



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

DANIEL VASCONCELOS DA SILVA

**POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA MICROALGA *Arthrospira platensis* NA
CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE *Prochilodus brevis* (Actinopterygii)**

FORTALEZA

2024

DANIEL VASCONCELOS DA SILVA

POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA MICROALGA *Arthrospira platensis* NA
CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE *Prochilodus brevis* (Actinopterygii)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Orientador(a): Prof. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley.

Coorientador(a): Prof. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579p Silva, Daniel Vasconcelos da.
Polissacarídeos extraídos da microalga *Arthrospira platensis* na congelação de sêmen de *Prochilodus brevis* (actinopterygii) / Daniel Vasconcelos da Silva. – 2024.
54 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley.

Coorientação: Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante.

1. Aquicultura. 2. Fitoplâncton. 3. Criopreservação. 4. Reprodução. I. Título.

CDD 639.2

DANIEL VASCONCELOS DA SILVA

POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA MICROALGA *Arthrospira platensis* NA
CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE *Prochilodus brevis* (Actinopterygii)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 28 / 05 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Carmina Sandra Brito Salmito Vanderley (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Luiz da Silva Apoliano
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A Deus

À minha mãe Leila e minha esposa Thais

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Imensamente à minha orientadora, Profa. Dra. Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley, pela oportunidade de aprendizado e por me acolher com seus preciosos conhecimentos, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e defini-la como uma mentora inspiradora é uma justa homenagem. À minha coorientadora, Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante, por sua contribuição como mentora dedicada desde o início da minha graduação até hoje. A sua orientação constante e o apoio inabalável foram fundamentais para me encorajar a iniciar e concluir o mestrado. Suas palavras de incentivo e confiança foram de extrema importância em momentos de dúvida e dificuldade.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Rodrigo Maggioni e Prof. Dr. Marcos Luiz da Silva Apoliano, pelas contribuições inestimáveis e sugestões que enriqueceram significativamente este trabalho. Ao Laboratório de Bioquímica Marinha (DEP/UFC), em especial à Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo e Dr. José Ariévilo Gurgel Rodrigues, pela parceria e colaboração no presente trabalho.

À minha mãe Leila Villian Vasconcelos da Silva, a qual me forneceu todo amor e carinho necessários hoje e sempre. Da mesma forma, expressei minha gratidão ao meu irmão, David Vasconcelos da Silva, que desempenhou um papel paterno desde minha infância até a vida adulta. À minha companheira Thais Alves Pinheiro Soares que é minha base e porto seguro para enfrentar os dias de trabalho cansativos, além de motivação a sempre buscar mais conhecimento. E nossas Pet's adotadas, Léia e Lyla, que são fontes de amor e carinho incondicional.

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), com os quais compartilhei pouco tempo, porém, cujo apoio foi fundamental em cada etapa da realização deste trabalho, seja por meio de orientações essenciais ou valiosos conselhos para o avanço das pesquisas. Aos amigos do Laboratório de Planctologia, Danilo, Brasil, Daniel, Rodrigo, Egídia e aos demais companheiros que compõem esse grupo que considero de grande valor.

Aos colaboradores Senhor Cesar, Cleiton e Eugênio que sempre estiveram me ajudando ativamente na execução ou desenvolvendo soluções para as eventuais desventuras dos trabalhos. Ao moto clube ABUTRE'S Raça em Extinção, que são sempre exemplos de fibra, fraternidade e irmandade.

“O senhor é meu pastor e nada me faltará”
(SALMOS 23:1).

RESUMO

A aquicultura é um dos setores de produção animal que mais crescem no Brasil e no mundo, com destaque para a piscicultura continental, devido aos avanços biotecnológicos ligados à reprodução das espécies nativas. Dentre elas, a criopreservação preservação seminal é uma técnica que possibilita o intercâmbio genético e preservação de espécies. Entretanto, o uso dessa metodologia pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e diminuir os antioxidantes naturais do sêmen devido à diluição do meio natural em meio artificial. Em alternativa, propõem a adição de polissacarídeos sulfatados (PS) ao meio diluente, pois possuem diversas propriedades biológicas, são reconhecidos por suas funções benéficas, incluindo atividade antioxidante. Esse trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho da utilização de polissacarídeos sulfatados da microalga *Arthrospira platensis* em diferentes concentrações adicionadas ao meio de congelamento de sêmen de *Prochilodus brevis*. Os tratamentos foram diluídos na proporção 1:4 (sêmen: diluidor), congelados em solução de glicose a 5% com dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e foram adicionadas diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos de *A. platensis*, sendo T1 (controle zero sem adição de polissacarídeo), T2 (1,0 mg.mL⁻¹), T3 (2,0 mg.mL⁻¹) e T4 (3,0 mg.mL⁻¹). Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguidos do teste de Tukey para comparação pareada das médias, adotando um nível de significância de 5%. A motilidade total dos tratamentos apresentou médias estatisticamente iguais, com média geral de 24,3 ± 0,59%. Na velocidade curvilinear (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) não houve diferença estatística entre os tratamentos. Quanto a morfologia os resultados também foram similares, porém com baixa porcentagem de espermatozoides normais, variando de 8,04 a 10,42% de normalidade espermática. No parâmetro integridade do DNA não houve diferenças entre os tratamentos (T3 -84,53±6,98%; T2 - 79,92±2,78%; T1 - 79,60±5,21% e T4 - 78,93±4,2%). Para avaliação da integridade de membrana plasmática os valores de média de T3 (77,03 ± 7,66%) e de T1 (75,83 ± 5,93%) foram superiores a T2 (60,23 ± 5,62%) e T4 (60,27 ± 7,16%). Para taxa de fertilização o tratamento T4 (34,99 ± 2,82%) foi superior a T1 (29,50 ± 7,70%) e T2 (13,72 ± 0,54%) (P>0,05). Logo, os tratamentos adicionados de polissacarídeos sulfatados obtiveram sucesso na preservação do sêmen, sendo o T4 o mais recomendado.

Palavras-chave: aquicultura; fitoplâncton; criopreservação; reprodução

ABSTRACT

Aquaculture is one of the fastest growing animal production sectors in Brazil and the world, with emphasis on continental fish farming, due to biotechnological advances linked to the reproduction of native species. Among them, seminal preservation cryopreservation is a technique that enables genetic exchange and species preservation. However, the use of this methodology can increase the production of reactive oxygen species and reduce the natural antioxidants in semen due to the dilution of the natural medium in an artificial medium. Alternatively, they propose the addition of sulfated polysaccharides (PS) to the diluent medium, as they have several biological properties and are recognized for their beneficial functions, including antioxidant activity. This work aims to evaluate the performance of using sulfated polysaccharides from the microalgae *Arthrospira platensis* in different concentrations added to the *Prochilodus brevis* semen freezing medium. The treatments were diluted in a 1:4 ratio (semen: extender), frozen in a 5% glucose solution with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and different concentrations of sulfated polysaccharides (PS) extracted from *A. platensis* were added, being T1 (zero control without addition of polysaccharide), T2 (1.0 mg.mL⁻¹), T3 (2.0 mg.mL⁻¹) and T4 (3.0 mg.mL⁻¹). The results were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by The total motility of the treatments presented statistically equal means, with an overall average of $24.3 \pm 0.59\%$. In curvilinear speed (VCL), straight line speed (VSL) and average travel speed (VAP) there was no statistical difference between treatments. Regarding morphology, the results were also similar, but with a low percentage of normal sperm, ranging from 8.04 to 10.42% of sperm normality. In the DNA integrity parameter, there were no differences between treatments (T3 - $84.53 \pm 6.98\%$; T2 - $79.92 \pm 2.78\%$; T1 - $79.60 \pm 5.21\%$ and T4 - $78.93 \pm 4.2\%$). To assess plasma membrane integrity, mean T3 ($77.03 \pm 7.66\%$) and T1 ($75.83 \pm 5.93\%$) values were higher than T2 ($60.23 \pm 5.62\%$) and T4 ($60.27 \pm 7.16\%$). For fertilization rate, T4 treatment ($34.99 \pm 2.82\%$) was superior to T1 ($29.50 \pm 7.70\%$) and T2 ($13.72 \pm 0.54\%$) ($P > 0.05$). Therefore, treatments containing sulfated polysaccharides were successful in preserving semen, with T4 being the most recommended.wed by the Tukey test for paired comparison of means, adopting a significance level of 5%.

Keywords: aquaculture; phytoplankton; cryopreservation; reproduction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Exemplar de Curimatã (<i>Prochilodus brevis</i>).....	14
Figura 2 –	Microscopia da <i>Arthrospira platensis</i> ampliada em 40x.....	23
Figura 3 –	Coleta espermática com auxílio de uma seringa.....	25
Figura 4 –	Incubadoras.....	28
Figura 5 –	Biomassa seca de <i>Arthrospira platensis</i>	31
Figura 6 –	Infravermelho das 3 amostras de polissacarídeo de <i>Arthorpira platensis</i>	32
Figura 7 –	Fotos de microscopias retiradas do acompanhamento embrionário; A. Amostra do processo de clivagem; B. Formação de Blastômeros; C. Estágio de Blástula; D. estágio de Gástrula.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento experimental da adição ao meio diluente com polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	26
Tabela 2 – Rendimento de polissacarídeos sulfatados obtidos por meio das digestões de 15 g de biomassa da microalga <i>Arthrospira platensis</i> divididas em 3 extrações de 5 g cada.....	31
Tabela 3 – Caracterização do polissacarídeo segundo a espectrofotometria FTIR.....	32
Tabela 4 – Motilidade total, velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) dos espermatozoides de <i>P. brevis</i> , congelados em meio diluidor com diferentes concentrações de PS da microalga marinha <i>A. plantensis</i>	34
Tabela 5 – Morfologia, integridade de DNA e Integridade de membrana plasmática do espermatozoide de <i>Prochilodus brevis</i> , após congelação seminal em meio diluidor com diferentes concentrações de polissacarídeos de <i>A. platensis</i>	37
Tabela 6 – Oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C), pH, amônia (NH ₃), nitrito (NO ₂), cloro (Cl) e dureza total (DT) da água utilizada para incubação de embriões de <i>P. brevis</i>	38
Tabela 7 – Taxa de fertilização com sêmen de curimatã (<i>Prochilodus brevis</i>) submetidos a congelação em meio diluidor suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , após 20 dias de armazenamento (n = 2) e do sêmen fresco.....	40
Tabela 8 – Comparação das taxas de fertilização feita apenas entre os tratamentos utilizando sêmen de curimatã (<i>Prochilodus brevis</i>) após passarem por processo de congelamento em meio contendo diluente e protetor térmico, nas diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados da microalga <i>Arthrospira platensis</i> (0; 1 e 3 mg.mL), avaliadas após 20 dias de armazenamento.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	Aquicultura de peixes nacionais.....	13
2.2	Características gerais da espécie e da reprodução.....	14
2.3	Congelação seminal.....	15
2.4	Antioxidantes na criopreservação seminal.....	17
2.5	Polissacarídeos sulfatados.....	18
2.6	<i>Spirulina (Arthrospira platensis)</i>	19
3	JUSTIFICATIVA.....	21
4	OBJETIVOS.....	22
4.1	Objetivo geral.....	22
4.2	Objetivos específicos.....	22
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5.1	Local de trabalho.....	23
5.2	Produção da biomassa de <i>A. platensis</i>	23
5.3	Extração e caracterização dos polissacarídeos sulfatados (PS)	24
5.4	Animais experimentais e coleta seminal.....	24
5.5	Formação dos tratamentos e congelação seminal.....	25
5.6	Análise espermática.....	26
5.7	Fertilização.....	27
5.8	Acompanhamento do desenvolvimento embrionário.....	28
5.9	Análises estatísticas.....	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
6.1	Produção da biomassa de <i>A. platensis</i>	30
6.2	Extração de polissacarídeos.....	30
6.3	Caracterização dos polissacarídeos sulfatados por infravermelho.....	31
6.4	Análise espermática.....	34
6.5	Fertilização e desenvolvimento embrionário.....	38
7	CONCLUSÃO.....	42
8	PERSPECTIVAS.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A curimatã comum (*Prochilodus brevis*) é uma espécie de peixe endêmica das bacias hidrográficas brasileiras. É considerada uma espécie importante para a pesca de subsistência principalmente na região norte do país (SILVA *et al.*, 2005). Apesar de possuir importância ecológica, social e econômica é uma espécie pouco estudada, pouco difundida na piscicultura brasileira e ainda sofre com a pressão da pesca predatória mesmo em período de defeso (COSTA *et al.*, 2016). As fêmeas de curimatãs são mais procuradas pois no seu período reprodutivo seus ovos são considerados uma ótima iguaria (BOMFIM *et al.*, 2015). A perda da biodiversidade dessas áreas pode ser amortizada com técnicas de povoamento, fiscalização e a preservação da genética da espécie por meio de técnicas reprodutivas.

