República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015019457-9 A2

(22) Data do Depósito: 13/08/2015

(43) Data da Publicação: 30/10/2018

**(54) Título:** DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA Á BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO.

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

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, CENTRO DE MEDICINA INTEGRADA DE SERGIPE, ACP PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO LTDA

**(72) Inventor(es):** ERIKA CALDAS SILVEIRA; EDILSON DIVINO DE ARAÚJO; JOSÉ FERREIRA NUNES; CRISTIANE CLEMENTE DE MELLO SALGUEIRO

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 13/08/2015

**(57) Resumo:** A presente invenção objetiva o desenvolvimento e analise da eficiência de meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-113c) comparado ao meio convencional padrão ouro no mercado Freezing Medium test yolk buffer (TYB) e meio preconizado pela OMS Gema de ovo-citrato-glicerol (GEYC), em protocolo modificado de criopreservação para sêmen humano, proporcionando o uso da água de coco em pó (ACP) ou liofilizada como diluente para a conservação do sêmen humano a fresco, refrigerado ou congelado em programas de reprodução humana assistida.

| | Sêmen / esperma (Médias±DP)[a,b,c,d] | Pós-descongelamento meio (Média±DP) - TYB[a] | Pós-descongelamento (Médias±DP) - GEYC[b] | Pós-descongelamento (Média±DP) - ACP-113c[c] | Pós-descongelamento (Médias±DP) – ACP-113c[d] |
|---|---|---|---|---|---|
| Concentração ($10^6$/ml) | 61.35±22.37 | 25.80±11.22 | 27.73±14.31 | 21.60±7.89 | 24.70±10.66 |
| Espermatozoides com motilidade progressiva(A+B) (%) | 53.80±14.86 | 21.82±12.16 | 12.95±11.46 | 15.75±8.77 | 23.47±13.78 |
| Espermatozoides morfologicamente normais (%) | 3.17±2.97 | 1.63±1.08 | 1.53±1.30 | 1.77±1.13 | 2.29±1.16 |
| Viabilidade (%) | 63.57±18.13 | 45.50±20.14 | 31.10±13.48 | 39.33±14.16 | 48.30±23.27 |

DP: desvio padrão. a, b, c, d: p<0.05

## Relatório Descritivo de Patente de Invenção

### "Desenvolvimento de Meio de Cultura à Base de Água de coco em pó no processo de Diluição e Criopreservação de Sêmen Humano"

[001] A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de produto e processo tecnológico, de forma geral, no uso da água de coco em pó (ACP-113c) ou liofilizada como diluente para a conservação do sêmen humano a fresco, refrigerado ou congelado em técnicas de preservação e/ou programas de reprodução humana assistida. A presente invenção se situa no campo da biotecnologia.

[002] A infertilidade é um problema clínico comum, com uma prevalência de aproximadamente 13% a 15% dos casais em idade reprodutiva. Estima-se que aproximadamente 80 milhões de pessoas em todo mundo sejam inférteis, sendo considerado um problema importante de saúde pública, pois não afeta somente os casais como também a sociedade e os programas de atenção à saúde (MILARDI, D. *et al.* Clinical study of male fertility and reduction in semen parameters: a single tertiary-care center experience. **International Journal of Endocrinology**, 2012). Portanto, a medicina reprodutiva é uma das áreas que apresentou maior desenvolvimento em um curto período de tempo nos últimos anos. O aprimoramento das tecnologias, juntamente com o desenvolvimento de novas medicações e equipamentos foram os responsáveis por esse avanço tão rápido, visando sempre à melhoria das taxas de gravidez (BORGES JÚNIOR, E.; FARAH, L.M.S.; CORTEZZI, S.S. **Reprodução Humana Assistida**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2011).

