

**Regional
Jataí**



LAÍS GUERRA PRADO

**NANOPARTÍCULA DE PRATA NO CONTROLE BIOLÓGICO
EM DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

JATAÍ-GO

2021

**UFG**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE
TESES****E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico☒ Dissertação ☐ Tese**2. Nome completo do autor: Lais Guerra Prado****3. Título do trabalho: NANOPARTÍCULA DE PRATA NO CONTROLE BIOLÓGICO EM DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO****4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Monica Rodrigues Ferreira Machado, Orientadora**, em 20/04/2021, às 12:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **LAÍS GUERRA PRADO, Discente**, em 25/04/2021, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de](#)

file:///C:/Users/Clélio/Desktop/Lais/Termo_de_Ciencia_e_de_Autorizacao__TECA__2014659 (2).html

1/2

10/05/2021

SEI/UFG - 2014659 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)

[outubro de 2015.](#)

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2014659** e o código CRC **647FC639**.

LAÍS GUERRA PRADO

**NANOPARTÍCULA DE PRATA NO CONTROLE BIOLÓGICO EM DILUENTE DE
REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

Orientador(a): Prof. Dra Mônica Rodrigues Ferreira Machado

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal de
Jataí, como pré-requisito para obtenção do grau
de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração:

Saúde e Produção Animal

Linha de pesquisa:

Morfofisiologia, Clínica e Cirurgia Animal

JATAÍ-GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Prado, Laís Guerra

NANOPARTÍCULA DE PRATA NO CONTROLE BIOLÓGICO EM
DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO [manuscrito] /

Laís Guerra Prado. - 2021.

XXXV, 35 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado; co
orientador Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Jataí, Programa de Pós
Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2021.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. AgNp. 2. antibióticos. 3. diluentes. I. Machado, Mônica Rodrigues
Ferreira, orient. II. Título.

CDU 639.09

10/05/2021

SEI/UFG - 2013315 - Ata de Defesa de Dissertação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **008/2021-PPGBA** da sessão de Defesa de Dissertação de **LAÍS GUERRA PRADO**, que confere o título de Mestra em **BIOCIÊNCIA ANIMAL**

Ao vigésimo dia do mês de abril do ano de dois mil e vinte e um, a partir das 08:00 horas, realizou-se por meio de videoconferência a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **"EFEITO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE OS EFEITOS ESPERMÁTICOS DO SÊMEN REFRIGERADO EQUINO"**. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Mônica Rodrigues Ferreira Machado (UAECIBIO/Universidade Federal de Jataí/GO), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Karen Martins Leão (Medicina Veterinária/IFG Rio Verde) - membro titular externo e Professor Doutor Rodrigo Arruda de Oliveira (FAC de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNB) - membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Mônica Rodrigues Ferreira Machado, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao vigésimo dia do mês de abril do ano de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA**NANOPARTÍCULA DE PRATA NO CONTROLE BIOLÓGICO EM DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

Documento assinado eletronicamente por **Monica Rodrigues Ferreira Machado, Orientadora**, em 20/04/2021, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Martins Leão, Usuário Externo**, em 20/04/2021, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Arruda de Oliveira, Usuário Externo**, em 20/04/2021, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2013315** e o código CRC **C46A6A55**.

Dedico esse trabalho à toda minha família, meus amigos e esposo que me acompanham nessa jornada. Sem vocês nada disso seria possível! Agradeço imensamente a minha orientadora e meu coorientador pela paciência e presteza. À minha filha Lívia... Tudo isso é para você!

AGRADECIMENTOS

A Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado e Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo, pela orientação, ensinamentos e paciência. Agradeço pela disposição e presteza nas atividades desenvolvidas.

Ao Dr. Ariel Eurides Stella, pelo apoio, suporte técnico e instruções. Agradeço pelos ensinamentos, pelas explicações detalhistas de cada etapa desenvolvida e sua importância na pesquisa.

A MSc. Angélica Franco de Oliveira por oferecer suporte nas análises desenvolvidas nesta pesquisa.

Ao laboratório Botupharma pelo apoio e contribuição na pesquisa.

À equipe de alunos de iniciação à ciência que participaram com muita presteza desse experimento.

RESUMO

A utilização de biotécnicas reprodutivas como inseminação artificial e a transferência de embriões estão se expandido para aprimorar a produção desses animais. Para a realização dessas biotécnicas, pode ser utilizado o sêmen equino fresco ou refrigerado. No transporte com sêmen refrigerado, necessita-se de diluentes que oferecem proteção aos espermatozoides, conferindo assim maior viabilidade desse sêmen. São adicionados antibióticos aos diluidores, com o intuito de diminuir o crescimento bacteriano no armazenamento do sêmen até o momento da inseminação, no entanto, os antibióticos não devem interferir na qualidade seminal, ou mesmo impedir o estabelecimento da microflora vaginal, o que favoreceria o crescimento de microrganismos patogênicos. Como alternativa, propomos a AgNp (nanopartículas de prata), que pode contribuir na preservação das características espermáticas além de prevenir a disseminação de possíveis patógenos.

Palavras chave: AgNp, antibióticos, diluentes, sêmen.

ABSTRACT

Equine breeding is constantly expanding, in which the intensification and technification of breeding is increasingly required. The use of reproductive biotechniques as artificial insemination and embryo transfer are expanding to improve the production of these animals. For the realization of these biotechniques, fresh or refrigerated equine semen can be used. When transporting with refrigerated semen, diluents are needed to provide protection for sperm, thus conferring greater viability of this semen. Antibiotics are added to the extenders in order to decrease bacterial growth in semen storage until the time of insemination, however, antibiotics must not interfere with seminal quality, or even prevent the establishment of vaginal microflora, which would favor growth of pathogenic microorganisms. As an alternative, we propose AgNp (silver nanoparticles), which can contribute to the preservation of sperm characteristics in addition to preventing the spread of possible pathogens.

Keywords: AgNp, Antibiotics, Semen extenders, semen.