A congelação de sêmen é uma estratégia tecnológica de grande interesse para a aquicultura. Esta técnica visa a preservação do material genético em nitrogênio líquido a -196 °C. Temperatura na qual as estruturas e funcionalidades das células e tecidos vivos são preservadas, mantendo-as geneticamente viáveis e reversivelmente inativas do ponto de vista metabólico (PEGG, 2007). Entretanto a congelação seminal expõe às células espermáticas a potenciais injúrias, isso porque as baixas temperaturas adotadas promovem a formação de cristais de gelo extra e intracelular, que podem ocasionar danos irreversíveis à estrutura e função dos gametas (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012), além da maior formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar estresse oxidativo e gerar alterações patológicas na membrana plasmática e na integridade do DNA espermático (LOPES; SALMITO-VANDERLEY; ALMEIDA-MONTEIRO, 2016).

Logo, a busca por melhorias no processo de preservação seminal leva a implementação da adição de agentes com ação antioxidante. Dentre eles estão os polissacarídeos sulfatados (PS), que são um grupo de macromoléculas com grande diversidade de aplicabilidades, onde suas propriedades biológicas estão ligadas à sua distribuição dos grupos sulfatados na molécula, podendo ser usados como antioxidante combatendo radicais livres (JRIDI *et al.*, 2019). Os PS podem ser extraídos de uma grande variedade de organismos presentes na natureza, tais como nas bactérias, fungos, algas, vegetais e animais (BEZERRA NETO *et al.*, 2008; VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015), mas dentre eles se destacam as microalgas marinhas. Pesquisas mostram o elevado potencial nutricional e a produção de compostos bioativos das microalgas que podem ser encontradas em ambientes aquáticos continentais, costeiros e marinhos (BICUDO; MENEZES, 2010).

A Spirulina (*Arthrospira platensis*) é uma microalga marinha que se destaca pela sua elevada produção de proteína, compostos bioativos como luteína, β -caroteno, ficobiliproteínas e ficocianina, que podem possuir propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, anti-inflamatórias, antialérgicas e até anticancerígenas (LEE *et al.*, 2001). Os polissacarídeos sulfatados de origem marinha foram pouco explorados quando levamos em conta sua grande diversidade estrutural podendo ser fonte de diversos compostos químicos e formulação de novas drogas terapêuticas (WANG; WANG; GUAN, 2012; DE MORAIS *et al.*, 2015).

Dessa forma, dentre a variedade de moléculas bioativas presentes na microalga *A. platensis* destacam-se seus compostos fenólicos, que possuem comprovada atividade antioxidante pela doação de elétrons (MACHADO *et al.*, 2017). Apesar dos esforços em pesquisas sobre suplementação do meio de congelamento seminal de peixes, observa-se que a ação dos compostos antioxidantes é espécie-específica. Diante disso, visando aperfeiçoar os protocolos já existentes de congelamento seminal, esta pesquisa tem por objetivo avaliar os efeitos da suplementação do meio de congelamento seminal de *P. brevis* com polissacarídeos sulfatados da microalga marinha *A. platensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aquicultura de Peixes Nacionais

Para amortizar problemas advindos da seca nos anos de 1998 a 2004 no Nordeste brasileiro, foi implementada a construção de açudes artificiais por organizações como o Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) que também usaram de técnicas como peixamento desses açudes para promover a produção de peixes para pesca de subsistência (GURGEL *et al.*, 1987; GURGEL E FERNANDO, 1994; REASER *et al.*, 2005). Alguns peixes exóticos tiveram desempenho zootécnico superior as espécies nativas dessas regiões, o que facilitou e incentivou a disseminação dessas espécies em bacias hidrográficas contribuindo para uma piscicultura cada vez mais forte. Em contrapartida um caso emblemático é o do tucunaré (*Cichla ocellaris*) e da tilápia (*Oreochromis niloticus*) em rios, lagos e açudes, o que pode ter resultado na perda de biodiversidade em escala regional (ROSA; GROTH, 2004).

Com o passar dos anos a aquicultura mundial cresceu mais rápido do que a pesca de captura entre os anos 2018 a 2020 e é esperado um aumento ainda maior na próxima década. Em 2020, a produção animal aquícola alcançou 87,5 milhões de toneladas, 6% a mais que em 2018. Já a produção da pesca por captura caiu para 90,3 milhões de toneladas, o que representa um decréscimo de 4,0% em relação à média registrada nos três anos anteriores (FAO, 2022).

Com o aumento do investimento em tecnologias na área da piscicultura possibilitou produção de diferentes tipos de peixes na aquicultura, sendo cultivados peixes de fácil manejo ou de peixes que possuem períodos migratórios e reprodutivos periódicos. Como exemplo a Curimatã comum (*P. brevis*), que habita normalmente áreas marginais dos açudes e com a chegada das cheias, em consequência do inverno, esta espécie nada em sentido contrário à correnteza em migração para a desova (SILVASUNDAR, 2001). Pesquisas como a do Centro de Pesquisa Rodolpho von Ihering do DNOCS de Pentecoste – CE possibilitaram a produção comercial de peixes como *Colossoma macropomum* e *Prochilodus brevis* por meio da técnica de hipofisacção com extrato hipofisário de carpa (EHC).

O desenvolvimento desses protocolos além de proporcionar a produção de peixes nacionais de grande valor agregado, possibilita uma parcial manutenção dos estoques pesqueiros desses indivíduos. O *Prochilodus brevis* (Figura 1), conhecido popularmente como curimatã comum é um exemplo de peixe de elevado valor comercial e que sofre com pesca

predatória principalmente durante seu período reprodutivo, onde seus ovos são uma iguaria regionalmente procurada (TEIXEIRA, 2009).

Atualmente os peixes nacionais, apesar dos avanços existentes, enfrentam outros desafios como o pouco melhoramento genético ao longo dos anos em comparação a outras espécies exógenas, que estão anos à frente em pesquisas e biotecnologias aplicadas a sua produção (MEFEE; CARROLL, 1994). Logo, a preservação das espécies nacionais também depende da conservação e melhoramento genético para que possam ter competitividade em meio as outras espécies.

Figura 1 – Exemplar de Curimatã (*Prochilodus brevis*)



Exemplar de Curimatã Comum

Fonte: Autor.

2.2 Características gerais da espécie e da reprodução

A curimatã comum (*P. brevis*) é um teleósteo pertencente a classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Prochilodontidae descrita por Castro e Vari (2003). Apesar de nativa da região nordeste, pode ser encontrada em partes da região Sul do Brasil (ROSA *et al.*, 2003; DOURADO, 1981). São indivíduos iliófagos, logo possuem hábito de se alimentarem de matéria orgânica e em seus primeiros estágios de pós larva se alimentam de plânctons (DOURADO, 1981; NUNES *et al.*, 2019).

A espécie costuma habitar zonas mais profundas dos corpos d'água e não apresentam comportamento territorialista, vivendo bem em cardume (ARAÚJO; GURGEL, 2002). Os indivíduos selvagens podem ultrapassar 30 cm e pesar mais de 400 g (GURGEL; VERANI; CHELLAPA, 2012), já exemplares produzidos em cativeiro tem apresentado um peso a baixo do esperado, quando se comparado com o indivíduo de ambiente natural, apesar do crescimento mais constante, tendo peso médio inferior a 200g e comprimento em torno de 20 cm (LEITE *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Além da grande importância ecológica e elevado potencial na produção comercial, a curimatã desempenha importante fator social pois é um importante alimento pescado por

comunidades que vivem da pesca de subsistência (COSTA *et al.*, 2016). A espécie também é conhecida e apreciada como uma iguaria regional pois sua ova é popularmente conhecida como “caviar do sertão”, tornando a espécie com um valor agregado ainda maior (BOMFIM *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2015).

Uma importante atuação ecológica da espécie é na metabolização de detritos orgânicos presentes no fundo dos reservatórios, reaproveitando os nutrientes presentes, sendo consequência do seu hábito alimentar que revolve o meio, e assim pode disponibilizar nutrientes que estavam decantados no fundo para a coluna d'água, evitando o acúmulo de compostos tóxicos para vida aquática. Logo a falta desses indivíduos pode significar um desequilíbrio no metabolismo do corpo hídrico e no ecossistema aquático (TAYLOR; FLECKER; HALL, 2006).

Na natureza a curimatã comum (*P. brevis*) necessita de estímulos físicos e ambientais relacionados com o processo nomeado de piracema. Fenômeno que se inicia no período chuvoso onde os indivíduos percorrem grandes distâncias contra a corrente dos rios, estimulando assim a maturação gonadal e consequentemente a desova (BALDISSEROTTO; GOMES, 2020). Onde o hipotálamo é ativado por fatores ambientais e químicos, produzindo hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH), esses hormônios atuam sobre a hipófise, sinalizando a produção e liberação de outras gonadotrofinas (GtH), que então agem diretamente sobre as gônadas (FILHO; WEINGARTNER, 2007). Já para ambientes controlados como na aquicultura, o estímulo ao hipotálamo não ocorre da maneira natural, sendo necessário a indução hormonal dos indivíduos. (ZANIBONI FILHO; WEINGARTNER, 2007). Sendo o extrato hipofisário de carpa (EHC) um dos indutores mais utilizados.

2.3 Congelação seminal

As técnicas de criopreservação de sêmen são amplamente utilizadas na piscicultura e em outros grupos animais, pois proporciona a consolidação de bancos genéticos de diferentes espécies (KOLYADA; OSIPOVA; BERBEROVA, 2023). Além disso, é uma importante ferramenta para o controle produtivo pois conserva o sêmen por longos períodos e possibilita a utilização racional da quantidade de sêmen necessários para a fertilização de ovócitos de fêmeas (BEIRÃO *et al.*, 2019; GODINHO, 2007).

A congelação seminal tem função de preservação do material genético por longos prazos, logo a sincronia reprodutiva com os machos e fêmeas não são necessárias, facilitando o processo de reprodução assistida. O método de congelação lento em nitrogênio líquido é a

forma mais utilizada, sendo possível a gradativa inativação do metabolismo das células de forma reversível (PEGG, 2007). A congelação espermática de peixes é um método bem difundido e já ministrado em diferentes espécies da ictiofauna marinha e dulcícola (GALLEGO *et al.*, 2017; XIN *et al.*, 2017; MAGNOTTI *et al.*, 2018; DEPINCÉ *et al.*, 2020).

Ainda assim, os desafios para o sucesso e melhoramento dessas técnicas são muitos, pois apesar de seus benefícios esses protocolos podem causar danos físicos irreversíveis às células, podem ter níveis de toxicidade para as células de interesse podendo reduzir a integridade plasmática, funções mitocondriais e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (XIN *et al.*, 2017; DEPINCÉ *et al.*, 2020; IBÁÑEZ-ARANCIBIA; FARÍAS; VALDEBENITO, 2020).

Deste modo, buscando o sucesso da técnica, se faz necessária a utilização de diluentes que fornecerão energia e crioprotetores que proporcionam retirada do excesso de água presente no interior da célula espermática e evita o risco por formação de cristais de gelo (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012). Os diluentes são normalmente ricos em sais carboidratos, fornecendo energia ao sêmen, e compõem parte componente do plasma seminal, aumentando o volume seminal permitindo a melhor manipulação das alíquotas. A escolha de um diluente deve seguir importantes características em conformidade com o meio como ser isotônico, ser estável, possuir elevada condutividade térmica, esterilidade e ser um bom transportador de crioprotetores (LEGENDRE; BILLARD, 1980).

A exemplo, existem diversos diluidores já testados em peixes, como o Beltsville Thawing Solution® (BTS), a água de coco em pó específica para peixes e a glicose (LEITE *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2017). Sendo a glicose um diluente de fácil acesso e que já foi amplamente aplicado em diferentes espécies de peixes como a *P. brevis* (NASCIMENTO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2016, ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Na criopreservação seminal existem dois tipos de crioprotetores, os de ação interna e externa. Os crioprotetores de ação intracelular são substâncias hidrossolúveis, de baixa toxicidade, onde alguma de suas funções é promover a saída da água intracelular para que não sejam formados cristais de gelo nas células e diminuir o ponto de congelamento, assim mantendo a viabilidade do sêmen (BUSTAMANTE-GONZÁLEZ *et al.*, 2019). Para a curimatã, como pertencente a ordem dos peixes Characiformes, pode ser utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, etilenoglicol, e metilglicol, geralmente a uma concentração de 10% (SALMITO VANDERLEY *et al.*, 2014). Já os crioprotetores de ação extracelular atuam na superfície celular atuando como estabilizadores, recobrando a

membrana plasmática e restituindo fosfolipídios que podem ser perdidos durante o choque térmico, a exemplo desses crioprotetores, são a gema de ovo e leite desnatado (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012).

É descrito na literatura segundo Nunes *et al.* (2016), Nascimento *et al.*, (2017) e Nunes *et al.* (2019) uma boa interação do meio formado por glicose 5% e do crioprotetor DMS 10% com o sêmen de curimatã comum, obtendo ótimos resultados pós-descongelação espermática e posterior fertilização.

Além disso, Almeida-Monteiro *et al.* (2017) demonstram a possibilidade da implementação de agentes antioxidantes que podem potencializar os bons resultados na técnica de congelamento seminal. Os agentes antioxidantes, como a vitamina C e polissacarídeos sulfatados, podem agir no aumento proteção da célula espermática pós congelamento.