[003] O nascimento de Louise Brown em 1978, através da fertilização *in vitro* (FIV) com transferência de embriões (TE), foi o marco inicial do desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida (TRA) e das técnicas de microfertilização e micromanipulação de gametas no ser humano. Antes disso, o máximo que podia ser feito para tratar a infertilidade era a inseminação artificial, com apenas 10% a 15% de chances de gravidez, em cada tentativa. Com os avanços obtidos, nos dias de hoje estão disponíveis técnicas mais avançadas, que vão desde a criopreservação de gametas à microinjeção de um único espermatozoide dentro do oócito, podendo oferecer,

dependendo do caso, uma chance de 50% de sucesso em cada tentativa (BORGES JÚNIOR, E.; FARAH, L.M.S.; CORTEZZI, S.S. **Reprodução Humana Assistida**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2011).

[004] Dentre as novas tecnologias desenvolvidas nas duas últimas décadas, destaca-se a criopreservação seminal. A prática de criopreservação e armazenamento de espermatozoides humanos utilizando nitrogênio líquido foi introduzida na década de 1960 e agora é rotineiramente utilizada nas práticas laboratoriais de reprodução assistida. Apesar do sucesso da criopreservação do sêmen humano, o procedimento não é isento de riscos e efeitos adversos (THOMSON, L.K. *et al.*The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. **Fertility and Sterility**, v.92, n.3, p.991-1001, 2008). A criopreservação é o procedimento que faz com que seja possível estabilizar as células em temperaturas criogênicas, um aspecto aplicado na criobiologia ou o estudo da vida a baixas temperaturas. Atualmente, é possível a manutenção de uma variedade de tipos de células em baixas temperaturas, incluindo gametas masculinos e femininos, pequenos organismos multicelulares tais como embriões, e órgãos (DI SANTO *et al.* Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Advances in Urology**, 2012).

[005] O processo de congelação - descongelação de espermatozoides humanos é rotineiramente utilizado para a inseminação assistida (IIU) e muitos programas de fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) com sêmen de doador ou do próprio parceiro (SHERMAN, J. Cryopreservation of human semen. In: CRC Press BR (ed.) **Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility**. FL, USA; 1990).

[006] Dentro da área de reprodução assistida, a criopreservação do sêmen é largamente utilizada em uma variedade de circunstâncias, incluindo as novas técnicas de reprodução assistida, pré-tratamento de radioterapia e quimioterapia, problemas com ejaculação, inacessibilidade do homem à parceira no período da ovulação, homens

submetidos à vasectomia, armazenamento de doadores de sêmen e checagem de soro negatividade para doenças sexualmente transmissíveis como vírus da imunodeficiência humana (HIV) e hepatites. Esta técnica também é utilizada para armazenamento de espermatozoides recuperados de pacientes com ejaculado azoospérmico que tenham sido submetidos à extração testicular ou aspiração percutânea epididimal de espermatozoides (DI SANTO *et al.*Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Advances in Urology**, 2012).

[007] O processo de criopreservação de sêmen humano está inserido na criobiologia. Utiliza-se neste processo a adição de crioprotetores ao meio com o objetivo da proteção dos espermatozoides durante a congelação-descongelação, que podem causar danos celulares irreversíveis. Entretanto, mesmo com toda tecnologia disponível, vários processos danosos podem ocorrer durante a criopreservação dos espermatozoides humanos: choque térmico, formação de cristais de gelo intracelulares, desidratação celular, aumento da concentração de sais e choque osmótico. Esses processos podem levar à morte celular, danos à membrana celular, desnaturação das proteínas, comprometimento da motilidade, alterações morfológicas e acrossômicas, e danos estruturais e funcionais (NALLELLA, K.P. *et al.* Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v.82, p.913-918, 2004).

[008] Além da adição de crioprotetores e meios específicos para a congelação, a técnica de criopreservação utilizada também é de suma importância para evitar danos letais em espermatozoides. Várias técnicas de criopreservação diferentes são utilizadas, desde processos de diminuição lenta de temperatura até processos ultra-rápidos como a vitrificação, visando minimizar os danos celulares causados (BOITRELLE, F. *et al.*Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. **Journal of Andrology**, 2012).