SUMÁRIO

<u>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</u>	1
<u>1 INTRODUÇÃO GERAL</u>	1
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA</u>	3
<u>2.2 Transporte de sêmen equino</u>	4
<u>2.3 Principais diluentes empregados na refrigeração do sêmen equino</u>	6
<u>2.4 Nanotecnologia - Nanopartículas de prata</u>	7
<u>2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	8
<u>2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	9
<u>CAPÍTULO 2 – NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CONTROLE BIOLÓGICO DE SEMEN EQUINO REFRIGERADO</u>	10
<u>RESUMO</u>	10
<u>ABSTRACT</u>	11
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	12
<u>2.MATERIAIS E MÉTODOS</u>	13
<u>2.1. Local do experimento</u>	13
<u>2.2 Reagentes e meios</u>	13
<u>2.3 Cultura e isolamento de bactérias</u>	13
<u>2.3.1 - Determinação da concentração de AgNP</u>	14
<u>3 RESULTADOS</u>	16
<u>4. DISCUSSÃO</u>	18
<u>5. CONCLUSÕES</u>	20
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	21

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA 2-Representação esquemática do processo de incubação das bactérias –</u>	
<u>Primeiro passo.....</u>	15
<u>FIGURA 3-Representação esquemática do processo de incubação das bactérias.</u>	15

LISTA DE TABELAS

<u>TABELA 1-Resultados Microbiológicos – Contagem de colônia das bactérias</u> <u>Staphylococcus Aureus e Pseudomonas SPP</u>	15
<u>TABELA 2-Resultados Microbiológicos da AgNP diluída em PBS</u>	17

LISTA DE ABREVIATURAS

CASA	Análise computadorizada do movimento espermático
BS	Botusemen
AGNP	Nanopartículas de prata
IA	Inseminação Artificial
GC	Grupo Controle
AG	Prata
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Plate Count Agar
UFC	Unidade formadora de colônia
UFJ	Universidade Federal de Jataí

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO (2016) – estimou a população mundial de equinos em 2016 em 59.048.194 cabeças, tornando o Brasil o maior rebanho da América do Sul, com mais de cinco milhões de cabeças de equinos, ocupando o quarto lugar no mundo. A equinocultura no país está em constante expansão, assim a tecnificação das criações está sendo cada vez mais solicitada (FARIAS et al., 2019). A inseminação artificial é uma técnica utilizada como uma importante ferramenta para o melhoramento reprodutivo, tanto com sêmen refrigerado ou congelado.

A utilização do sêmen refrigerado permite a manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides por períodos de 24 a 36 horas, propiciando uma flexibilidade na coleta e envio do sêmen no momento mais oportuno (VARNER et al., 1998). O sêmen refrigerado apresenta muitas vantagens como a redução com gastos inerente ao transporte e a hospedagem de animais, menor risco com acidentes e aquisição de doenças sexualmente transmissíveis e redução do estresse provocado pelo transporte dos animais (MACIEL et al., 2016).

Em torno de 5 °C, o espermatozoide usa o metabolismo anaeróbico, que é induzido pelo esgotamento de oxigênio, provocando a diminuição do pH, redução do metabolismo e produção de ATP, ocasionando queda de motilidade. Assim, é essencial a utilização dos diluentes para a manutenção das propriedades do sêmen refrigerado a 5 °C por 24 horas ou mais de armazenamento. Os diluentes de sêmen dispõem da capacidade de exercer efeitos benéficos controlando o pH e osmolaridade do meio, oferecendo substrato energético para o espermatozoide e diluindo o plasma seminal (MARTINS et al., 2016).

Os diluentes industrializados, além de proteger à membrana plasmática dos espermatozoides no choque térmico, possuem substâncias que neutralizam produtos tóxicos oriundos do crescimento bacteriano, como os antibióticos. Diluentes comerciais foram desenvolvidos para beneficiar a viabilidade espermática durante a refrigeração, para a manutenção da motilidade adequada para inseminação por mais de 24 horas a 5 °C (CASTRO et al., 2020).

As AgNPS (Nanopartículas de prata) podem contribuir na preservação das características espermáticas além de potencialmente poder prevenir a disseminação de possíveis patógenos (DOS SANTOS et al., 2014).

A utilização de antibióticos nos meios de diluição de sêmen é aconselhada com o intuito de reduzir o crescimento bacteriano no armazenamento do sêmen até o momento da IA (SILVA et al., 2011). Altas concentrações de antibióticos são deletérias ao espermatozoide pela sua toxicidade e podem resultar na diminuição da fertilidade no processo da inseminação artificial (OLIVEIRA et al., 2018).

A contaminação do ejaculado por bactérias patogênicas, pode induzir à ativação de caspases nos espermatozoides, promovendo perda da função espermática e indução da apoptose. Tal deterioração é mais expressiva durante o processo de armazenamento do sêmen. (SANCLER – SILVA et al., 2020).

Na busca de novas estratégias para combater os microrganismos patogênicos pode-se aplicar a utilização de moléculas biologicamente ativas na formulação de meios para manutenção de sêmen, faremos abordagem sobre as nanopartículas, que são definidas como materiais com tamanho entre 1 e 100 nm, com propriedades

mecânicas, ópticas, elétricas e estruturais avançadas, além de uma aumentada área de superfície em relação à substância original (DOS SANTOS et al., 2012).

Existem moléculas biologicamente ativas que possuem ação contra microrganismos, não apenas contra bactérias como a maioria dos antibióticos. Dentre essas moléculas as nanopartículas de sais de prata (AgNPs) possuem diversas aplicações, destacando-se sua atuação como antimicrobiano e em razão do atual problema de resistência bacteriana, esse produto vêm se tornando foco de estudos para novas drogas que atuem como antimicrobianos ou em sinergismo com medicamentos atuais (DOS SANTOS et al., 2014).

A possibilidade de desenvolver nova geração de meios diluentes com produtos antimicrobianos que não induzem resistência bacteriana tornam a AgNPs uma alternativa atrativa para superar o problema da resistência aos medicamentos (DOS SANTOS et al., 2014). Além disso, em gananhões com problemas infecciosos crônicos do trato reprodutivo, por exemplo vesiculites crônicas, que costumam ser causadas por bactérias resistentes a uma série de antibióticos disponíveis no mercado (VARNER et al., 1998), seriam uma alternativa para melhorar a qualidade desse sêmen e diminuir a disseminação desses patógenos para outros animais.