2.4 Antioxidantes na criopreservação seminal

O sêmen como todo possui escassez de citoplasma em seu meio natural e por conta desse fator é facilmente afetado por fatores endógenos como o estresse oxidativo (SALEH; AGARWAL, 2002). Além disso, as células espermáticas possuem uma membrana plasmática formada por lipídios constituídos de ácidos graxos poli-insaturados que são susceptíveis a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a peroxidação lipídica (WATHES *et al.*, 2007).

A criopreservação pode elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuir os antioxidantes naturalmente dispostos no sêmen pois o meio natural é diluído no meio artificial, favorecendo o desequilíbrio entre agentes antioxidantes e oxidantes (BANSAL; BILASPURI, 2011). Podendo proporcionar um efeito tóxico ao comprometendo as funções celulares como à apoptose e redução da fertilidade (PURDY, 2006; TURRENS, 2003).

Esse desequilíbrio ocasionado com o acúmulo de radicais livre poderá levar ao stress oxidativo e por consequência a alterações patológicas chegando a afetar a estabilidade da membrana plasmática como também o DNA da célula (SOWINSKA *et al.*, 2013), por meio da captura de elétrons dessas organelas (COSTA; STREIT Jr., 2019).

Adicionalmente, a peroxidação lipídica representa uma das principais manifestações do dano oxidativo desencadeado pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), estando correlacionada à modificação da estrutura da membrana e à inativação de enzimas. Mas ainda carecem de uma compreensão precisa, com possibilidade de realização de estudos adicionais. (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004; LI *et al.*, 2010).

Os antioxidantes são substâncias que desempenham um papel crucial na regulação, remoção e inibição das espécies reativas de oxigênio (MANEESH; JAYALEKSHMI, 2006), impedindo, dessa forma, o início ou a propagação das reações oxidativas em cadeia (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Segundo Lopes *et al.* (2019), esses compostos apresentam um mecanismo de defesa que se divide em três etapas: prevenção, onde ocorre a supressão da formação de EROs; interceptação, atuando na pausando as reações da cadeia oxidativa impedindo a ação das EROs; e reparação, responsável por correções em resposta aos danos causados pelas EROs. Na etapa de reparação, é possível corrigir alguns danos específicos da célula. No entanto, é importante destacar que para os espermatozoides essa fase não exerce atividade efetiva, pois além se apresentarem em quantidade reduzida no citoplasma não possuem os componentes necessários para realizar esse processo de reparo (SIES., 1993).

Os mecanismos antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos. Os agentes enzimáticos são compostos por macromoléculas antioxidantes como a catalase, a glutatona e o superóxido dismutase, que tem capacidade de minimizar a oxidação formando produtos inativos (BARBOSA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; CAROCHO; FERREIRA, 2013). O sistema de defesa não enzimático é composto principalmente por antioxidantes provenientes de dietas, incluindo vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Também existem diversas substâncias com potencial antioxidante, tais como o ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (provitamina A), licopeno, luteína e zeaxantina. (BARBOSA *et al.*, 2010).

De acordo com Lopes, Salmito-Vanderley e Almeida-Monteiro (2016), a presença, quantidade e forma de atuação dos antioxidantes são específicas para cada espécie, podendo variar conforme o manejo da coleta seminal e a dieta alimentar dos animais. No entanto, esse é um aspecto pouco explorado e ainda não se tem informações sobre a distribuição de antioxidantes naturais no sêmen de *P. brevis*. Dessa forma, ainda se verifica a necessidade de aprimoração de protocolos já existentes para a congelação seminal de peixes, principalmente relacionados ao uso de compostos antioxidantes, com o objetivo de manter a qualidade espermática pós-descongelação e obtenção de melhores taxas de fertilização. Dentre esses compostos estão os polissacarídeos sulfatados.

2.5 Polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados são compostos poliméricos compostos por unidades

de açúcares que possuem carga negativa devido à presença de radicais sulfatos (HUANG *et al.*, 2019). Isso possibilita sua ligação a uma variedade de proteínas presentes no organismo, como a matriz extracelular e o plasma sanguíneo. Esses polissacarídeos podem ser classificados como homopolissacarídeos, quando possuem uma única cadeia monomérica, ou como heteropolissacarídeos, quando possuem duas ou mais cadeias. Essa característica estrutural é responsável pela diversidade de atividades biológicas apresentadas por essas moléculas bioativas, incluindo propriedades antioxidantes (ANAND *et al.*, 2016). Esses polímeros podem ser encontrados em animais, algas, bactérias (MOURÃO; PEREIRA, 1999; SOUSA *et al.*, 2016).

Os polissacarídeos sulfatados são reconhecidos por exibirem uma ampla gama de propriedades biológicas nos organismos vivos, incluindo atividade anticoagulante, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante (SEEDEVI *et al.*, 2017; CHAN *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2020; PONCE *et al.*, 2003; SYNYTSYA *et al.*, 2010). Segundo Jridi *et al.* (2019) esses compostos são caracterizados por seus radicais sulfatos que atuam na redução doando elétrons, até mesmo podendo se ligar externamente a célula podendo formar proteoglicanos (MOURÃO; PEREIRA, 1999; SOUSA *et al.*, 2016).

Essas moléculas podem variar em sua composição e nas características de suas cadeias ramificadas, dependendo da fonte de onde são isoladas. Os compostos podem exibir diferentes formas e estruturas químicas em diferentes fontes, uma vez que o número e a estrutura dos polímeros podem variar de acordo com a fonte específica. (CHEVOLOT *et al.*, 2001; PERCIVAL, 1979).

Os polissacarídeos presentes em microalgas podem ser armazenados como material de reserva. E geralmente, esses polissacarídeos são compostos principalmente por glucose além de possuem polissacarídeos estruturais, que exibem uma variedade de padrões estruturais de ligações glicosídicas, ramificações e composição monossacarídicas (SPOLAORE, 2006).

A maior parte dos polissacarídeos que podem ser encontrados em microrganismos marinhos são heteropolissacarídeos. Os monossacarídeos mais comumente encontrados são a glucose, galactose e manose, podendo apresentar grupos sulfato em sua estrutura. Além disso, estas macromoléculas possuem uma ampla composição química e características estruturais que ainda foram pouco estudadas (RAPOSO; DE MORAIS; DE MORAIS, 2013).

2.6 Spirulina (*Arthrospira platensis*)

A Spirulina (*Arthrospira platensis*) pertence à classe das Cyanophyceas, ordem

Oscillatoriales e família Microcoleaceae (GUIRY E GUIRY, 2019). As cianofíceas, também são reconhecidas como cianobactérias ou microalgas azuis e suas primeiras aparições podem ser datadas de 2,7 bilhões de anos atrás (Urback *et al.*, 1992; Buick, 1992; Brasier *et al.*, 2002).

As microalgas desempenham papel fundamental na produção de compostos de interesse na indústria farmacêutica e na alimentícia, até mesmo algumas espécies são encapsuladas para suplementação humana. Ademais estão diretamente ou indiretamente ligadas a aquicultura (Lourenço, 2006; Koyande, 2019). Muitos estudos aplicam a produção da biomassa de microalgas que possuem alto valor lipídico na produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007). Algumas das principais espécies de microalgas produzidas para o consumo humano são a Spirulina, Chlorella e Dunaliella por apresentarem ótimas composições nutricionais, a Spirulina pode chegar a ter 70% de proteínas e rica em aminoácidos essenciais (Wells, 2017).

A microalga *A. platensis* contém em sua biomassa funções, antibacterianas, anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Hosseini *et al.*, 2013) e por isso a biomassa seca tem sido implementada em massas e biscoitos (Rodríguez De Marco *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2017; Morais *et al.*, 2006), além de salgadinhos (Lucas *et al.*, 2017). Segundo Lucas *et al.* (2020) que na buscaram por enriquecer o alimento disponível nas escolas, implementaram de 2% e 6% de spirulina na composição de salgadinhos aumentando em 11,7% e 29,9% no seu teor de proteína, além disso, os autores revelam que essa implementação pode ser usada como corante natural para o produto.

Os polissacáridos sulfatados (PS) de Spirulina também já foram usados como anti-inflamatórios em ratos em com lesões pulmonares e o resultado obtido mostrou que, além da ação anti-inflamatória, os PSP auxiliaram em uma menor taxa de mortalidade (HAN, Xue *et al.*, 2022). Periyannan *et al.* (2019) descreveram que a composição monossacarídica dos PS extraídos da *A. platensis* é formada por glicose (24,5%), ramnose (19,1%), galactose (12,1%), fucose (2,4%), manose (8,5%) e xilose (33,4%). Vale ressaltar, que a forma com que a microalga é produzida pode afetar a quantificação de componentes ou seu rendimento pode ser afetado pelo método de extração dos PS.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de apresentar importância ecológica, social e econômica, a espécie *P. brevis* está suscetível ao declínio populacional em decorrência de fatores antrópicos, tais como a poluição, construção de barragens e a sobrepesca durante o seu período reprodutivo. As fêmeas da espécie são o alvo da pesca predatória e têm sua ova retirada para comercialização local, sendo uma iguaria bastante apreciada na gastronomia popular. Essa prática dificulta a reprodução natural da espécie e causa prejuízo ecológico sobre as populações.

Nesse contexto, o cultivo da espécie visa suprir a demanda do mercado e reduzir a sobrepesca dos estoques naturais. Avanços em biotécnicas reprodutivas são necessários para produção artificial do curimatã comum, dentre elas destacam-se a congelação seminal. Essa técnica permite a manutenção de apenas fêmeas em confinamento, otimizando a produção de sua ova, uma vez que os espermatozoides estariam armazenados em nitrogênio líquido por tempo indeterminado, até que sua utilização seja necessária para fertilização. Entretanto, a exposição espermática a ação das baixas temperaturas pode promover danos celulares irreversíveis aos gametas.

Dessa forma, busca-se aprimorar os protocolos de congelação seminal já existentes para a curimatã comum, na tentativa de melhorar a qualidade espermática do sêmen pós-descongelado. A suplementação do meio de congelação com compostos que possuem atividade antioxidante é uma abordagem recente e que apresenta bons resultados para criopreservação seminal de peixes. Dentre esses compostos, destacam-se os polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas. Essas biomoléculas não apresentam toxicidade e possuem inúmeras atividades biológicas, entre elas, capacidade antioxidante.

Nessa perspectiva, a microalga *Spirulina (A. platensis)* possui uma elevada produção de compostos bioativos, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos, que possuem comprovada atividade antioxidante pela doação de elétrons. Apesar dos esforços em pesquisas sobre suplementação do meio de congelação seminal de peixes, observa-se que a ação dos compostos antioxidantes é espécie-específica.

Dessa forma, esse trabalho justifica-se pela necessidade de aperfeiçoar os protocolos de congelação seminal já existentes de *P. brevis*, testando pela primeira vez a adição de polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *A. platensis* no meio de congelação seminal da espécie e, assim, potencializar a viabilidade celular espermática após a congelação seminal, bem como manter a sua capacidade de fertilização.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da utilização de polissacarídeos sulfatados da microalga *Arthrospira platensis* adicionadas a meio de congelação de sêmen de *Prochilodus brevis*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Produção e rendimento da biomassa de *Arthrospira platensis* cultivada em tanques de ferrocimento.
2. Extração e caracterização dos polissacarídeos sulfatados de *Arthrospira platensis* produzida em tanques de ferrocimento.
3. Verificar os efeitos da adição de polissacarídeos sulfatados da *Arthrospira platensis* no meio de congelação seminal de *Prochilodus brevis*.
4. Avaliar o poder fecundante do sêmen pós-congelação em meio diluidor acrescido de polissacarídeos sulfatados, por meio de fertilização a seco.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local de Trabalho

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Reprodução de Peixes, Av. Silas Munguba, 1700 – Itaperi, Fortaleza – CE. Para obtenção dos gametas foram utilizados reprodutores de *P. brevis* do plantel mantido nas instalações do referido laboratório, para a produção, coleta e extração dos polissacarídeos sulfatados da microalga *A. platensis* foi realizada no Centro de biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA), do Departamento de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n – Pici, Fortaleza – CE.

5.2 Produção da Biomassa de *A. platensis*

A biomassa foi obtida por meio de um cultivo contínuo de *A. platensis* (Figura 2) em tanque circular de ferrocimento com volume útil de 6,0 m³ contendo água enriquecida com ureia (0,1 g/L) e superfosfato triplo (0,01 g/L), segundo meio Venkataraman modificado (VENKATESAN; MANIVASAGAN; KIM, 2015). Durante todo o cultivo os valores de pH e Salinidade (ppt) foram mantidos próximos a 10, sendo corrigidos com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e cloreto de sódio (NaCl) quando necessário. O cultivo foi monitorado por espectrofotometria a 680 nm e ao atingir absorbância média de 0.800 a biomassa foi coletada por filtração em malha de 60 µm, pesada, lavada com água destilada e desidratada em estufa sob circulação de ar à 45°C por 4 h.

Figura 2 - Microscopia da *A. platensis* ampliada em 40x.