[009] Não há disponível no mercado um processo que seja totalmente eficiente e eficaz e, desta forma, faz-se necessária à otimização do processo de criopreservação através da utilização de meios e crioprotetores que possam provocar menos danos às células espermáticas e melhoramento de técnicas de criopreservação de espermatozoides humanos, visando melhorar a viabilidade espermática pós-criopreservação e descongelação. A água de coco surge como excelente alternativa para a criopreservação seminal e destaca-se por ser uma solução isotônica que apresenta características biológicas e físico-químicas ideais para o uso na criopreservação, sendo um componente exclusivamente vegetal, sem presença de proteínas animais, reduzindo assim a taxa de indução de reação imunológica. Tem um baixo custo e facilidade de acesso, sendo produto comum e farto na região Nordeste, o que propiciará menores custos para realização das técnicas utilizadas nos serviços de reprodução humana. A água de coco tem sido amplamente utilizada em biotecnologias relacionadas à reprodução animal bem como outros setores biotecnológicos. Como alternativa de diluente, a água de coco apresentou excelente comportamento junto ao sêmen e a fertilidade, aumentando a vida útil e a motilidade dos espermatozoides em espécies animais (NUNES, J.F. *et al*. Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação in vitro e avaliação in vivo do sêmen na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.2, p.34, 1996).

[010] Em virtude dessa potencialidade, ela foi testada como diluente para sêmen de diversas espécies, e nesse sentido, foi proposta sua utilização como diluente para a criopreservação de sêmen humano.

[011] A criopreservação é o procedimento que faz com que seja possível estabilizar as células em temperaturas criogênicas, um aspecto aplicado na criobiologia (DI SANTO *et al.*Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity and Implications for ART. **Advances in Urology**, 2012). A criopreservação seminal é normalmente utilizada em uma variedade de circunstâncias, incluindo as novas técnicas de reprodução assistida, pré-tratamento de radioterapia ou quimioterapia, problemas com ejaculação, inacessibilidade do homem à parceira no período da ovulação, homens submetidos à vasectomia, armazenamento de doadores de sêmen com soro negatividade

para HIV, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites. Esta técnica também é utilizada para armazenamento de espermatozoides recuperados de pacientes com amostras azoospérmicas (sem espermatozoides) que tenham sido submetidos à extração testicular de espermatozoides ou aspiração percutânea epididimal de espermatozoides que ficam disponíveis para vários tratamentos de ICSI a partir de uma única biópsia (O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on spermmorphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v.17, n.3, p.704-709, 2002).

[012] Após o processo de preservação, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade e manter a integridade das membranas espermáticas para que ocorra a penetração no oócito. Qualquer falha inerente à fisiologia espermática pode prejudicar sua capacidade de fertilização do oócito como também de suportar desenvolvimento embrionário (HOLT, W.V.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological found ations for laboratory tests of sêmen quality. **Reproduction**, v.127, p.527-535, 2004).

[013] A evolução da criobiologia tem conseguido estabelecer procedimentos razoavelmente eficazes para a criopreservação de espermatozoides humanos, entretanto os efeitos do processo de criopreservação e descongelação ainda são letais para algumas células, deste modo, as células sobreviventes podem sofrer lesões estruturais e trocas metabólicas que limitem a sua função biológica (GÓNGORA, A.; CAPILLA, G.; TREJO, P. Criopreservación espermática, impacto sobre la tasa de sobrevivencia y su repercusión al futuro. **Acta médica**. v. 1, n. 3, p. 132-137, 2003).

[014] O objetivo de qualquer protocolo de criopreservação é prevenir a formação letal de cristais de gelo intracelular, controlar grandes flutuações em seu volume e reduzir o dano da membrana que acompanha as mudanças de fases induzidos por baixas temperaturas (GÓNGORA, A.; CAPILLA, G.; TREJO, P. Criopreservación espermática, impacto sobre la tasa de sobrevivencia y su repercusión al futuro. **Acta médica**. v. 1, n. 3, p. 132-137, 2003). O processo de criopreservação requer a seleção de um meio de conservação e crioprotetor apropriados, a determinação adequada das taxas de

congelação e descongelação e escolha de um procedimento para remover substâncias que afetem a capacidade fertilizante (BUSS, E.G. Cryopreservation of roost ersperm. **Poultry Science**, v.72, p.944-954, 1993).