O presente projeto tem como objetivo avaliar a atividade de AgNPs como componente de controle microbiano no refrigeramento de sêmen equino e seus efeitos sobre os parâmetros espermáticos, microbiológicos e de fertilidade. O trabalho se justifica pela necessidade de testar diferentes concentrações de AgNPs no sêmen equino refrigerado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transporte de sêmen equino

No Brasil, os sistemas de refrigeração de sêmen equino mais empregados são os sistemas passivos, onde a redução da temperatura do sêmen é mantida em caixas isotérmicas próximas a uma fonte de frio (gelo biológico reciclável), que permitirá o sêmen refrigerado a 15 a 20°C, ou refrigerado a 4 a 6°C, para preservação e transporte do material biológico em períodos variando de 1 a 48 horas. Dessa forma, o sêmen mantido a 5°C, pode ser utilizado por até 48 horas (DA SILVA et al., 2017).

As caixas isotérmicas deverão apresentar condições adequadas, como o completo isolamento do ambiente, ser inócuo para os espermatozoides, manter a temperatura para o tempo proposto e permitir a realização de curva de refrigeração lento (DA SILVA et al., 2017).

No processo de refrigeração do sêmen de 37°C a 5°C, a refrigeração deve ser controlada, principalmente entre 19°C e 8°C, que é a faixa de maior sensibilidade da célula espermática equina, já que neste intervalo pode haver o choque térmico. Salientando que nesta faixa de temperatura, os lipídeos da membrana plasmática estão na fase de transição, que corresponde do estado fluido para o gel, e após sair desse período, a refrigeração pode ser feita de forma rápida a partir de 8°C até 5°C (MORAN et al., 1992).

A refrigeração do sêmen é uma biotécnica usada para aumentar a longevidade de espermatozoides fora do trato reprodutivo, o que otimiza o seu uso e, conseqüentemente, aumenta o número de produtos obtidos de animais de genética nobre (DE OLIVEIRA et al., 2017). O ciclo da refrigeração inclui a diminuição da temperatura, o armazenamento seguido do reaquecimento do sêmen para posteriormente ser utilizado, esperando-se que a célula espermática permaneça com sua integridade estrutural e função semelhante à célula espermática do sêmen fresco (MORAN et al., 1992).

Na utilização do sêmen refrigerado vários fatores podem interferir no resultado final da fertilização de éguas inseminadas, tais como: a temperatura e o tempo de armazenamento do sêmen, o tipo de container, a curva de refrigeração, o momento

da inseminação, a qualidade individual do garanhão, além do tipo de diluente empregado (NEUHAUSER et al., 2018).

A manutenção da fertilidade dos espermatozoides é imprescindível durante a refrigeração, o transporte até o momento da inseminação. Qualquer alteração que ocorra durante a colheita e o armazenamento do gameta masculino, até o seu contato com o ovócito, poderá afetar a fecundação (FELICIO et al., 2017).

Em temperatura corporal, o metabolismo espermático é alto e, a cada 10°C de sua queda, este diminui em cerca de 50%. Quando os espermatozoides são mantidos a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo é essencial para sua sobrevivência quando comparado à preservação a 38°C. Assim, a refrigeração diminui o catabolismo espermático, o que é necessário para a preservação do ejaculado por períodos duradouros (FELICIO et al., 2017).

A refrigeração pode levar à ruptura acrossomal acarretando uma diminuição da fertilidade. A redução da temperatura de 38°C para 30°C de uma amostra de sêmen composta por células com membranas instáveis, devido à capacitação, já é o suficiente para desencadear a reação do acrossomo. Assim, deve-se estar atento aos danos que o diluente e a curva de refrigeração utilizados podem acarretar ao acrossoma. Logo, protegendo-se as membranas celulares e as funções espermáticas no decorrer da refrigeração até o momento da inseminação, espera-se um aumento da longevidade dos espermatozoides por diminuição na utilização das reservas de ATP, permitindo que o ejaculado seja utilizado por longos períodos após sua colheita (VARNER et al., 1998).

2.3 Principais diluentes empregados na refrigeração do sêmen equino

O uso do diluente é essencial para a proteção do espermatozoide durante seu armazenamento. Acredita-se que os diluentes prolongam a vida dos espermatozoides, estabilizando os sistemas enzimáticos e conservando a integridade da membrana. Além do mais, protegem o espermatozoide de condições ambientais desfavoráveis, como o choque térmico (MARTINS et al., 2016).

Considerando a significativa redução da motilidade espermática em equinos quando realizada a refrigeração do sêmen por 24h ou mais, torna-se importante a utilização de diluentes específicos para a conservação das características seminais e consequentemente, a preservação da fertilidade. A seleção

do diluente deve ser baseada no tipo de inseminação artificial à ser realizada, tempo de armazenamento e na individualidade de resposta ao refrigeração de cada garanhão (AGUIAR et al., 2020).

A maioria dos diluentes de sêmen equino que são utilizados para a refrigeração são a base de leite em pó desnatado, glicose e antibióticos. Um bom diluente deve conter alguns atributos como uma osmolaridade compatível (300 a 400 mOsm/Kg), balanço entre os elementos minerais, nutrientes, ausência ou neutralização de substâncias tóxicas, promover proteção contra alterações bruscas de temperatura, estabilização enzimática e garantir integridade de membrana plasmática (AMMAN et al., 1987) .

O Botusemen® é um diluente para transporte de sêmen equino, usado em nosso experimento, que promove segurança aos espermatozoides até o momento da inseminação. É composto por leite em pó, antibióticos, tampões, açúcares, conservantes e excipientes.

Os antibióticos são componentes relevantes dos diluentes. Visto que na coleta do sêmen com vagina artificial, pode acontecer contaminação bacteriana pelos órgãos genitais. Os antibióticos são usados com intuito de diminuir essa contaminação bacteriana do sêmen, no entanto, eles não devem interferir na qualidade seminal ou impedir o estabelecimento da microflora vaginal, o que favoreceria o crescimento de microorganismos patogênicos (FELICIO et al., 2017).