Fonte: Autor.

5.3 Extração e caracterização dos polissacarídeos sulfatados (PS)

A extração dos polissacarídeos foi realizada no Laboratório de Bioquímica Marinha com base na metodologia descrita por Faria *et al.* (2000). Resumidamente, uma amostra de 5 g da microalga foi suspensa em 100 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), contendo 510 mg de papaína, 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína, e incubada a 60 °C por 24 h. Em seguida, a mistura de incubação foi filtrada e o sobrenadante coletado e armazenado. Os polissacarídeos sulfatados presentes na solução foram precipitados com 16 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio a 10% em temperatura ambiente por 24 horas. A mistura então irá centrifugada (9.560 x g, por 20 min) e o precipitado contendo os PS foi lavado com 100 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio a 0,05 %, dissolvido em 100 mL de solução de NaCl:etanol 2M (100:15, v/v) e precipitado por 24 h a 4 °C com 100 mL de etanol comercial. Em seguida, o precipitado obtido foi centrifugado (9560 x g, por 20 min), lavado por duas vezes com 100 mL de etanol 80% e uma vez com o mesmo volume de etanol comercial. Por fim, os polissacarídeos sulfatados foram secos em estufa de secagem ao ar (60 °C, por 6 horas) e o rendimento foi expresso em porcentagem (%) da matéria desidratada, esse processo foi repetido três vezes sendo utilizado o mesmo material da primeira digestão. Os polissacarídeos obtidos da terceira extração foram utilizados para formação dos tratamentos de acordo com o design experimental. Posteriormente, com os polissacarídeos secos em estufa, foram submetidos à espectrofotometria FTIR (IRPRESTIGE-21, Shimadzu) em pastilhas KBr em faixa de operação 400- 4000 cm^{-1} , 64 scans, resolução 4.0. Para caracterização de grupos funcionais que compõem a amostra de polissacarídeos.

5.4 Animais Experimentais e Coleta Seminal:

Para realização da pesquisa foram utilizadas matrizes do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP) mantidos em tanques de fibra de vidro com volume aproximado de 3,0 m³, alimentados diariamente duas vezes ao dia, a uma taxa de arraçoamento de 3% da biomassa estocada, com ração comercial de 28-32% de proteína bruta (AQUAMIX PR - 800) e com sistema de aeração constante. Para o procedimento de coleta de sêmen foram selecionados 25 machos com peso médio de 146,57 $\pm$ 20,57g e divididos em três transfish's de 1,0 m³ para a posterior indução hormonal. Essa seleção foi realizada quanto a presença de características indicativas de maturidade reprodutiva, como papila urogenital hiperêmica e liberação seminal, em quantidade detectável, sob leve pressão abdominal

(Oliveria *et al.*, 2016).

Inicialmente os indivíduos foram induzidos hormonalmente a reprodução pela aplicação em dose única de Ovopel® (0,3 pélete kg^{-1} de biomassa) na base inferior da nadadeira peitoral em um ângulo de 45°. Após 8 horas da aplicação os animais foram sedados em solução de Eugenol (Sigma-Aldrich®), na proporção 1:10:10000 (Eugenol: álcool: água) até a perda do equilíbrio. Em seguida, o sêmen foi coletado por meio da massagem craniocaudal (Figura 3) com o auxílio de seringas de 3mL e armazenado em eppendorfs refrigerados a 4°C para posterior avaliação no Sistema de Análise Seminal Auxiliado por Computador (CASA), utilizando o software Sperm Class Analyser (SCA).

Figura 3 - Coleta espermática com auxílio de uma seringa



Fonte: Autor.

5.5 Formação dos Tratamentos e Congelação Seminal

As amostras foram analisadas quanto a sua motilidade espermática e as que obtiverem valores superiores a 85% foram utilizadas para formação de 5 *pools*, cada pool foi formado por alíquotas de 400 μL de sêmen de cinco machos.

Para a congelação seminal cada pool foi diluído na proporção 1:4 (sêmen: diluidor) e congelados em solução de glicose a 5% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Nesta solução crioprotetora foram adicionadas diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos de *A. platensis* (zero, 1, 2 e 3 mg mL^{-1})(Tabela 1). Posteriormente, as amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL, resfriadas à 10 °C por 10 minutos para alcançar o tempo de equilíbrio. Em seguida, as palhetas foram alocadas no *dry-*

shipper por 30 minutos para congelação em vapor de nitrogênio (-170 °C) e em seguida armazenadas em botijão de nitrogênio líquido a 196 °C até a realização das análises após 25 dias de congelação.

Tabela 1 - Delineamento experimental da adição ao meio diluente com polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *Arthropira platensis*.

Tratamentos	Composição	Concentração de PS (mg.mL ⁻¹)	Proporção Sêmen:Diluidor
T1	DMSO+Glicose	Zero	1:4
T2	DMSO+Glicose+PS	1,0	1:4
T3	DMSO+Glicose+PS	2,0	1:4
T4	DMSO+Glicose+PS	3,0	1:4

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Análise Espermática:

Utilizando o CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) por meio do *software Sperm Class Analyser* (SCA, Microptics®) e auxílio de uma câmara de Makler foram utilizados 1 µL de sêmen homogeneizado em 100 µL de solução ativadora de NaCl ,em osmolaridade de 125mM ,e submetido a avaliação quanto à motilidade total (%), velocidade curvilínea (VCL - µm.s⁻¹) medida ponto a ponto da trajetória do espermatozoide, velocidade linear (VSL - µm.s⁻¹) medida em linha reta do ponto inicial ao final e velocidade média do percurso (VAP - µm.s⁻¹). Para avaliar a concentração espermática, uma alíquota do sêmen *in natura* de cada macho foi fixada em uma solução salina de formaldeído, em uma proporção de 1:1000 (10 µL de sêmen: 990 µL de fixador). Desta mistura, 20 µL foram depositados em uma câmara de Neubauer cujos cinco quadrantes foram analisados sob um microscópio ótico com ampliação de 400x por contagem de espermatozoides. Na análise da morfologia espermática, o sêmen foi fixado em solução de citrato de formaldeído a 4% (10:100; sêmen:fixador) e, em seguida, corado com Rosa Bengala na proporção de 1:10 (corante:sêmen fixado) (Miliorini *et al.*, 2011). Sendo confeccionadas, por meio de esfregaço, duas lâminas por amostra de cada animal, nas quais foram avaliados 100 espermatozoides por lâmina, com o auxílio de microscópio óptico (Opton Microscope; Tucsén, China; 400x). As células espermáticas foram classificadas de acordo com a metodologia descrita por Miliorini *et al.* (2011), com adaptações.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada pelo

método de coloração eosina-nigrosina, sendo confeccionada uma lâmina por amostra de cada animal na proporção 1:2:2 (sêmen:eosina:nigrosina), de modo que 10 µL dessa mistura foram utilizados para a confecção das lâminas, pelo método de esfregaço. Utilizando microscópio de luz (Opton Microscope; Tucsen, China; 400x), 250 espermatozoides por lâmina foram analisados e considerados com a membrana íntegra, quando se apresentarem incolores, ou com membrana rompida, quando corados de rosa ou vermelho, de acordo com metodologia realizada por Nunes *et al.*, 2016.

A análise de integridade de DNA foi realizada pelo teste SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*), baseando-se na taxa de fragmentação da cromatina espermática, de acordo com Fernandez *et al.* (2005) seguindo adaptações de Almeida-Monteiro *et al.*, (2020). Dessa forma, 2 µL do sêmen fresco foram diluídos em 1,5 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e mantidos em banho maria a 37 °C até o uso posterior. Em seguida, 25 µL de solução sêmen-PBS foram misturados com 50 µl de agarose de baixo peso molecular (Agarose de baixo peso; Sigma-Aldrich, St Louis, 23 MO, EUA) e 2 µl de alíquotas desta mistura depositadas em cada um dos 10 pontos de uma lâmina previamente preparada com agarose altamente purificada (NA Agarose; Sigma® Aldrich, St Louis, MO, EUA). Em seguida, as lâminas ficaram acondicionadas em uma superfície metálica resfriada a 4 °C por cinco minutos. Posteriormente, submetidas a banhos em diferentes soluções: solução ácida (ácido clorídrico (HCl) e água milliqué, durante sete minutos); solução de lise (cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio dodecil (SDS), triton X, ácido etileno diaminotracético (EDTA), β-mercaptoetanol, solução Tris-HCL e água destilada, durante 25 minutos); água destilada (durante cinco minutos); e 70% álcool, 90% álcool e álcool absoluto, respectivamente (durante dois minutos cada). Após o procedimento de banho, as amostras foram coradas com um kit panótico (RenyLab Chemical and Pharmaceutical Ltda., Barbacena County, MG, Brasil); e cada lâmina mergulhada em cada corante por 10, 20 e 20 segundos, respectivamente. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. Então, 200 espermatozoides por amostra de cada animal foram avaliados usando um microscópio de contraste de fase acoplado à câmera (200; Nikon Eclipse 50 i, Tóquio, Japão) para investigar a incidência de halo em torno da cabeça do espermatozoide. Nesta análise, células com halo externo indicam dispersão de cromatina espermática (DNA intacto), enquanto células livres de halo indicam fragmentação do DNA espermático.

5.7 Fertilização:

Reprodutores machos de *P. brevis* (n=5) com peso médio $146,17 \pm 4,98$ g foram

selecionados quanto as características indicativas de maturação reprodutiva e induzidos hormonalmente à reprodução como descrito anteriormente no tópico 2.3. Foram utilizadas sete fêmeas com peso médio de $203,75 \pm 6,51$ g separadas em dois transfish de 1m^3 , induzidas com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) dividida em duas doses, uma de proporção 0,5 mg por cada kg de peso corporal e segunda dose 8h depois com proporção de 5 mg por cada kg de peso corporal, pesados em balança de precisão. Ao ser aplicada a segunda dose, foram monitoradas as variações de temperatura de hora em hora para a avaliação do somatório de Horas-Grau, com isso estabeleceu-se, aproximadamente, o tempo que os peixes levaram para ovulação em função da temperatura do sistema e iniciar o processo de descongelação do sêmen dos tratamentos T1, T2 e T4.

Para o tratamento fresco, cinco machos com peso médio de $134,19 \pm 4,98$ g, foram pesados em balança de precisão e induzidos com 0,3g de Ovopel por kg de peixe sendo aplicadas no mesmo período da segunda dose das fêmeas. No sentido de prover uma maior taxa de fertilização foram feitos *pools* com três gramas de ovócitos para os tratamentos frescos e congelados (T1, T2, T4), dose inseminante de $3,6 \cdot 10^5$ espermatozoides para cada ovócito seguido de hidratação gradual com 100ml de água do sistema de recirculação e distribuição de uma grama dos ovos hidratados em 12 incubadores cilíndricas (Figura 4), sendo três repetições para cada tratamento.

Figura 4 - Incubadoras



Fonte: Autor.

5.8 Acompanhamento do desenvolvimento embrionário

A supervisão do desenvolvimento embrionário foi acompanhada por meio da

coleta de amostras cuidadosamente retiradas com pipeta descartável e colocadas em placas de petri, 100 indivíduos por incubadora foram analisados por esteromicroscopia nos horários de 30 min, 3 horas, 7 horas, 10 horas, 13 horas após inseminação. Ao final do processo foi possível observar a taxa de fertilização dos tratamentos.

5.9 Análises estatísticas:

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade e teste de Levene para verificar a homogeneidade de variâncias entre os tratamentos. Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA). Ao ser constatada diferença estatística foi aplicado o teste de Tukey para comparação pareada das médias. Foi adotado um nível de significância de 5%. O software “SigmaPlot 12.0” foi utilizado para a análise estatística dos resultados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Produção da biomassa de *A. platensis*

Por meio da filtração, com duração de uma hora e auxílio de bombas de 4000 litros por hora, foram obtidos 532 g de biomassa úmida e que obteve um rendimento de 32% de biomassa seca de *A. platensis* e produtividade de 0,13 g/L. Não foi possível encontrar na literatura trabalhos que produziram esta microalga em sistemas de contínuos em tanques de ferrocimento *outdoor*. No entanto, temos na literatura trabalhos de sistemas raceway outdoors que produziram a microalga *A. platensis* em meio Zarrouk obtiveram produtividade média de 0,40 g/L (RADMANN *et al.*, 2007). Ao compararmos as produtividades dos trabalhos observamos que o cultivo de *A. platensis* em sistemas de ferrocimento em meio alternativo de ureia e SPT tem produtividade competitiva ao do sistema raceway. Visto que, o sistema do presente trabalho utilizou meios de baixo custo, que quando comparado ao custo de produção do meio Zarrouk, demonstram ser competitivo e viável a utilização desta metodologia.

