos dos folículos pré-antrais, apontando que o resfriamento atua como método de conservação em curto prazo, visto que a diminuição da temperatura tecidual retarda os processos de degeneração celular (BRITO, 2008; LUCCI *et al.*, 2004).

Além da temperatura, os radicais livres demonstram influência na conservação de folículos pré-antrais no tecido ovariano, sendo antioxidantes substâncias necessárias para manutenção da viabilidade celular (CHAVES, 2007). Antioxidantes como α -tocoferol, trolox e catalase são descritos nos estudos reportados por Luz *et al.* (2011), e proporcionam redução nos danos celulares irreversíveis em células germinativas, o que corrobora com sua conservação.

Celestino *et al.* (2007) ao avaliarem a morfologia dos folículos pré-antrais de bovinos em solução salina e TCM 199, meio de conservação simples e complexo, respectivamente, afirmaram que a eficiência deste meio depende da temperatura e do

tempo de incubação, corroborando com os dados obtidos no presente estudo.

O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha utilizado no estudo como meio de conservação, preservou a morfologia folicular do tecido ovariano, a depender da categoria avaliada, necessitando de estudos mais detalhados para identificação da concentração mais viável do extrato.

A literatura descreve que o uso de produtos naturais com elevada capacidade antioxidante, como o extrato de própolis vermelha, é útil para manutenção da viabilidade celular, prevenindo a peroxidação lipídica da membrana celular (SILVA *et al.*, 2011). Lucci *et al.* (2004) avaliaram uma solução à base de água de coco como meio de conservação de ovários bovinos, sendo a percentagem de folículos normais similar à de folículos-controle quando mantidos à 4°C por até 18h.

Apesar da literatura reportar o efeito pró-estrogênico das isoflavonas, comumente presentes no extrato de própolis vermelha de Alagoas (NANI *et al.*, 2018; CCANA-CCAPATINTA *et al.*, 2020), até o momento não existe relato sobre a influência deste efeito sobre a conservação do tecido ovariano em mamíferos.

Desta forma, a utilização de produtos naturais como meio de conservação tem se apresentado como estratégia cada vez mais promissora no desenvolvimento de protocolos alternativos de conservação de tecido ovariano bovino, bem como em outras espécies animais, visto que se tornam mais viáveis pela praticidade e valor comercial (SOARES *et al.*, 2019).

8 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas produzido apresentou capacidade antioxidante capaz de preservar a morfologia folicular do tecido ovariano a depender da categoria avaliada nas condições experimentais investigadas. Entretanto, necessita-se de estudos mais detalhados para identificação da concentração mais viável do extrato frente a cada categoria folicular.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. S.; RODRIGUES, M.S.A.; MEDEIROS, W. P. **Própolis: usos biotecnológicos**. Boa Vista: Gepra Editora e Eventos Científicos, 2021.
- ARRUDA, D. E. G. *et al.* Efeitos antioxidantes da própolis. **Rev. Bra. Edu. Saúde**, Patos, v. 8, n. 4, p. 09-15, dez. 2019.
- ÁVILA, A. C. F. C. M. **Efeitos da comunicação entre células do sistema reprodutivo feminino e oócitos bovinos mediada por vesículas extracelulares de diferentes estágios do ciclo estral**. 2019. 194 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.
- BARRETO, A. L. H. *et al.* **Controle de qualidade da própolis**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2020.
- BRITO, R. C. B. **Efeito da conservação de ovários a baixas temperaturas na morfologia de oócitos imaturos incluídos em folículos ovarianos primordiais suínos**. 2008. 40 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- CABRAL, I. S. R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1523-1527, jun. 2009.
- CCANA-CCAPATINTA, G. V. *et al.* *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: the Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 2060-2069, set. 2020.
- CARRILHO, D. **Comparação entre o congelamento lento e a vitrificação na criopreservação de tecido ovariano de suínos**. 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- CASACA, J. D. **Manual de produção de pólen e própolis**. Lisboa: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2010.
- CASTAÑEDA, O. J. R. **Água de coco em pó (ACP 406®) como meio de cultivo base para o cultivo in vitro de folículos pré-antrais caprinos incluídos no tecido ovariano**. 2018. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- CASTRO, S. V. *et al.* Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 957-965, fev. 2011.
- CAVALCANTE, A. Y. P. *et al.* Effect of ovarian tissue storage in *Morus nigra* extract on the morphology and DNA fragmentation of ovine preantral follicles. **Semina:**

Ciências Agrárias, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 1973-1986, abr. 2017.

CELESTINO, J. J. H. *et al.* Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 591-599, mar. 2007.

CHAVES, R. N. **Efeito da temperatura e do tempo de transporte de tecido ovariano sobre a viabilidade de folículos pré-antrais**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

CICCO, N. *et al.* A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant metanol extracts. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 107-110, jan. 2009.

COMBELLES, C. M. H.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?. **Reproductive biomedicine online**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 864-880, jun. 2009.