O pênis do garanhão possui flora microbiana natural que é capaz de contaminar o sêmen durante a ejaculação. Tradicionalmente, os antibióticos foram incorporados aos diluentes para inibir o crescimento bacteriano no sêmen armazenado e resguardar a égua da endometrite pós-cobertura. Contudo, não somente as bactérias, como alguns antibióticos podem ter efeitos prejudiciais sobre os espermatozoides, como a gentamicina e sulfato de polimixina, que diminuem a motilidade do sêmen durante o refrigeração (CASTRO et al., 2020).

Embora a maioria dos meios utilizados para diluição do sêmen equino refrigerado ser composto de leite desnatado e glicose, variações estão comercialmente disponíveis e divergem especialmente quanto à composição de antibióticos e açúcar (FELICIO et al., 2017).

2.4 Nanotecnologia - Nanopartículas de prata

A nanotecnologia amplia a ciência de materiais para o domínio de partículas com dimensões extremamente pequenas, da ordem de um a cem nanômetros. Partículas deste tamanho, ou “nanopartículas”, possuem uma vasta área superficial e podem exibir propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas (FERREIRA et al., 2017).

É uma das áreas da ciência que se desenvolve atualmente, resultado dos grandes investimentos em pesquisa, sendo os maiores investidores e com maior nível de desenvolvimento os Estados Unidos, seguidos da Alemanha e Japão (ALENCAR et al., 2017).

O uso das nanopartículas está presente nas mais variadas áreas e produtos de consumo, como na fabricação de dispositivos eletrônicos, aditivos alimentares, produtos antibacterianos, engenharia de tecidos, na confecção de embalagens, em produtos de higiene pessoal, cosméticos, na medicina, também em pesquisas biológicas, imunoenaios, assim como nanocarreadores de agentes terapêuticos que agem na liberação de fármacos e genes (ALENCAR et al., 2017).

Dentre os vários tipos de metais usados na preparação de nanopartículas, os metais de transição são os que geram maior interesse, em virtude de suas propriedades catalíticas. A prata é um dos metais de transição mais importantes para o desenvolvimento de novas metodologias de preparação de nanopartículas e também por ser um material tecnologicamente relevante (MAZIERO et al., 2016).

A prata em escala nanométrica apresenta uma melhor interação com os microrganismos devido a sua grande área superficial. Assim, estas nanopartículas acometem a superfície celular e também penetram no interior desses organismos. As nanopartículas de prata são capazes de promover uma liberação sustentada de Ag⁺ no interior das células dos microrganismos, podendo formar radicais livres e induzir o estresse oxidativo, fortalecendo sua atividade antimicrobiana (MAZIERO et al., 2016).

As AgNPs dispõem de uma propriedade antimicrobiana eficaz em razão da grande área capaz de proporcionar um melhor contato com os microrganismos. Se ligam a membrana celular das bactérias assim como podem penetrar em seu interior. No momento em que a nanopartícula entra na bactéria ataca preferivelmente a cadeia respiratória e a divisão celular, podendo levar a morte. A liberação dos íons de prata nas células bacterianas amplia a atividade bactericida destas nanopartículas (DOS SANTOS et al, 2014).

O efeito mais evidente é o estresse oxidativo, as AgNPs se acumulam nas mitocôndrias, causando um dano mitocondrial, perturbando a cadeia respiratória, gerando ROS e estresse oxidativo. É possível que as AgNPs atuem também diretamente no retículo endoplasmático (RE) impedindo as moléculas de proteínas de se dobrarem para assumir a sua configuração funcional. Desse modo, as AgNPs podem induzir a apoptose.

Nos últimos anos, o aparecimento de microrganismos resistentes como fungos, vírus e bactérias aumentou em um ritmo preocupante, tornando necessário a busca de novos agentes para controle efetivo destes microrganismos. De preferência naturais e que não sejam tóxicos ao meio ambiente nem aos seus componentes em geral. Para tal, a utilização de nanopartículas de prata surge como uma alternativa viável e eficiente para este fim.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os benefícios expostos, as nanopartículas de prata podem ser mais uma alternativa no controle microbiológico

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen. **Theriogenology**. 2008;107(3-4):268-275

CASTRO, F. S., PIMENTEL, A., MATTOS, R. C., & FIALA RECHSTEINER, S. M. DA E. (2020). Utilização de leite com diferentes concentrações de gordura como diluentes para sêmen equino refrigerado. **Ciência Animal Brasileira**, v.21, e-44262.

DOS SANTOS, C.A; SECKLER M.M; INGLE,A.P; GUPTA, I; GALDIERO,S; GALDIERO,M; GADE,A; RAI,M. Silver nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. **Journal of pharmaceutical sciences**. 2014.

FARIAS, D. K., BUNN, S., FRISO, A. DE M., THALER NETO, A., MEZZALIRA, A., PINTO, M. G. L., OLIVEIRA, R. A. DE, & MOZZAQUATRO, F. D. (2019). SUPEROVULAÇÃO EM ÉGUAS DA RAÇA CRIOLA E QUARTO DE MILHA COM EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA (EPE). **Ciência Animal Brasileira**, 20(1), 1–8.

MACIEL, A.C; V. CAMARGO, R.C; MATTOS & S.F. RECHSTEINER. Viabilidade do sêmen equino armazenado em sistema de polietileno para transporte por oito horas. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44: 1429, 2016.

MARTINS H.S, SOUZA M.R, PENNA, C.F, DA SILVA G.C, CÔRTEZ S.F, STAHLBERG R, LAGARES M.A. Milk, caseinate and lactoferrin addition to equine semen cooling extenders. **Andrologia**. 2016;48(9), 950-956.

OLIVEIRA, M.K.B; ZANDONAIDE, J.P.B; SEVERO, N.C; GOMES, A.L; IGARASI, M.S; QUINTAL, A.P.F; VASCONCELOS, A.B. Comparação de diluidores comerciais na motilidade, funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 67-71, abr./jun. 2018

SILVA, R.P; LEÃO, K.M; MOUTINHO, E.P.M; SILVA, N.C; RODRIGUES, M.C; SILVA,M. A. P. Avaliação de dois diluentes de refrigeração e o efeito da presença do plasma seminal sobre a viabilidade do sêmen equino refrigerado. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 20, Ed. 167, Art. 1126, 2011.