6.2 Extração de polissacarídeos

Observou-se um decréscimo no rendimento de PSs no decorrer da técnica empregada, cujas porcentagens foram $1,39 \pm 0,15$; $0,24 \pm 0,05$ e $0,25 \pm 0,04\%$, para as três digestões realizadas, respectivamente ($p < 0,05$, Tabela 2), totalizando rendimento uma média total de 1,90% a partir da 5g de biomassa desidratada (Figura 5). Rendimento semelhante foi observado por Chaiklahan *et al.* (2013), ao submeter a microalga *Spirulina sp.* a extração sobre diferentes temperaturas e tempo de digestão, onde foi constatado que a extração à temperatura de 50°C a 70°C foi obtido um rendimento de 2% sobre a massa de microalga seca.

Figura 5 - Biomassa seca de *A. platensis*

Fonte: Autor.

Tabela 2 - Rendimento de polissacarídeos sulfatados obtidos por meio das digestões de 15 g de biomassa da microalga *Arthrospira platensis* divididas em 3 extrações de 5 g cada.

EXTRAÇÕES	RENDIMENTO POR EXTRAÇÃO (%)			Média por extração (mg)
	1° EXTRAÇÃO	2° EXTRAÇÃO	3° EXTRAÇÃO	
A1	1,52	0,30	0,18	1,39 ± 0,15 ^a
A2	1,22	0,22	0,32	0,24 ± 0,05 ^b
A3	1,42	0,20	0,26	0,25 ± 0,04 ^b

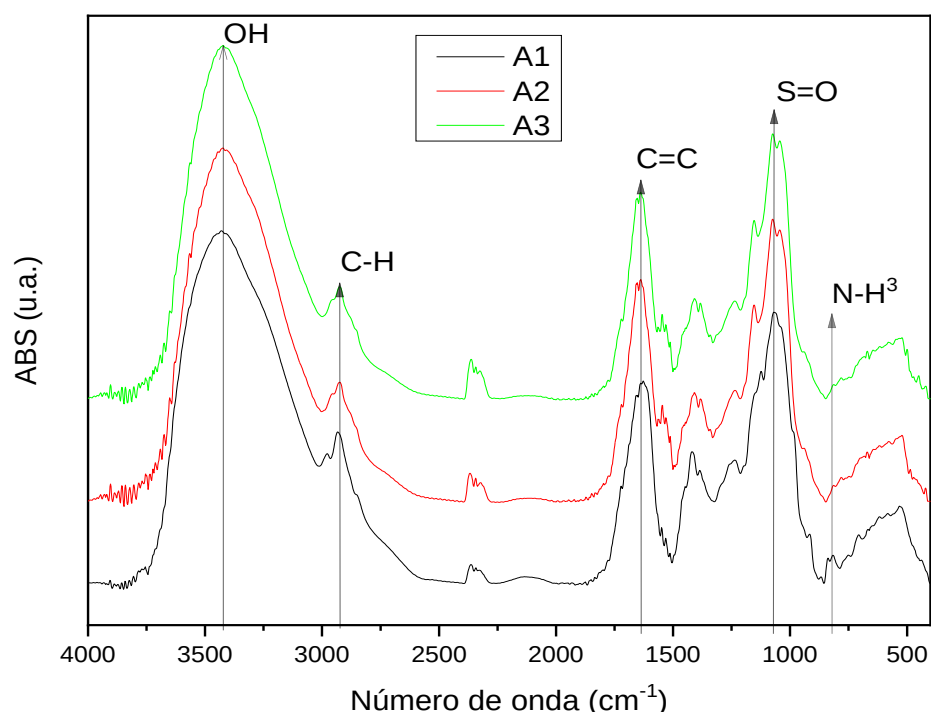
Médias com letras distintas indicam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Iguais não há diferença. A1; A2; A3 são três tratamentos de cinco gramas submetidas a três extrações sucessivas. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Caracterização dos Polissacarídeos Sulfatados por Infravermelho

Com os dados obtidos por meio da análise FTIR tornou-se possível o fornecimento de evidências dos grupos funcionais que estão na formação dos polissacarídeos e caracterização das estruturas do mesmo (Figura 6). Com o detalhamento dos grupos químicos fundamentais que compõem os polissacarídeos nos fornece percepções valiosas sobre sua composição e propriedades estruturais (Tabela 3). Essa abordagem analítica é

essencial para compreender a complexidade molecular dos polissacarídeos estudados, contribuindo significativamente para uma melhor compreensão de suas características e potenciais aplicações. Observando as absorções presentes nas três extrações (A1, A2 e A3) identificamos área de banda larga de absorção em 3400 cm⁻¹ caracterizada pelo o grupo funcional hidroxila (OH), na faixa larga de 845 cm⁻¹ e 1200 - 1250 cm⁻¹ representam grande intensidade do grupo sulfato (SO₃-), em 1650 – 1680 cm⁻¹ aminas I (NH₂), em 1550- 1575 cm⁻¹ aminas II (NH), em 1220 – 1300 cm⁻¹ amina III (N), em 1375 – 1420 cm⁻¹ grupo metil.

Figura 6 - Infravermelho das 3 amostras de polissacarídeo sulfatados de *Arthorpira* *platensis*



A1, A2, A3 são as amostras de 10 ug de polissacáridos retirados de cada extração final. Fonte: Elaborado pelo autor. As marcações com setas representam os grupos funcionais que os picos que absorção representam, como OH(Hidroxila), C-H(Hidrocarbonetos), C=C(Carbonila), S=O(Sulfato) N-H³(Amina).

Tabela 3 - Caracterização do polissacarídeo segundo a espectrofotometria FTIR.

Número de onda de absorção (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Referencia
3423	-OH (Hidroxila)	Muhammad <i>et al.</i> ,2021. Rodrigues <i>et al.</i> ,2014. Arunkumar <i>et al.</i> , 2021.
2830 – 3200	C-H (Hidrocarboneto)	Rodrigues <i>et al.</i> ,2014. Muhammad <i>et al.</i> ,2021.
1750 – 1735	C=C	Larkin, 2011

1600	(carbonila)	Arunkumar <i>et al.</i> , 2021. Jacox., 2003 Muhammad <i>et al.</i> ,2021
1440 – 1395	COOH (carboxila) NH3 (Amina)	Arunkumar <i>et al.</i> , 2021. Rodrigues <i>et al.</i> ,2014.
1250 – 1087	C=O (Carbonila) S=O (Sulfato) NH3 (Amina) C-O (Ligação glicosídica)	Jayawardhana, <i>et al</i> 2023. Arunkumar <i>et al.</i> , 2021. Muhammad <i>et al.</i> ,2021 Rodrigues <i>et al.</i> ,2014.
845	NH3 (Amina)	Jayawardhana, <i>et al</i> 2023.
813 – 815	SO4 (Sulfato)	Rodrigues <i>et al.</i> ,2014.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Muhammad et al. (2021) descreveram que ao analisar polissacarídeos de quatro microalgas verdes (*Tetrademus obliquus*, *Tetrademus dimorphus*, *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella* sp.) encontrou faixas de absorção alongadas na região de 3400 e 3200cm⁻¹ indicando a presença de hidroxila (OH) e lipídios na biomassa devida à vibração de alongamento simétrica e assimétrica do C-H respectivamente. Já na faixa de 1750 cm⁻¹ e 730 cm⁻¹ é caracterizada pela presença de triglicerídeos e 1163 cm⁻¹ e 1210 cm⁻¹ ácidos graxos. Estes autores também relatam que os picos em 1700 cm⁻¹ e 1800 cm⁻¹ confirmaram a maior concentração de ácidos graxos.

Para Rodrigues et al. (2014) ao analisar a estrutura de um polissacarídeo sulfatado obtida da macroalga verde *Caulerpa cupressoides* observaram a absorção em 3400 cm⁻¹ (OH), 2930 cm⁻¹ (CH), 1400 cm⁻¹ grupo carboxila (COOH), 1200 cm⁻¹ sulfato (S=O) e carbonila (C=O), 813 cm⁻¹ a 819 cm⁻¹ sugerem a ocorrência de característica estrutural da galactose-6-sulfato. Em sua pesquisa também foi observado que o decorrer das sucessivas extrações as intensidades de absorção diminuíram, comportamento similar ao do presente trabalho. Esta perda de carga pode ser ocasionada por uma melhor caracterização interna a célula de *A. platensis* em decorrência das sucessivas digestões do mesmo material.

Arunkumar et al. (2021) avaliaram os polissacarídeos sulfatados de quatro macroalgas vermelhas (*Centroceras clavulatum*, *Portieria hornemannii*, *Spyridia hypnoides*, *Asparagopsis taxiformis*) e 1 marrom (*Padina pavonica*). Caracterizando a faixa de absorção

3500 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} (OH) 1650 carbonila, entre 1210 cm^{-1} e 1280 cm^{-1} indicam a presença de ésteres de sulfato e um pico em 1140 cm^{-1} para ligação glicosídica C–O ligado a formação de polissacarídeos que em picos 770 cm^{-1} e 740 cm^{-1} formam o anel piranose. Literaturas disponíveis descrevem a carbonila na faixa de absorção 1750 – 1735 um grupo funcional de formação de muitos polissacarídeos. A composição monossacarídica dos PS extraídos da *A. platensis* são formados por glicose, ramnose, galactose, fucose, manose e xilose. (JACOX., 2003 ; LARKIN, 2011).

6.4 Análise espermática

O sêmen utilizado para constituir os tratamentos, sêmen fresco, foi avaliado e apresentou as seguintes características: motilidade espermática $94,7 \pm 2,39\%$; $86,0 \pm 3,50\%$ de normalidade espermática, $81,0 \pm 5,42\%$ de espermatozoides sem fragmentação de DNA e $86,5 \pm 6,52\%$ de integridade de membrana.

A análise no CASA (Tabela 4) mostrou que para a motilidade total os tratamentos não apresentaram diferença estatísticas ($P > 0,05$), Mostrando distribuição de médias bem próximas, tendo média geral de $24,3 \pm 0,5\%$ de espermatozoides móveis; a velocidade curvilínea (VCL) de todos os tratamentos T1, T2, T3, T4 ($18,40 \pm 0,631 \mu\text{m.s}^{-1}$; $18,23 \pm 0,520 \mu\text{m.s}^{-1}$; $18,76 \pm 0,981 \mu\text{m.s}^{-1}$; $18,63 \pm 0,922 \mu\text{m.s}^{-1}$, respectivamente) obtiveram desempenho médio de $18,51 \pm 0,205 \mu\text{m.s}^{-1}$, não apresentando diferenças estatísticas entre si ($P > 0,05$); Também não houve diferença estatística para a velocidade em linha reta (VSL) (média geral de $2,67 \pm 0,226 \mu\text{m.s}^{-1}$) nem para a velocidade média do percurso (VAP) (média geral de $6,23 \pm 0,294 \mu\text{m.s}^{-1}$).

Tabela 4- Motilidade total, velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) dos espermatozoides de *P. brevis*, congelados em meio diluidor com diferentes concentrações de PS da microalga marinha *A. plantensis*.

Tratamentos	Motilidade (%)	VCL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	VSL ($\mu\text{m.s}^{-1}$)	VAP ($\mu\text{m.s}^{-1}$)
T1	$25 \pm 1,92^a$	$18,40 \pm 0,631^a$	$2,82 \pm 0,084^a$	$6,52 \pm 0,189^a$
T2	$24 \pm 0,7^a$	$18,23 \pm 0,520^a$	$2,27 \pm 0,243^a$	$5,79 \pm 0,166^a$
T3	$25 \pm 3,9^a$	$18,76 \pm 0,981^a$	$2,81 \pm 0,704^a$	$6,42 \pm 0,898^a$

T4	24 ± 2,8 ^a	18,63 ± 0,922 ^a	2,54 ± 0,960 ^a	6,04 ± 0,965 ^a
Média Total	24,3 ± 0,5	18,51 ± 0,205	2,67 ± 0,226	6,23 ± 0,294
Valor de P		P=0,722	P= 0,457	P=0,316

Para uma mesma variável, médias com letras iguais são estatisticamente semelhantes entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Nunes *et al.* (2016) ao submeter o sêmen da *P. brevis* a congelação em diferentes meios (5% Glicose + Metilglicol 10%; 5% Glicose + DMSO 10%; 0,9% NaCl + Metilglicol 10%; 0,9% NaCl + DMSO 10%) obtiveram motilidade em DMSO de 32,87±1,21% independente do diluente, já para o Metilglicol taxa de 16,06 ± 1,58%. Os valores do trabalho supracitado foram superiores ao do presente trabalho com DMSO, mas inferior ao com Metilglicol. Ainda em comparação ao trabalho de Nunes *et al.* (2016), para outros parâmetros cinéticos de VCL, VSL, VAP, os tratamentos com polissacarídeos, no presente trabalho, tiveram resultados inferiores independente do diluente utilizado pelos autores citados. Também no trabalho de Nunes *et al.* (2019) demonstraram, com sêmen congelado de *P. brevis* em meio com 5% Glicose + DMSO 10% e 5% Glicose + Metilglicol 10%, ter desempenho cinético superior (VCL 36,38 ± 7,02 $\mu\text{m.s}^{-1}$; VSL 19,26 ± 2,75 $\mu\text{m.s}^{-1}$, VAP 25,70 ± 6,51 $\mu\text{m.s}^{-1}$) para o uso do DMSO, superando os obtidos com os tratamentos adicionados de polissacarídeos sulfatados de *A. plantensis*.