CORREIA, H. H. V. **Cultivo *in vitro* de oócitos mamíferos**: efeito da temperatura de transporte de ovário, do sistema de cultivo folicular e de inibidores da retomada da meiose. 2019. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

COSTA, F. C. **Efeito da *Aloe vera* no cultivo *in vitro* e na criopreservação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovinos**. 2020. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2020.

CRUZ, C. D. GENES: software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 271-276, jan. 2013.

CRUZ, C. D. Programa Genes-Ampliado e integrado aos aplicativos R, Matlab e Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 547-552, abr. 2016.

CUNHA, A. L. *et al.* Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas jornal**, Santana do Ipanema, v. 1, n. 2, p. 175-181, fev. 2016.

DAUGSCH, A. *et al.* **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

DUNDER, R.J. *et al.* Applications of the hexanic fraction of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Asparagaceae): control of inflammation and pain screening. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 263-271, mar. 2013.

FERREIRA, F. R. **Emprego de técnicas avançadas em estudos bioeletroquímicos de substâncias de interesse biológico**. 2013. 151 f. Tese

(Doutorado em Química e Biotecnologia) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 1, p. 143-152, jan. 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca LTDA, 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 248-253, jan./mar, 2017.

FIORI, L. C. **Vitrificação de tecido ovariano de cervos brasileiros**: avaliações histológicas e das taxas de apoptose tecidual. 2022. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2022.

FROZZA, C. A. S. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and chemical toxicology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 137-142, fev. 2013.

GOMES, R. G.; SENEDA, M. M. Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 4, p. 318-322, abr. 2013.

GONTIJO, D. A. **Resposta do córtex ovariano bovino submetido ao cultivo *in vitro* e xenotransplante após vitrificação associada ao resveratrol**. 2018. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

GOUVEIA, B. B. *et al.* Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. **Animal Reproduction (AR)**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 316-323, fev. 2015.

GROOT, A. C. Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. **Dermatitis**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 263-282, jun. 2013.

HOLT, W. V.; PICARD, A. R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Rev. Reprod.**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 143-150, jan. 1999.

LIMA, G. L. **Caracterização Conservação da população de folículos ovarianos pré-antrais de catetos, (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758)**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2011.

LIMA, D. B. C.; SILVA, L. D. M. Obtenção e conservação do material genético do

gato doméstico macho. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 278-282, jan. 2017.

LIMA, G. L. **Conservação de material genético de espécies silvestres do bioma caatinga utilizando a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)**. 2015. 213 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Norte e Nordeste de Biotecnologia RENORBIO, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2015.

LIMA, G. L. *et al.* Short-term preservation of Pecari tajacu ovarian preantral follicles using phosphate buffered saline (PBS) or powdered coconut water (ACP®) media. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 1623-1630, jun. 2014.

LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 43-50, jan. 2010.

LUCCI, C. M. *et al.* Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 461-472, jan. 2004.

LUSTOSA, S. R. Própolis: Atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacologia**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 447-454, mar. 2008.

LUZ, H. K. M. *et al.* papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinarie**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 956-960, fev. 2011.

LUZ, V. B. *et al.* **Protocolo para caracterização histológica do ovário de ovinos. Comunicado Técnico 191**. Brasília: EMBRAPA, 2016.

MACIEL, S. S. **Impacto morfofpatológico do extrato de folhas de graviola (*Annona muricata* L.) na reserva ovariana de camundongos fêmeas**. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, 2018.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction Domestic Animals**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 49-55, jan. 2001.

MATOS, M.; BEZERRA, M.; VICENTE, W. R. R. Criopreservação e xenotransplante de tecido ovariano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 467-471, abr. 2011.

MATOS, M. H. T. *et al.* Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 65- 80, jan. 2004.

MELO, A. A. M. *et al.* Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 3, p. 341-348, mar. 2014.

MELO JÚNIOR, J. **Efeito do tempo e da temperatura sobre a viabilidade de tecido ovariano de fetos bovinos**. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MERGULHÃO, N. L. O. N. **Obtenção e caracterização de micropartículas de própolis vermelha combinadas ao óleo essencial de hortelã-pimenta**. 2019. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

MISSIO, D.F.Q. Conservação de folículos pré-antrais de felinos domésticos (*Felis catus*) refrigerados por 24 h em TCM 199 e PBS. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 38, n. 3, p. 176-181, jul./set, 2014.

MORAIS, M. L. G. S. **Efeitos da suplementação de anetol ou robinina na vitrificação e incubação in vitro do tecido ovariano ovino**. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MOTTA, L. C. B. *et al.* Avaliação histológica da viabilidade de folículos ovarianos suínos submetidos a diferentes condições de transporte. **Revista Brasileira de Sanidade e Saude Animal**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 75-86, fev. 2017.

MOTTA, L. C. B. **Avaliação Fisiológica da Viabilidade de Folículos Ovarianos Suínos submetidos a diferentes condições de transporte**. 2016. 39 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

MOTTA, L. C. B. *et al.* Avaliação histológica da viabilidade de folículos ovarianos suínos submetidos a diferentes condições de transporte. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 368-375, mar. 2019.