SANCLER-SILVA, Y.F.R. ; MONTEIRO, G.A. ; RAMIRES-NETO, C. ; FREITAS-DELL'AQUA, C.P. ; CRESPILOHO, A.M. ; FRANCO, M.M.J. ; SILVA-JUNIOR, E.R. ; CAVALERO, T.M.S. ; SCHEEREN, V.F.C. ; PAPA, F.O. . Does semen quality change after local treatment of seminal vesiculitis in stallions?. **THERIOGENOLOGY** , v. 144, p. 139-145, 2020

VARNER, D.D; SCALAN, C.M; THOMPSON, J.A; BRUMBAUGH, G.W; BLANC HARD,T.K; JHONSON, L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology - Journal – Elsevier**, 1998.

CAPÍTULO 2 – NANOPARTÍCULAS DE PRATA NO CONTROLE BIOLÓGICO DE SEMEN EQUINO REFRIGERADO

PRADO, L.G¹, MACHADO, M.R.F¹, ARAUJO, G.H.M¹

¹ Programa de pós graduação em Biociência animal. Departamento de Pós Graduação em Biociência animal, Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, Rodovia BR 364, Km 192, caixa postal 03, CEP 75801-615 Jataí – GO

RESUMO

O uso do diluente é essencial para a proteção do espermatozoide durante seu armazenamento. Sabe-se que os diluentes prolongam a vida dos espermatozoides, estabilizando os sistemas enzimáticos e mantêm a integridade da membrana. Além disso, protegem o espermatozoide de condições ambientais desfavoráveis, como o choque térmico. A utilização do diluente é importante para a conservação das características seminais e consequentemente, a preservação da fertilidade. São adicionados antibióticos aos diluidores, com o intuito de diminuir o crescimento bacteriano no armazenamento do sêmen até o momento da inseminação, no entanto, os antibióticos não devem interferir na qualidade seminal, ou mesmo impedir o estabelecimento da microflora vaginal, o que favoreceria o crescimento de microrganismos patogênicos. Como alternativa, propomos a AgNp (nanopartículas de prata), que pode contribuir na preservação das características espermáticas além de prevenir a disseminação de possíveis patógenos. O objetivo foi avaliar o efeito microbiológico das AgNPs nos meios diluidores de sêmen equino para transporte. Objetivamos avaliar também o efeito da AgNp diluída em PBS e em água destilada em diferentes diluições sobre o crescimento bacteriano em colônias de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp.* Houve pequena variação na concentração da AgNP diluída em água destilada quando compara ao meio PBS. A AgNP teve efeito microbiano satisfatório quando adicionada à cultura de bactérias.

Palavras chave: AgNp, antibióticos, diluentes, sêmen.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobials has propitiated some pathogenic bacteria to the selection of multidrug-resistant strains, a circumstance that can be aggravated by the formation of biofilm. Thus, as silver nanoparticles (AgNPs) standing out as an innovative, low cost and efficient alternative against diseases caused by bacteria.

The objective was to evaluate the activity of AgNPs as a component of microbial control in the cooling of equine semen and its effects on sperm, microbiological and fertility parameters and, mainly, to analyze the effects of different needs / dilutions of AgNp on sperm membrane integrity, Motility , Stamina and pathologies of equine semen refrigerated at different temperatures (24h → 5oC and 15oC; 48h → 5oC) in semen diluting media for transportation. We also aim to evaluate the effect of AgNp (diluted in PBS and distilled water) at different dilutions on bacterial growth in colonies of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* spp. There was little variation in the concentration of AgNP diluted in distilled water when compared to the PBS medium. AgNP had a satisfactory microbial effect when it appeared in the culture of bacteria.

Keywords: AgNp, antibiotics, thinners, stallions, semen.

1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução, tais como a coleta de sêmen e inseminação artificial são cada vez mais utilizadas. Essas técnicas possuem algumas vantagens como impedir a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis e acidentes durante a monta natural, até a otimização dos garanhões e disseminação do material genético, pelo transporte do sêmen refrigerado (BAZZANO et al., 2021).

O uso de sêmen equino resfriado ocorre em nível mundial, sendo enviado, inclusive por via aérea, para regiões muito distantes. O envio de sêmen reduz gastos, evita o transporte de éguas até o local onde se encontra o garanhão e amplia o número de garanhões disponíveis para os proprietários das éguas.

As AgNPS (Nanopartículas de prata) podem contribuir na preservação das características espermáticas além de potencialmente poder prevenir a disseminação de possíveis patógenos.

Ainda que existam muitas terapias antimicrobianas disponíveis no mercado para diferentes infecções bacterianas, seu uso indiscriminado fez com que várias bactérias patogênicas adquirissem resistência. Uma das formas de resistência bacteriana é caracterizada pela formação de biofilme, que dispõe de um mecanismo de ação bem complexo e dinâmico, onde colônias microbianas crescem envoltas por um material viscoso aderido na superfície (BRAGA et al., 2018).

Deste modo, a busca por novas alternativas viáveis para o desenvolvimento de antimicrobianos que controlem ou eliminem este tipo de resistência é urgente e primordial. Assim, a nanotecnologia apresenta-se como uma alternativa importante, visto que os compostos na escala nanométrica apresentam propriedades distintas quando comparados na escala macrométrica (ALENCAR et al., 2017).

As nanopartículas são substâncias com dimensões entre 1 e 100 nanômetros (nm) apresentam alto potencial de destruir ou reduzir a atividade de vários micro-organismos. Dentre as nanopartículas metálicas, as de prata são as mais conhecidas por suas utilidades em diferentes áreas, como na medicina humana e veterinária, farmacologia, odontologia, indústria alimentícia, entre outras (BRAGA et al., 2018).