No entanto, a literatura nos descreve melhores resultados cinéticos para a utilização do metilglicol em diluições nas proporções de 1:3, 1:6 e 1:9 com motilidades melhores (41,04 ± 6,11%; 43,05 ± 6,75% e 41,26 ± 4,51%, respectivamente) do que o DMSO (11,36 ± 1,48%; 13,16 ± 1,73% e 23,98 ± 2,86%, respectivamente). Portanto, o presente trabalho apresenta resultados superiores aos obtidos com DMSO e inferiores aos alcançados com metilglicol. Contudo, ele destaca a qualidade inferior dos tratamentos com polissacarídeos em relação a outros parâmetros cinéticos, como VCL, VSL e VAP, independentemente do crioprotetor utilizado (Lopes *et al.*, 2014).

Na análise de morfologia, os tratamentos não obtiveram diferenças estatísticas (P>0,05), no entanto, chama a atenção o valor de normalidade espermática abaixo (variando de 8,04 a 10,42%) do observado por Nascimento *et al.* (2017) e Almeida-Monteiro *et al.* (2017), para a mesma espécie. De acordo com o trabalho de NASCIMENTO

et al. (2017), que estudaram a morfologia da mesma espécie, a porcentagem de normalidade nos espermatozoides ficou entre $75,95 \pm 12,29\%$ e $84,05 \pm 2,10\%$ para criopreservação com diferentes crioprotetores (DMSO e Metilglicol) e para sêmen fresco utilizado $97,21 \pm 1,46\%$. Já para ALMEIDA-MONTEIRO *et al.* (2017) que também testou os mesmos crioprotetores, na mesma espécie, a porcentagem de normalidade nos espermatozoides ficou em $63,08 \pm 1,92\%$ (DMSO), $55,44 \pm 2,31\%$ (Metilglicol) e de sêmen fresco de $66,17 \pm 1,76\%$, especialmente ao comparar os dados de morfologia espermática do sêmen fresco com os dos dois trabalhos citados, observa-se que a qualidade espermática do sêmen fresco foi semelhante ($86,0 \pm 3,5\%$). Portanto, leva a acreditar que as baixas taxas de normalidade espermática podem ter sido advindas ou da técnica de congelamento ou mesmo do diluidor, independente do uso dos polissacarídeos, uma vez que não houve diferença entre o controle (sem polissacarídeos) e os demais tratamentos.

A integridade do DNA espermático dos tratamentos não obtiveram diferenças estatísticas (T3- $84,53 \pm 6,98\%$; T2 - $79,92 \pm 2,78\%$; T1 - $79,60 \pm 5,21\%$ e T4 - $78,93 \pm 4,2\%$). Na literatura de resultados semelhantes foram obtidos por Sales *et al.* (2023 ao verificarem a suplementação com PS no meio diluidor de resfriamento seminal da mesma espécie, esses autores observaram uma taxa de integridade de DNA entre 84,0 e 89,0%, após 48 horas de resfriamento seminal. Já Vieira *et al.* (2024), ao analisar diferentes indutores hormonais na reprodução de *P. brevis* obtiveram valores inferiores de integridade de DNA, se comparado aos obtidos no presente trabalho. Sendo $66,75 \pm 11,49\%$ para o indutor salino; $50,62 \pm 1,20\%$ para extrato de hipófise de carpa; $65,43 \pm 2,92\%$ e $64,87 \pm 3,06\%$ para um indutor OVOPEL® em duas doses diferentes ($0,3 \text{ pellet kg}^{-1}$ de peso vivo e $0,5 \text{ pellet kg}^{-1}$, respectivamente) e $74,37 \pm 6,57\%$ e $61,28 \pm 3,95\%$ para um indutor OVAPRIM® em duas concentrações ($0,25 \text{ mL kg}^{-1}$ e $0,35 \text{ mL kg}^{-1}$, respectivamente).

Na avaliação da integridade de membrana plasmática foi possível observar a média dos tratamentos T3 ($77,03 \pm 7,66\%$), T1 ($75,83 \pm 5,93\%$), T2 ($60,23 \pm 5,62\%$) e T4 ($60,27 \pm 7,16\%$). Os tratamentos T1 e T3 foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) aos tratamentos T2 e T4 (Tabela 5). Sendo assim, o teste de fertilização ocorreu em todos os tratamentos menos T3 já que T1 e T3 não tiveram diferenças estatísticas. Ao compararmos com os dados obtidos por TORRES *et al.* (2022), que avaliaram a criopreservação de espermatozoides de *P. brevis* usando gema de ovo, lecitina de soja, sacarose e lactose como crioprotetores em diferentes concentrações, foi observado que todos os tratamentos com polissacarídeos de *A. platensis* obtiveram resultado superior (média geral de $68,05 \pm 8,10\%$) e inferior apenas aos tratamentos com diferentes concentrações de gema de ovo que alcançaram

médias $91,20 \pm 3,03\%$; $89,60 \pm 2,30\%$; $84,80 \pm 12,31\%$ (para as 5%, 10% e 12 %, respectivamente Nascimento *et al.* (2017) sugerem que a integridade de membrana do sêmen de *P. brevis* para congelação em diluente ACP e glicose promovem melhores resultados de integridade de membrana melhores, com médias de $92,89 \pm 7,83\%$ para ACP e $84,32 \pm 13,10\%$ para glicose.

Ao avaliarem a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides de curimatã, após congelação seminal utilizando os crioprotetores DMSO e Metilglicol, Nunes *et al.* (2019) obtiveram resultados inferiores ao do presente trabalho para T1 ($75,83 \pm 5,93\%$) e T3 ($77,03 \pm 7,66\%$). Para DMSO obtiveram valor $63,58 \pm 6,95\%$ e Metilglicol valor $35,58 \pm 11,27\%$.

Nunes *et al.* (2016), ao testarem diferentes protocolos de descongelação, verificaram diferentes efeitos sob a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de curimatã. Estes autores verificaram que os tratamentos contendo DMSO obtiveram taxas entre os métodos de 30 °C por 16 segundos ($56,15 \pm 3,46\%$), 40 °C por 12 segundos ($56,45 \pm 3,26\%$) e 25 °C por 30 segundos ($41,61 \pm 3,05\%$), e aos tratamentos com metilglicol 25 °C para 30 segundos ($36,13 \pm 2,79\%$) e 30 °C por 16 segundos ($37,01 \pm 2,58\%$) e 40 °C por 12 segundos ($27,60 \pm 2,62\%$) (Nunes *et al.*, 2016). Este resultado nos mostra que os tratamentos com polissacarídeos obtiveram resultados superiores independente da concentração utilizada.

Tabela 5 – Morfologia, integridade de DNA e Integridade de membrana plasmática do espermatozoide de *Prochilodus brevis*, após congelação seminal em meio diluidor com diferentes concentrações de polissacarídeos de *A. platensis*.

Tratamentos	Morfologia (%)	Fragmentação de DNA (%)	Integridade de Membrana (%)
T1	$8,04 \pm 2,07^a$	$79,60 \pm 5,21^b$	$75,83 \pm 5,93^c$
T2	$10,42 \pm 3,96^a$	$79,92 \pm 2,78^b$	$60,23 \pm 5,62^d$
T3	$9,42 \pm 2,76^a$	$84,53 \pm 6,98^b$	$77,03 \pm 7,66^c$
T4	$9,44 \pm 3,54^a$	$78,93 \pm 4,24^b$	$60,27 \pm 7,16^d$
Média Geral	$9,43 \pm 0,85$	$79,76 \pm 2,22$	$68,05 \pm 8,10$

Para uma mesma variável, médias com letras iguais são estatisticamente semelhantes entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

6.5 Fertilização e desenvolvimento embrionário

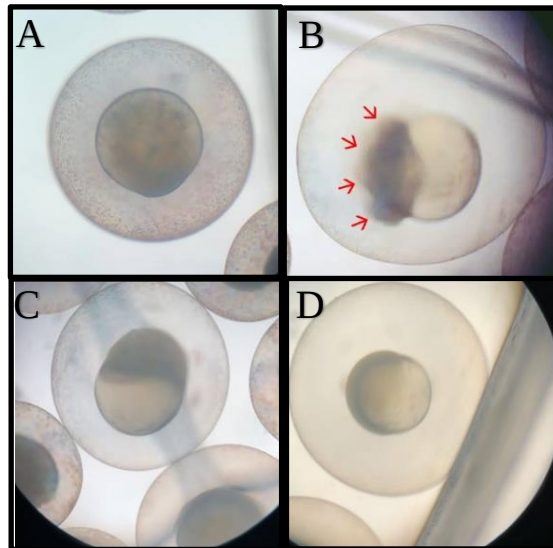
Os fatores bióticos e abióticos desempenham um papel crucial nas interações celulares, influenciando diretamente as atividades metabólicas dos organismos em desenvolvimento. Logo, durante o desenvolvimento dos ovócitos fecundados foram monitorados os parâmetros da incubadora, conforme apresentado na Tabela 6, que incluem oxigênio dissolvido, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, amônia (NH_3), nitrito (NO_2), cloro (Cl) e dureza total (DT), com o objetivo de garantir a estabilidade e a qualidade da água (Tabela 6).

Tabela 6 - Oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, amônia (NH_3), nitrito (NO_2), cloro (Cl) e dureza total (DT) da água utilizada para incubação de embriões de *P. brevis*.

PARÂMETROS	VALORES
Oxigênio	7,2
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	29,3
pH	8,2
Amônia (NH_3)	0,032
Nitrito (NO_2)	0
Cloro (Cl)	0
Dureza total (DT)	50 – 150

As larvas de curimatã eclodiram aproximadamente após 14 horas da fecundação. Todos os tratamentos tiveram sucesso de fertilização e foram acompanhados até a formação de Gástrula para determinação da taxa de fertilização (Figura 7). É importante destacar que condições inconvenientes, como níveis baixos de temperatura, podem prolongar o tempo necessário para o avanço do período de desenvolvimento embrionário (ALVES *et al.*, 2016; ATENCIO., 2017; ZIOBER *et al.*, 2012).

Figura 7 - Fases do desenvolvimento embrionário de curimatã comum (*P. brevis*); A. Amostra do processo de clivagem; B. Formação de Blastômeros; C. Estágio de Blástula; D. estágio de Gástrula.



Fonte: Autor.

Resultados semelhantes foram observados por Alves *et al.*, (2016), ao analisar o desenvolvimento embrionário de *P. brevis*, com eclosões iniciais sendo observadas 14h após a fertilização a temperatura de 28°C. Nakatani *et al.*, (2001) descreveu que para as larvas de *P. brevis* é possível observar eclosão com 24h20min, para *P. argenteus* eclodem com 19h sob temperatura de 24,8°C e , para *P. lineatus* eclodem com 16h após fecundação a temperatura de 25,9°C. NINHAUS *et al.*, (2006) obteve um resultado que reforça a diminuição do metabolismo e aumento de tempo para eclosão dos oócitos de *P. lineatus* sendo necessário 22 horas para eclosão a 24°C.

As taxas de fertilização estão apresentadas nas tabelas 7 e 8, onde o tratamento T4 obteve média ($34,99 \pm 2,82\%$), o controle fresco ($32,81 \pm 17,53\%$) e os tratamentos T1 ($29,50 \pm 7,70\%$) e T2 ($13,72 \pm 0,54\%$) (Tabela 7). Quando comparados somente os tratamentos T1, T2, T4 entre si (Tabela 8), pode-se constatar diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos T2 ($13,72 \pm 0,54\%$) e T4 ($34,99 \pm 2,82\%$).

Tabela 7 - Taxa de fertilização com sêmen de curimatã (*Prochilodus brevis*) submetidos a congelamento em meio diluidor suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados da microalga *Arthrospira platensis*, após 20 dias de armazenamento (n = 2) e do sêmen fresco.

Tratamentos	Concentração de PS (mg.mL ⁻¹)	Taxa de Fertilização (%)
Sêmen Fresco	Zero	32,81 ± 17,53 ^a
DMSO+Glicose (T1)	Zero	29,50 ± 7,70 ^a
DMSO+Glicose+OS (T2)	1,0	13,72 ± 0,54 ^b
DMSO+Glicose+OS (T4)	3,0	34,99 ± 2,82 ^a

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA; P<0,05). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Comparação das taxas de fertilização feita apenas entre os tratamentos utilizando sêmen de curimatã (*Prochilodus brevis*) após passarem por processo de congelamento em meio contendo diluente e protetor térmico, nas diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados da microalga *Arthrospira platensis* (0; 1 e 3 mg.mL), avaliadas após 20 dias de armazenamento.

Tratamentos	Concentração de PS (mg.mL ⁻¹)	Taxa de Fertilização (%)
DMSO+Glicose (T1)	Zero	29,50 ± 7,70 ^a
DMSO+Glicose+OS (T2)	1,0	13,72 ± 0,54 ^b
DMSO+Glicose+OS (T4)	3,0	34,99 ± 2,82 ^a

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Médias com letras distintas são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey (ANOVA; P<0,05). Fonte: Elaborado pelo autor.