NAVES, A. C. **Influência do ambiente na qualidade de oócitos, produção in vitro de embriões e na taxa de prenhez em taurinos, zebuínos e adaptados**. 2020. 41 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.

NANI, B. D. *et al.* Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. **Phytother Res.**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 750-754, abr. 2018.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 414-421, jan. 2010.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 689-702, jan. 2009.

PEREIRA, L. M. C.; BERSANO, P. R. O.; LOPES, M. D. Influência da temperatura de transporte de ovários na maturação *in vitro* de oócitos caninos coletados em diferentes estágios do ciclo estral. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 158-166, jan. 2015.

PICCININI, A. *et al.* Composição química e atividade biológica da própolis de *Melipona quadrifasciata*. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1-9, dez. 2022.

PLÁCIDO, J. C. P. **Avaliação de folículos pré-antrais suínos após resfriamento e criopreservação**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PRAXEDES, É. C. G. *et al.* Reproduction in agouti (*Dasyprocta* spp.): A review of reproductive physiology for developing assisted reproductive techniques. **Anim. Reprod.**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 1181-1192, dez. 2018.

QUEIROZ NETA, L. B. *et al.* Estado atual da conservação a 4° C de tecidos somáticos derivados da pele em mamíferos. **R. bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 42, n. 1, p. 3-8, jan. 2018.

RIBEIRO, M. **Atividade antimicrobiana do extrato de própolis vermelha e verde frente ao microorganismo *Staphylococcus aureus***. 2011. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Fundação Educacional do Município de Assis, Assis, 2011. Disponível em: <https://cepein.femanet.com.br./BDigital/arqTccs/0811290670.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2021.

ROCHA, C. D. **Vitrificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol**. 2017. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

RODRIGUES, A. P. R. *et al.* Criopreservação de tecido ovariano e/ou folículos pré-antrais: uma alternativa para salvaguardar o material genético e a fertilidade de ovelhas e cabras valiosas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 235-241, jun. 2019.

RODRIGUES, S. D. C. **Efeito do resveratrol associado a sacarose na vitrificação de tecido ovariano bovino**. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos) – Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2020.

ROSA, F. Q. *et al.* Avaliação da eficiência de diferentes meios de conservação de folículos pré-antrais de gatas domésticas (*Felis catus*). **Anais do 3º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIPAMPA: Pesquisa e Inovação**, [s. l.], v. 3, n. 2., p. 1-9, jan. 2011.

ROSSETTO, R. *et al.* Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 15-23, jan. 2011.

SAÂNCHES-MORENO, C.; LARRAURI, J.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 407-412, jan. 1999.

SALEHI, P. *et al.* Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. **Cryobiology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 245-253, jan. 2004.

SANTOS, R. P.; SILVA, A. R. Biobancos para a conservação da vida silvestre: desafios e perspectivas. Anais do Congresso Internacional da Associação Latinoamericana de Reprodução em Pequenos Animais. Punta del Este, Uruguay, 29 a 30 de novembro de 2022. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 46, n. 4, p. 413-430, dez. 2022.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 133, n. 1, p. 253-260, jan. 2011.

SILVA, G. M. *et al.* Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 35, n. 1, p. 315-326, jan. 2011.

SILVA, K. C. M. **Os diferentes tipos de própolis e suas indicações**: uma revisão da literatura. 2019. 53 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar, Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2019.

SILVA, L. M. **Adição de agentes antioxidantes na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino**: uma perspectiva para refinar e aperfeiçoar o protocolo. 2017. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SILVA, L. M. *et al.* Importância da utilização de ácido alfa lipóico (ALA) e catalase (CAT) no processo de criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais, visando reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo. **Revista de medicina da UFC**, Fortaleza, v. 60, n. 1, p. 41-46, jan. 2020.

SILVA, R. P. D. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1-10, mar. 2016.

SILVA, V. A. **Micropartículas de própolis-polímero para aplicação como produto cosmético multifuncional**. 2015. 159 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

SILVEIRA, M. M. **Viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* transportados por diferentes tempos em meio de manutenção com antioxidantes**. 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 299, n. 1, p. 152-178, jan. 1999.

SOARES, M. D. *et al.* Efeito da aloe vera no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovinos. *In: VI ENCONTRO INTERNACIONAL DE JOVENS INVESTIGADORES*, 6., 2019, Fortaleza. **Anais [...]** Fortaleza: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2019.

SOVERNIGO, T. C. **Uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2015. 51 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade do Norte do Paraná, Arapongas, 2015.

TAVARES, M. R. **Avaliação da qualidade folicular pós-criopreservação testando: um método alternativo de congelamento lento e hipotaurina no meio de transporte, de tecido gonadal de gatas**. 2020. 81 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2020.

TORETI, V. C. *et al.* Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med.**, [s. l.], v. 2013, n. 1, p. 1-10, jan. 2013.

WONGSRIKEAO, P. *et al.* Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 87-97, jan. 2005.

ZIA-UL-HAQ, M. *et al.* Biological screening of select ed flora of Pakistan. **Biol Res, Santiago**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 375-379, abr. 2012.