A forma como a nanopartícula é sintetizada é o que define algumas de suas propriedades. Modificações no pH, temperatura, concentração do composto utilizado como fonte de prata, entre outros fatores, influenciam o tamanho, a forma e a estabilidade da NP. A síntese pode ser química, biológica (extratos de sistemas vivos) ou física, sendo o processo biológico considerado o menos agressivo para o meio ambiente.

Há um grande interesse na utilização das nanopartículas de prata (AgNPs), devido às suas propriedades relevantes, como área superficial elevada, alta atividade antimicrobiana e como alternativa para diminuição da adesão bacteriana e prevenção da formação de biofilmes (MAZIERO et al., 2016).

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local do experimento e animais utilizados

As análises microbiológicas e diluição das AgNPs foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal Jataí.

2.2 Reagentes e meios

As AgNPs foram adquiridas no laboratório de Química da UFJ. Os meios diluidores foram adquiridos na empresa Botupharma®.

2.3 Cultura e isolamento de bactérias

As bactérias foram obtidas através do Laboratório de Microbiologia da UFJ.

Foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp* incubados em caldo nutriente à 37°C por 24 horas.

Foi realizado o cultivo de ambas bactérias, a semeadura da bactéria e seleção das colônias. Para obter isolados puros, as colônias, que apareceram depois de 24 horas em incubação a 37°C, foram selecionadas com base nas suas características morfológicas e cultivadas novamente.

O total de colônias contadas foi multiplicado por 10^3 CFUs de acordo com a diluição usada neste estudo.

2.3.1 - Determinação da concentração de AgNP

UFoi utilizado inicialmente, AgNP diluída em água destilada, fornecida pelo Laboratório de Química da Universidade, na concentração original de 0,107mg/ml.

As concentrações da AgNP no Botusemen usadas foram: 10%, 5%, 2,5%, 1% e 0,1% (7 grupos), o grupo controle foi composto pelo o Botusemen® original (com antibiótico) e Botusemen ® sem antibiótico.

Foram usadas duas concentrações de *Staphylococcus aureus*: 1×10^3 UFC/mL (concentração de uso baixa) e 1×10^6 UFC/mL (concentração de uso alta).

Na concentração alta, foi realizada a semeadura da bactéria e selecionadas 4 colônias, que apareceram depois de 24 horas em incubação a 37°C. Foram adicionadas essas 4 colônias em um tubo com caldo nutriente composto por Peptona de Gelatina e Extrato de carne (5ml), dessa solução, retirou-se 50 µl que foram acrescentadas à 5 ml de Botusemen ® sem antibiótico, totalizando 5.050 µl (figura 2).

Com a baixa concentração, foi utilizado os 10 µl da solução, acrescidos a 10 ml de solução PBS (Tampão fosfato-salino). Retirou-se 10 µl acrescentados à um ml de Botusemen®, totalizando 1.010 µl. As solução foram mantidas em 24 e 48 horas na estufa.O experimento foi realizado em triplicata.

As concentrações definidas de AgNPS (figura 2) foram: 42,8 µg (10%), 21,4 µl (5%), 10,7 µl (2,5%), 5,3 µl (1%), 2,6 µl (0,6%), 1,33 µl (0,3%) e 0,66 µl (0,1%).

Na concentração de 42,8 µl foi adicionada a bactéria *S. aureus*, 400 µl de Botusemen sem antibiótico, 400 µl de caldo nutriente, 800 µl de AgNP, totalizando 1.600 µl de solução. Nas concentrações restantes (21,4 – 10,7 – 5,3 – 2,6 – 1,33 e 0,66µl), foi adicionado apenas 400 µl de *S. aureus* + Botusemen e 400 µl de caldo nutriente, sem adição de AgNP.

800 µl de AgNP foram adicionados apenas na maior concentração 42,8 µl, homogenizadas e transferidas para o próximo microtubo.

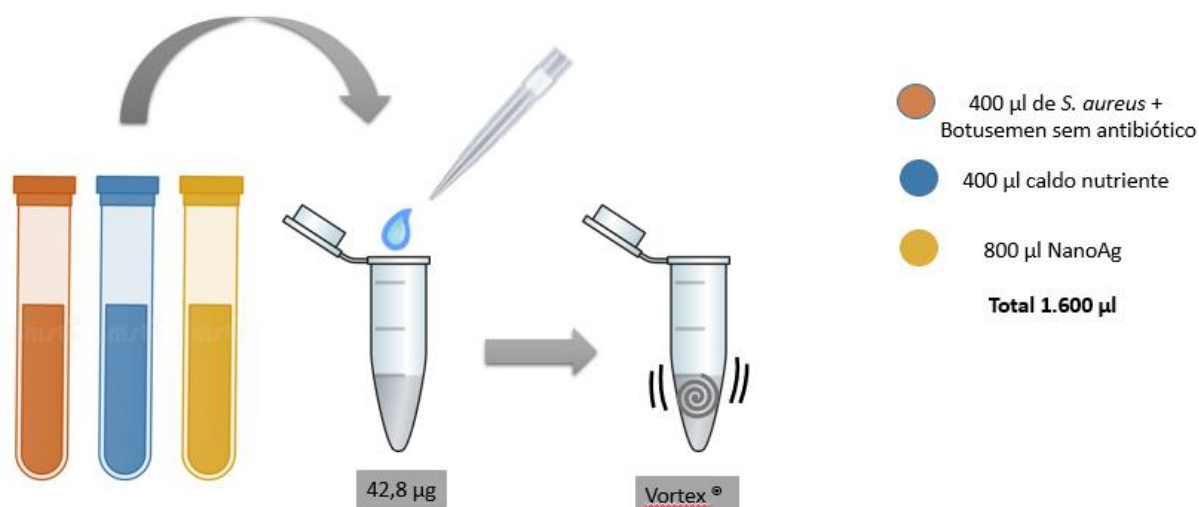


FIGURA 2-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE INCUBAÇÃO DAS BACTÉRIAS – PRIMEIRO PASSO. FONTE: ELABORADO PELA AUTORA.