Resultados semelhantes foram observados por Nunes *et al.* (2019), ao avaliar a capacidade fecundante do sêmen congelado de *P. brevis* em meio com 5% Glicose + DMSO10% e 5% Glicose + Metilglicol 10%. O tratamento com DMSO teve taxa de fertilização por volta de 35% semelhante ao tratamento T4 (34,99 ± 2,82), já para o metilglicol todos os tratamentos com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados foram melhores. Comparando o presente trabalho com o de Nunes *et al.* (2019), que possuía cinética e morfologia espermática superior, mostrou que a fertilização foi próxima 30% para o DMSO e zero para metilglicol, demonstrando que mesmo partindo de sêmen de baixa qualidade, como no caso presente, o tratamento T4 com 34,99 ± 2,82% mostrou-se superior

tendo sido utilizado o método de fertilização assistida a seco consegue-se índices semelhantes, uma vez que neste método coloca-se os gametas em contato direto, aumentando a probabilidade de haver a fertilização.

No contexto desta investigação, não se observaram diferenças nas taxas de fertilização entre o uso de sêmen fresco e os tratamentos T1 e T4, ressaltando que as características seminais após o processo de descongelamento não exerceram uma influência sobre a taxa de fertilização. Entretanto, há uma possibilidade de melhorar preservação da qualidade do esperma descongelado, através da utilização de sêmen de qualidade superior. Mas mesmo partindo-se do sêmen de baixa qualidade a metodologia de criopreservação é uma boa alternativa para a conservação de espécies em risco de extinção, como é o caso do *P. brevis*, que encontra-se na lista vermelha do estado do Ceará (BOTERO *et al.*, 2021).

7 CONCLUSÃO:

Conclui-se que o tratamento com a maior concentração de polissacarídeos sulfatados (3,0 mg/mL) é eficiente na preservação da qualidade espermática de *P. brevis* após congelação seminal, obtendo sucesso na fertilização da espécie. Também podemos destacar que a qualidade e sucesso da metodologia dependem da qualidade inicial desse sêmen que foi utilizado. Entre os tratamentos, o que obteve a melhor taxa de fertilização foi com o com a maior oncentração de polissacarídeos (T4 - 3,0 mg.mL). Portanto sugere-se o uso desta concentração para uso na criopreservação do sêmen de *P. brevis*.

8 PERSPECTIVAS:

Como perspectivas advindas deste trabalho tem-se a de testar outros diluidores de sêmen com associação de polissacarídeos sulfatados de *A. plantensis*; outros métodos de congelação e também outras concentrações destes polissacarídeos, uma vez que se observou que eles não interferiram nos resultados das avaliações espermáticas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M.S.; PINHEIRO, R.R.P.; LOPES, J.T.; FERREIRA, Y.M.; MONTENEGRO, A.R.; MELO-MACIEL, M.A.P.; SALMITOVANDERLEY, C.S.B. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved sêmen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 38, p. 2669- 2680, 2017.
- ALVES, D. E. O. *et al.* Desenvolvimento Ontogenético Inicial de *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875) (Characiformes). **Biota Amazônia**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 70–75, 2016.
- ANAND, N.; RACHEL, D.; THANGARAJU, N.; ANANTHARAMAN, P. Potential of marine algae (sea weeds) as source of medicinally important compounds. **Plant Genet. Resour.** , [s. l.], v. 14, p- 303-313, 2016.
- ARAÚJO, S.A.; GURGEL, H.C.B. Aspectos da biologia de *Prochilodus cearenses* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 4, n. 1, 2002.
- ARUNKUMAR, K. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activities of sulfated polysaccharides from five different edible seaweeds. **Journal of Food Measurement & Characterization**, v. 15, [s. l.], n. 1, p. 567–576, 2021.
- ATENCIO G, V. Producción de alevinos de especies nativas. **Revista MVZ Cordoba**, [s. l.], p. 9–14, 2017.
- BALDISSEROTTO, B. Espécies nativas para piscicultura no Brasil (3a edição revista, atualizada e ampliada)., [s. l.], Editora UFSM, 2020.
- BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on sêmen functions. **Vet. Med. Int.** , [s. l.], v. 2011, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4061/2011/686137>. Acesso em: 25/07/2024
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, , [s. l.] v. 23, p. 629-643, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>. Acesso em: 25/07/2024
- BATISTA, A. P., NICCOLAI, A., FRADINHO, P., FRAGOSO, S., BURSIC, I., RODOLFI, L., BIONDI, N., TREDICI, M. R., SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. **Algal Research**, [s. l.], v. 26, p. 161-171, (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.017>.
- BEIRÃO, J.; BOULAIS, M.; GALLEGU, V.; O'BRIEN, J.K.; PEIXOTO, S.; ROBECK, T.R.; CABRITA, E. Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. **Theriogenology**, [s. l.], v. 133, p. 161–178, 2019.
- BEZERRA NETO, J. T. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L.

Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) Howe: Análise de metodologias de precipitação. **Rev. Bras. Enga. Pesca**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 50-62, 2008

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, R.C. *et al.* (org). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 49-60. v. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org>

BOMFIM, A.C.; PERETTI, D.; CAMILLO, C.S.; COSTA, S.A.G.L.; NASCIMENTO, R.S.S. Reproductive biology and variations in the gonadal development of the fish Curimatã (*Prochilodus brevis* Steindachner, 1875) in captivity. **Biota Amazônia**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 65-70, 2015.

BOTERO, J. B.; LOURENÇO, R. C. G., RODRIGUES-FILHO, C. A. S.; RAMOS, T. P. A.; PINTO, L. M. E GARCEZ, D. S. 2021. **Lista de Peixes Continentais do Ceará. Fortaleza: Secretaria do Meio Ambiente do Ceará.** , [s. l.] Disponível em: <https://www.sema.ce.gov.br/fauna-do-ceara/peixes/>. Acessado em: 13/05/2024.

BUSTAMANTE-GONZÁLEZ, J. D., RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, M., CORTÉS-GARCÍA, A., ARENASRÍOS, E., FIGUEROA-LUCERO, G., ÁVALOS-RODRÍGUEZ, A. Fisiología y criopreservación del espermatozoide en teleósteos. **AquaTIC**, , [s. l.], v. 53, p. 1-17, 2019.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food. Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 51, p. 15-25, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 65-70.

CHAN, P.T.; MATANJUN, P.; YASIR, S.M.; TAN, T.S. Oxidative stress biomarkers in organs of hyperlipidaemic and normal rats fed tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 1371-1378, 2016.

CHAIKLAHAN, R. *et al.* Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 58, p. 73–78, 2013.

CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLLIEC-JOUAULT, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydr. Res.** , [s. l.], v. 330, p. 529–535, 2001.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v.25, n.3, p.294-306, 2007. Acesso em: 15 jan. 2008. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.

COSTA, B.B.; STREIT Jr, D.P. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. **Ciênc. Animal**, , [s. l.], v. 29, n. 2, p. 93-109, 2019.

COSTA, R.B.; ABREU, K.L.; CARVALHO, M.A.M.; FARIAS, J.O.; VELOSO-FREITAS, G.; SALES, R.O.; CATUNDA, A.G.V.; MEDEIROS, I.R.; SENA, A.M. Participação de

pescador(a) artesanal no policultivo da curimatã comum (*Prochilodus cearaensis*) com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 556-571, 2016.

COSTA, R.B.; CARVALHO, M.A.M.; ABREU, K.L.; SENA, A.M.; FARIAS, J.O.; VIDAL, D.L.; SALES, R.O.; MAGGIONI, R. Criação da curimatã comum, *Prochilodus cearaensis* Steindachner, 1911, em tanque rede. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, [s. l.], n. 3, p. 482-492, 2015.

DE MORAIS, M.G.; VAZ, B.S.; DE MORAIS, E.G.; COSTA, J.A.V. Metabólitos biologicamente ativos sintetizados por microalgas. **Pesquisa BioMed Internacional**, [s. l.], 2015.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, [s. l.], v.5, n.1, p. 33-40, 2004.

DEPINCE, A.; GABORY, A.; DZIEWULSKA, K.; LE BAIL, P.Y.; JAMMES, H.; LABBÉ, C. DNA methylation stability in fish spermatozoa upon external constraint: Impact of fish hormonal stimulation and sperm cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 124–134, 2020.

DOURADO, O.F. Principais peixes e crustáceos dos açudes controlados pelo DNOCS. Fortaleza, Convênio SUDENE/DNOCS, 1981. , [s. l.],. 40p.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. 2022. – FAO DATABASE. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detailevents/es/c/1585153/#:~:text=Em%202020%2C%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20animal,registrada%20nos%20tr%C3%AAs%20anos%20anteriores..> Acesso realizado em 27 de junho de 2023.

FARIAS, W.R.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v.275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FERNANDEZ, J. L., MURIEL, L., GOYANES, V., SEGRELLES, E., GOSÁLVEZ, J., ENCISO, M. JONGE, C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v.84, n.4, 833-842, 2005.

FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], p. 367–373, 2007.

GALLEGO, V; CAVALCANTE, S.S.; FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, P.C.F.; AZEVEDO, H.C.; MARIA, A.N. Fish sperm subpopulations: Changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Theriogenology**, [s. l.], v. 87, p. 16–24, 2017.

GM Guiry e Guiry, MD & Guiry, GM 18 de dezembro de 2019. **AlgaeBase** . Publicação

eletrônica mundial, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; pesquisado em 29 de junho de 2023.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v.31, n.3, p.351-360, 2007.

GURGEL, J.J. S.; OLIVEIRA, A.G. Efeitos da Introdução de Peixes e Crustáceos no Semi-Árido do Nordeste Brasileiro. **Coleção Mossoroensetsérie**, B N 453. 1987.

GURGEL, J.J.S.; FERNANDO, C.H. Fisheries in Semi-Arid Northeast Brazil with Special Reference to the Role of Tilapias. **Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie**, [s. l.], v. 79, n. 1, 1994.

GURGEL, L.L.; VERANI, J.R.; CHELLAPPA, S. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid region of Brazil. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2012, 2012.

HAN, X.; LIU, S.; YANG, Y.; LIU, W. Polysaccharide from *Spirulina platensis* improves sepsis-induced acute lung injury by alleviating inflammatory response and down-regulating endocan expression in rats, **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, 2022.

HOSSEINI, S.M., KHOSRAVI-DARANI, K., MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of *Spirulina microalgae*. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v.13, n.8, p.1231-1237, 2013. <http://dx.doi.org/10.2174/1389557511313080009>. PMID:23544470.

IBÁÑEZ-ARANCIBIA, E.; FARÍAS, J.G.; VALDEBENITO, I. Use of antioxidants and time of cold storage: effects over viability parameters and enzymatic levels in semen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 83, p. 1–13, 2020.

IOZZO, R.V.; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology**, [s. l.], v. 42, p. 11-55, 2015.

JACOX, M. E. Vibrational and electronic energy levels of polyatomic transient molecules. Supplement B. **Journal of physical and chemical reference data**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 1–441, 2003.

JAYAWARDHANA, H. H. A. C. K. *et al.* Structural characterization and anti-inflammatory potential of sulfated polysaccharides from *Scytosiphon lomentaria*; attenuate inflammatory signaling pathways. **Journal of functional foods**, [s. l.], v. 102, n. 105446, p. 105446, 2023.

JIANG, N.; LI, B.; WANG, X.; XU, X.; LIU, X.; LI, W.; CHANG, X.; LI, H.; QI, H. The antioxidant and antihyperlipidemic activities of phosphorylated polysaccharide from *Ulva pertusa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 145, p. 1059-1065, 2020.

JRIDI, M.; NASRI, R.; MARZOUGUI, Z.; ABDELHEDI, O.; HAMDY, M.; NASRI, M. Characterization and assessment of antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides extracted from cuttlefish skin and muscle. **International Journal of**

Biological Macromolecules, [s. l.], v. 123, p. 1221-1228, 2019.

KOLYADA, M. N., OSIPOVA, V. P.; BERBEROVA, N.T. Use of cryoprotectors and antioxidants in sturgeon semen cryopreservation. **Cryobiology**, [s. l.], 2023.

KOYANDE, A.K. *et al.* Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**. , [s. l.] Elsevier, 2019.

LARKIN, P. Infrared and Raman spectroscopy: Principles and spectral interpretation. Filadélfia, PA, USA: Elsevier Science Publishing, 2011.

LEE, JB; SRISOMPORN, P.; HAYASHI, K.; TANAKA, T.; SANKAWA, U.; HAYASHI, T. Efeitos da modificação estrutural do espirulan de cálcio, um polissacarídeo sulfatado da *Spirulina platensis* na atividade antiviral. **Boletim Químico e Farmacêutico**, [s. l.], v.49, n. 1, p. 108-110, 2001.

LEGENDRE, M.; BILLARD, R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. **Reproduction Nutrition Development**, , [s. l.] v. 20, n. 6, p. 1859-1868, 1980.

LEITE, J.S.; OLIVEIRA-ARAÚJO, M.S.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; CAMPELLO, C.C.; CAMPOS, A.C.N.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Seasonal variation in seminal quality in *Brazilian bocachico* (Teleostei, Characiformes). **Revista Caatinga**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 759-766, 2018.

LEITE, L.V.; OLIVEIRA, F.D.C.E.; NUNES, L.T.; NUNES, J.F.; SALMITOVANDERLEY, C.S.B. Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 23-29, 2011.

LI, P.; LI, Z.; DZYUBA, B.; HULAK, M.; RODINA, M, LINHART, O. Evaluating the Impacts of Osmotic and Oxidative Stress on Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Sperm Caused by Cryopreservation Techniques, **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 852-858. 2010.

LI, S. *et al.* Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 292, p. 122048, 2019.

LOPES, J. T. Lecitina de soja e antioxidantes na composição de meios de congelamento espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

LOPES, JT *et al.* Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** , [s. l.], v. 3, pág. 170-175, 2014.

LOPES, J.T.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelamento seminal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 29-34, 2016.

LOURENÇO S. O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações. São Carlos:

Rima. 606p, 2006.

LUCAS, B.F., MORAIS, M.G., SANTOS, T.D.; COSTA, J.A.V. Effect of Spirulina addition on the physicochemical and structural properties of extruded snacks. **Food Science and Technology**, [s. l.], v.37(spe), p.16-23, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.06217>.

LUCAS, B.F.; ROSA, A.P.C.; CARVALHO, L.F.; MORAIS, M.G.; SANTOS, T.D.; COSTA, J.A.V. Snack bars enriched with *Spirulina* for schoolchildren nutrition, **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 40, p.146- 152 , Jun., 2020.

MACHADO, A. R., GRAÇA, C. S., DE ASSIS, L. M., DE SOUZA-SOARES, L. A. Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. **Revista de Ciências Agrárias**, [s. l.], v.40, n.1, p.264-278, 2017.

MAGNOTTI, C.; CERQUEIRA, V.; LEE-ESTEVEZ, M.; FARIAS, J. G.; VALDEBENITO, I.; FIGUEROA, E. Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v.10, n.1, p.15–25, 2018.

MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, [s. l.], v.21, n.2, p.80-89, 2006. <https://doi.org/10.1007/BF02912918>.

MEFFE, G.K.; CARROLL, R. Genetics: Conservation of diversity within species, In: MEFFE, G.K.; CARROLL, R. Principles of conservation biology. Sinauer Associates editors. Sunderland, MA, p.143-178, 1994.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; COSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 42, p. 177 - 187, 2011.

MORAIS, M.G., MIRANDA, M.Z., COSTA, J.A.V. (2006). Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, [s. l.], v.17, n.3, p.323-328.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, [s. l.], v.9, n.8, p.225-232, 1999.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, [s. l.], v.9, n.8, p.225-232, 1999.

MUHAMMAD ARIF, YUXI LI, MARWA M. EL-DALATONY, CHUNJIANG ZHANG, XIANGKAI LI, EL-SAYED SALAMA, A complete characterization of microalgal biomass through FTIR/TGA/CHNS analysis: Na approach for biofuel generation and nutrients removal, **Renewable Energy**, [s. l.], V.163, 2021, Pages 1973-1982.

NAKATANI, K. *et al.* Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de

identificação. Av. Colombo, 5790: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2001.

NAKATANI, K., AGOSTINHO, AA., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, PV., MAKRAKIS, MC., PAVANELLI, CS., 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá, EDUEM, 349p.

NAKATANI, K., AGOSTINHO, AA., BAUMGARTNER, G., BIALETZKI, A., SANCHES, PV., MAKRAKIS, MC., PAVANELLI, CS. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** Av. Colombo, 5790: Eduem, 2001.

NASCIMENTO, A.F.; MARIA, N.A.; PESSOA, N.O.; CARVALHO, M.A.M.; VIVEIROS, A.T.M. Out-of-season sperm cryopreservation in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v.118, n.2-4, p.324-329, 2010.

NASCIMENTO, R. V. DO, DE ALMEIDA-MONTEIRO, P. S., PEREIRA, V. A., TORRES, T. M., NUNES, L. T., SALES, Y. S.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Sulfated polysaccharides from seaweed as a supplement to *Prochilodus brevis* sperm freezing medium. **Cryoletters**, [s. l.], v.43, n.2, p.110-119, 2022.

NASCIMENTO, R.V.; LEITE-CASTRO, L.V.; MONTENEGRO, A.R.; OLIVEIRAARAÚJO, M.S.; LOPES, J.T.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; FERREIRA, Y.M.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Influence of Cooling Time and Diluents on the Freezability of *Prochilodus brevis* semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 9, 2017.

NASCIMENTO, R.V.; LEITE-CASTRO, L.V.; MONTENEGRO, A.R.; OLIVEIRAARAÚJO, M.S.; LOPES, J.T.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; FERREIRA, Y.M.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B. Influence of Cooling Time and Diluents on the Freezability of *Prochilodus brevis* semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v.45, n.1, p.9, 2017.

NUNES, L.T., OLIVEIRA, M.S., LOPES, J.T., SOUZA, M.E.M., PINHEIRO, R.R.R., CAMPELLO, C. C.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 37, n.3, p.1643- 1654, 2016. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37 n3p1643.

NUNES, L. T., OLIVEIRA-ARAÚJO, M. S., LOPES, J. T., ALMEIDA-MONTEIRO, P. S., NASCIMENTO, R. V., PEREIRA, V. A. SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. (2019). Fertilizing capacity of the cryopreserved sperm of *Prochilodus brevis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 47, n.1, p.1-6. doi: 10.22456/1679-9216.92791.

OLIVEIRA, M.S.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S.; NUNES, L.T.; LINHARES, F.R.A. PINHEIRO, J.P.S.; PINHEIRO, R.R.R.; FERREIRA, F.O.; CAMPELLO, C.C.; RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)**, [s. l.], v. 265, n. 1–4, p. 118–126, 2007.

SALMITOVANDERLEY C.S.B. Cryopreservation of tambaqui semen using programmed freezing machine and dry shipper. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 2167-

2179, 2016.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Ed). **Methods in molecular biology: Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc, [s. l.]. v.368, p.39-58, 2007.

PERIYANNAN, R.; SUBRAMANIAN, P.; RAVICHANDRAN, A.; MANOHARAN, V.; MEYYANATHAN, E.; THANGAPANDI, M.; MEHDI, T., SANGGUAN, Y.; NARAYANASAMY, M.P. Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v.141, p.809-821, 2019.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant. Res.** , [s. l.], v. 63, p. 215-225, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>.

RAPOSO, M.F.J.; DE MORAIS, R.M.S.C.; DE MORAIS, A.M.M.B. Bioatividade e aplicações de polissacarídeos sulfatados de microalgas marinhas. **Drogas Marinhas**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 233-252, 2013.

REASER, J.K.; GALINDO-LEAL, C.; ZILLER, S.R. Visitas indesejadas: a invasão de espécies exóticas. In: GALINDO-LEAL C.; CÂMARA IDG. (Eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Fundação S.O.S. Mata Atlântica: São Paulo. Conservação Internacional: Belo Horizonte. 2005.

REYNALTE-TATAJE, D. A. *et al.* State of the art of identification of eggs and larvae of freshwater fish in Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, [s. l.], v. 32, 2020.

RICCIO, G.; LAURITANO, C. Microalgae with immunomodulatory activities. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 2, 2020.

RODRIGUES, JAG; NETO, ÉRICO M.; SANTOS, GRC DOS; PAULA, RCM DE; MOURÃO, PA DE S.; BENEVIDES, NMB. Análise estrutural de uma fração polissacarídica sulfatada obtida da alga marinha verde cenocítica *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium*. **Acta Scientiarum. Tecnologia**, [s. l.] , v. 36, n. 2, pág. 203-210, 4 de abril de 2014.

RODRÍGUEZ DE MARCO, E.; STEFFOLANI, M. E.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. (2014). Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie**, [s. l.], v.58, n.1, p.102-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.054>.

ROSA, R. S.; GROTH, F. Ictiofauna dos Ecossistemas de Brejos de Altitude de Pernambuco e Paraíba. In: K. C. PÔRTO; J. J. P. CABRAL; M. TABARELLI (Eds). **Brejos de Altitude de Pernambuco e Paraíba**. MMA, Brasília. 2004.

ROSA, R.S.; MENEZES, N.A.; BRITSKI, H.A.; COSTA, W.J.E.M.; GROTH, F. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. In: LEAL, I.L.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (2. ed.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. cap. 3, p. 135-180.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **J. Androl.** , [s. l.], v. 23, p. 737–752, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x>. Acesso em: 25/07/2024

SALES, Y. S. *et al.* Supplementation of sulfate polysaccharides in the seminal cooling medium of common curimatã (*Prochilodus brevis*). *Cryo letters*, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 208–218, 2023.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; PINHEIRO, J.P.S.; ALMEIDA P.S.; LOPES, J.T.; LEITE, L.V.; Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. **Acta Vet. Bras.** , [s. l.], v.8, n.2, p.343- 350, 2014.

SALMITO-VANDERLEY, C.S.B., VIEIRA, M.J.A.F., LEITE, L.V., OLIVEIRA, F.C.E., LINHARES, F. R. A., SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, [s. l.], v.22, n.1, p.255-268, 2012.

SEEDEVI, P.; MOOVENDHAN, M.; VIRAMANI, S.; SHANMUGAM, A. Bioactive potential and structural characterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria corticata*). **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 155, p. 516-524, 2017.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, F.C.P.; BRITO, M.F.G.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. **Journal of Fish Biology.** , [s. l.], v. 67, p. 1686-1698, 2005.

SIVASUNDAR, A.; ELDREDGE, B.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, [s. l.], v. 10, n. 2: 407-417, 2001

SOCRATES, G. Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts. 3. ed. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2004.

SOUSA, W. M.; SILVA, R. O.; BEZERRA, F. F.; BINGANA, R. D.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E.; SOMBRAS, P. M. G.; FEITOSA, J. P. A; FREITAS, A. L. P. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v.152, p.140-148, 2016.

SOWINSKA, M.; NYNCA, J.; CEJKO, B. I.; DIETRICH, M. A.; HORVATH, A.; URBANYI, B.; KOTRIK, L.; CIERESZKO, A. Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. **Aquaculture**, [s. l.], v. 400-401, p. 101-104, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.010>.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSEN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 101, n.2, p. 87-96, 2006

SYNYTSYA, A.; KIM, W.J.; KIM, S.M.; POHL, R.; SYNYTSYA, A.; KVASNIČKA, F.; ČOPÍKOVÁ, J.; PARK, Y.I. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 41-48, 2010.

TAITSON, P.F.; CHAMI, E.; GODINHO, H.P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v.105,p.283–291, 2007.

TAYLOR, B.W.; FLECKER, A.S.; HALL, R.O. Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. **Science**, [s. l.], v. 313, n. 5788, p. 833-836, 2006.

TEIXEIRA, SF.; RODRIGUES, VMS.; BARBOSA, RT.; SOUZA, JLG.; CAMPOS, SS, Aspectos da pesca e da biologia do curimatã *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 (Actinopterygii: Prochilodontidae) no Reservatório de Boa Esperança, PI/MA, Brasil. **Revista Nordestina de Zoologia Recife**, [s. l.] , v. 4, n. 2, p. 5-16, 2009.

TORRES, T. M. *et al.* Sperm cryopreservation of *Prochilodus brevis* using diferente concentrations of non-permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction*, [s. l.], v. 19, n. 1, 2022.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol**, [s. l.], v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x>.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V.; SANTANA, L. D. A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Rev. Bras. Inov. Tecnol. Saúde**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 2236-1103, 2015.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol Cell Endocrinol**, [s. l.], v. 216, p. 31–39, 2004.

VIEIRA, C. T. N. S. *et al.* Evaluation of different hormone inducers on the reproduction of *Prochilodus brevis* males. **Ciencia agronomica**, [s. l.], v. 55, 2024.

VIVEIROS, A. T. M. *et al.* Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 551–556, 2010

WANG, S.; MECKLING, K. A.; MARCONE, M. F.; KAKUDA, Y.; TSAO, R. Can phytochemical antioxidant rich foods act anti-cancer agents? **Food Res. Inter.**, Amsterdam, v.44, n. 9, p. 2545- 2554, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.021>.

WANG, W.; WANG, S.; GUAN, H. As atividades antivirais e mecanismos de polissacarídeos marinhos: uma visão geral. **Drogas Marinhas**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 2795-2816, 2012.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biol. Reprod**, [s. l.], v. 77, p. 190–201, 2007. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060558>.

WELLS, Mark L. *et al.* Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our

understanding. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], 2017.

XIN, M.; SIDDIQUE, M.A.M.; DZYUBA, B.; CUEVAS-URIBE, R.; SHALIUTINA-KOLEŠOVÁ, A.; LINHART, O. Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. **Theriogenology**, [s. l.], v. 98, p. 16-22, 2017.

ZIOBER, S. R.; BIALETZKI, A.; MATEUS, L. A. DE F. Effect of abiotic variables on fish eggs and larvae distribution in headwaters of Cuiabá River, Mato Grosso State, Brazil. **Neotropical ichthyology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 123–132, 2012.