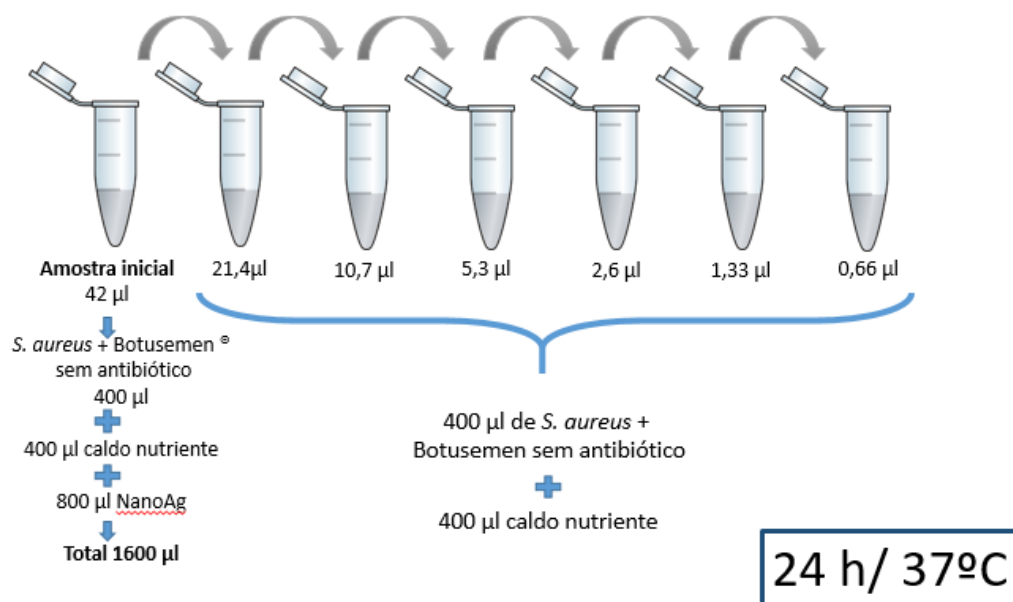


FIGURA 3-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE INCUBAÇÃO DAS BACTÉRIAS. FONTE: ELABORADA PELA AUTORA.

No grupo controle (GC) positivo, adicionou-se 400 µl de *S. aureus* ao Botusemen® com antibiótico e 400 µl de caldo nutriente, já no grupo controle negativo,

foi adicionado 400 µl de *S. aureus* ao Botusemen® sem antibiótico e 400 µl de caldo nutriente.

Depois de 24 horas na estufa, os microtubos foram adicionados em uma placa de petri vazia, com suas respectivas identificações, em seguida adicionou-se o ágar PCA, e as placas foram homogeneizadas (nesse teste, diluição e ágar homogeneizados juntos (por agitação circular, deixando-se solidificar e foram incubadas a 37 °C por 48 horas. O número de colônias formadas foi contado e os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Foram feitos os mesmos processos e análises com a bactéria *Pseudomonas spp.*

O número de colônias formadas foi contado e os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

As colônias, que apareceram depois de 24 horas em incubação foram selecionadas com base nas suas características morfológicas.

A contagem das UFC foi realizada com o auxílio de um contador de colônias manual (Tabela 1). Definindo-se os termos como:

- Colônias ausentes: placas sem crescimento macroscópico de colônias;
- Colônias contáveis: placa com crescimento ≤ 300 a colônias, que fossem contáveis macroscopicamente;
- Colônias incontáveis: placa com crescimento macroscópico ≥ 300 colônias.

3 RESULTADOS

De acordo com a Tabela 1, na bactéria *S. aureus*, a concentração inibitória foi de 21,4 µg, já na bactéria *Pseudomona spp*, a concentração inibitória mínima foi de 5,35 µl.

Foram testadas também as AgNP diluídas em PBS. A Tabela 2 nos mostra os resultados:

TABELA 1-RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS – CONTAGEM DE COLÔNIA DAS BACTÉRIAS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *PSEUDOMONAS SPP*

<i>S. aureus</i>		<i>Pseudomonas spp</i>	
Concentrações (µl)	Contagem (UFC/ml)	Concentrações (µl)	Contagem (UFC/ml)
GC –	Incontáveis	C – (sem antibiótico)	Incontáveis
GC +	Ausente	C + (com antibiótico)	Ausente
0,66	72	0,66	220
1,33	Incontáveis	1,33	40
2,67	Incontáveis	2,67	107
5,35	Incontáveis	5,35	Ausente
10,7	65	10,7	Ausente
21,4	Ausente	21,4	Ausente
42,8	Ausente	42,8	Ausente

GC = Grupo Controle

TABELA 2-RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DA AGNP DILUÍDA EM PBS

<i>Pseudomonas</i> (µl)	<i>S. aureus</i> (µl)
GC – (sem antibiótico): Incontáveis	GC – (sem antibiótico): Incontáveis
GC + (com antibiótico): Ausente	GC + (com antibiótico): Ausente
0,66: 220 colônias	0,66: 155 colônias
1,33: 122	1,33: 87
2,67: 74	2,67: 60
5,35: 53	5,35: 52
10,7: Ausente	10,7: 41
21,4: Ausente	21,4: Ausente
42,8: Ausente	42,8: Ausente

Como resultado, seguem as concentrações de AgNP diluída em água destilada:

- *S. aureus*: **21,4 µl**
- *Pseudomonas*: **5,35 µl**

Concentração da AgNP diluída em meio PBS:

- *S. aureus*: **21,4 µl**
- *Pseudomonas*: **10,7 µl**

4. DISCUSSÃO

Existem vários mecanismos de ação associados às nanopartícula de prata, dependendo de fatores como tamanho, recobrimento e forma da NPAg. Elas também podem formar aglomerados, afetando a capacidade de inibir a atividade microbiana por este composto. Este processo causa o aumento de tamanho das nanopartículas e faz com que liberem menos íons, influenciando o grau de inibição gerado por ela (DURAN et al., 2019).

Um dos mecanismos é relacionado ao tamanho de NPAg, que pode aderir a membrana celular, alterando a permeabilidade desta ou atravessando a membrana, desarranjando os demais sistemas bacterianos.

Desde que existente na superfície da bactéria, a nanopartícula pode tanto entrar na bactéria através dos poros presentes na sua superfície ou sofrer endocitose e ser incorporada na bactéria. Em ambos casos, foi demonstrado que a prata interage com compostos que contém enxofre e fósforo, como o DNA, conseguindo danificá-lo e impedindo que a bactéria se reproduza de forma apropriada, sendo capaz de gerar morte bacteriana (DOS SANTOS, 2012).

As nanopartículas de prata podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, que gera estimulação do mecanismo antioxidante celular, danificando o DNA e induzindo a morte celular sem danos à membrana. Também são capazes de danificar as trocas que ocorrem na mitocôndria, produzindo acúmulo intracelular de radicais livres e dissipação da força motriz dos prótons para a geração de ATP. Assim, nota-se que ainda há muita dúvida quanto à forma de ação da nanopartícula, havendo vários mecanismos propostos. Contudo, o que parece mais aceito são os estudos que apontam para a produção de espécies reativas de oxigênio (DURAN et al., 2019).

As nanopartículas de prata foram capazes de inativar o crescimento das bactérias, nas concentrações de 21,4 µl (*S. aureus*), 5,35 µl (*Pseudomonas* – AGNP em água destilada) e 10,7 µl (*Pseudomonas*- AGNP em PBS).

Houve pequena variação na concentração da AgNP diluída em água destilada quando compara ao meio PBS. Pode-se concluir que a AgNP teve efeito microbiano satisfatório quando adicionada à cultura de bactérias.

As nanopartículas de prata apresentaram efeito antimicrobiano sobre os isolados de *Staphylococcus Aureus* e *Pseudomonas spp* testados. Assim, foi possível determinar a concentração e o tamanho das nanopartículas neste estudo.

5. CONCLUSÕES

As nanopartículas de prata foram capazes de inativar o crescimento das bactérias, nas concentrações de 21,4 µl (*S. aureus*), 5,35 µl (*Pseudomonas* – AGNP em água destilada) e 10,7 µl (*Pseudomonas*- AGNP em PBS).

Mais estudos são necessários para verificar a concentração ideal que cause a inativação do crescimento bacteriano, e que não interfira no potencial fertilizante dos espermatozoides.

Novos ensaios devem ser realizados para aprimorar a ação das nanopartículas de prata, combinando-as com outros compostos para que, além das mesmas exibirem ação antibiofilme, possam apresentar potencial antimicrobiano e sejam tóxicas aos espermatozoides.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.S; BARROS,C .H.S.C; MACHADO,W.M , ALLAMAN, I.B ,BARBOSA, L.P; P.P.N, SNOECK. Effect of docosahexaenoic acid and Trolox® in extenders for cooling semen from Mangalarga Marchador stallion. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, n.1, p.71-78, 2020.

ALENCAR, M.S.M; BOCHNER, R; DIAS, M.F.F; ANTUNES, A.M.S. Análise da produção científica brasileira sobre nanotecnologia e saúde. **Revista Eletronica de Comunicação Informação e Inovação em Saúde**. 2017 jan.-mar.; 11(1)

BAZZANO, M; LAUS,F; SPATERNA, A; MARCHEGIANI, A. Use of nutraceuticals in the stallion: Effects on semen quality and preservation. **Reproduction in Domestic Animals**. 2021;00:1–7.

BRAGA N.B., PIRES L.C.S.R., OLIVEIRA H.P. & COSTA M.M. **Antimicrobial and antibiofilm activity of silver nanoparticles against *Aeromonas* spp. isolated from aquatic organisms.** Pesquisa Veterinária Brasileira 38(2):244-249. Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, 2018.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 3ª ed. Belo horizonte: CBRA, 2013.

DA SILVA L. T, MAIA, M.S , AQUINO, J.J..M , CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA,C.E.B. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. **ENCONTRO ANUAL DA BIOFÍSICA (2017):** 22-25. BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA, BIOCÊNCIAS, UFPE 9 E 10 DE MARÇO, RECIFE, PERNAMBUCO, BRASIL .

DE OLIVEIRA, R. A, SCARLET, D, ILLE, N, & AURICH, C. Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation. **Theriogenology**, 89, 289–294, 2017.

DOS SANTOS,C.A; JOZALA,A.F; JUNIOR,A.P; SECKLER,M.M. Antimicrobial effectiveness of silver nanoparticles co-stabilized by the bioactive copolymer pluronic F68.**Journal of nanobiotechnology**. 2012.

FERREIRA, C.S; LADEIRA, L.O; LEITE, C.F; FONSECA, F.G; RIBEIRO, E.M.C; VERSIANI, A.F; SILVA, J.F.S; MAGALHÃES, C.L.B; SILVA, B.M. Uso de nanobastões de ouro para o desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. **Química Nova**, Vol. 40, No. 5, 594-601, 2017.

DURÁN, N; ROLIMB, W.R; DURÁN, M; FÁVAROA, W.J; SEABRAB, A.B. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, Vol. 42, No. 2, 206-213, 2019.

MAZIERO J.S. ROGERO S.O, ALEMANY A. Ecotoxicological study of silver nanoparticle on *Daphnia similis*. **Journal of the Health Sciences Institute**. 2016;34(3):133-9

MORAN D.M, JASKO D.J, SQUIRES E.L, AMANN R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.

FELICIO, L.C.S; PEREIRA, J.F.S; ANTONIUK, L; MARIA,V.J; BUCH, L.R. Fertilidade de éguas durante a estação de monta 2016/2017 inseminadas com sêmen refrigerado e congelado no hospital veterinário da universidade tuiuti do paraná. **Revista Eletrônica Biociências**, Biotecnologia e Saúde, Curitiba, n. 18, maio-ago. 2017.

NEUHAUSER, S., GÖSELE, P., & HANDLER, J. (2018). O efeito de quatro diluentes de sêmen comerciais diferentes na motilidade do esperma epididimário do garanhão. **Journal of Equine Veterinary Science**, 62, 8-12.

SILVA, Y.F.R.S. Efeito da pentoxifilina na função testicular e produção espermática de equinos submetidos a estresse térmico escrotal. Yamê Fabres Robaina Sancler Silva. - Botucatu, 2017