[015] Nos últimos anos, diversos protocolos foram testados e ajustes foram feitos para melhorar os protocolos de criopreservação seminal. O armazenamento em nitrogênio líquido (-196 ºC) tornou-se o método padrão, nesta temperatura, as células não têm energia suficiente para realizar as reações fisiológicas. Assim, a criopreservação é adequada para armazenamento em longo prazo (PUNYATANASAKCHAI, P. *et al.* Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen: effect on motility parameters, morphology, and sperm function. **Fertility and Sterility**. v.90, n.5, p.1978-1982, 2008).

[016] Varias técnicas de criopreservação diferentes são utilizadas desde processos de diminuição lenta de temperatura até processos ultra-rápidos como a vitrificação, visando minimizar os danos celulares causados (BOITRELLE, F. *et al.*Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. **Journal of Andrology**, 2012). A técnica de congelação lenta consiste de arrefecimento progressivo espermatozoides durante um período de 2-4 h, em dois ou três passos, manualmente ou automaticamente, utilizando um congelador semiprogramável. Apesar de relatórios que mostram o sucesso com técnicas manuais, a reprodutibilidade deste procedimento pode representar alguns problemas (DI SANTO *et al.*Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Advances in Urology**, 2012).

[017] A congelação rápida foi proposta por Sherman em 1973 (Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. **Fertility and Sterility** 1973; 24:397-412). Esta técnica requer o contato direto das amostras com os vapores de nitrogênio e posterior imersão em nitrogênio líquido a -196 ºC. Esta técnica tem alguns inconvenientes, entre os quais, por exemplo, baixa reprodutibilidade, a curva de queda de temperatura não pode ser controlada e as temperaturas de congelação podem variar bastante (DI SANTO *et al.*Human Sperm

Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Advances in Urology**, 2012).

[018] Um dos fatos importantes para o avanço desta tecnologia é a utilização do glicerol como crioprotetor com posterior armazenamento em nitrogênio liquido, que permitiu a longevidade das amostras que passam a ser estocadas por longos períodos, transpondo barreiras da infertilidade masculina (HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000).

[019] A composição do meio utilizado nos protocolos de criopreservação é um dos fatores que afetam a proporção de espermatozoides vivos após os procedimentos de congelação-descongelação. Desta forma, faz-se necessária a adição, dentre outras substâncias, de crioprotetores que demonstrem eficiência no processo de criopreservação de sêmen, no que diz respeito à sobrevivência espermática. Um bom diluente deve ter as seguintes características: proporcionar nutrientes como fonte energética, proteger os espermatozoides do efeito deletério das baixas temperaturas, proporcionar um meio tampão, manter a pressão osmótica adequada, inibir o crescimento bacteriano e aumentar o volume do ejaculado (HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ª ed., 2004, 513 p, Editora Manole, Barueri-SP).

[020] Em geral, os meios para congelação possuem em sua composição uma fonte de energia (glicose ou frutose), um componente tampão (citrato de sódio ou tris – hidroximetilaminometano), um crioprotetor intracelular ou permeável, para proteger os espermatozoides durante o congelação (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol), carboidratos (lactose, rafinose), antibiótico para prevenir o crescimento bacteriano (penicilina, estreptomicina, gentamicina) e uma substância orgânica que atua como crioprotetor extracelular ou impermeável e que protege as células contra o choque térmico que se produz ao refrigerar o sêmen (gema de ovo ou leite desnatado), estas substâncias devem possuir como propriedades uma baixa toxicidade para as células e alta solubilidade em água (VIEIRA, M.A.F. Comparação entre duas técnicas de descongelação de sêmen humano normozoospérmico de indivíduos férteis e inférteis:

estudo duplo-cego prospectivo. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Minas Gerais – Faculdade de Medicina**. Belo Horizonte-MG. 76f. 2010).

[021] Crioprotetores são substâncias de baixo peso molecular e produtos químicos altamente permeáveis utilizados para proteger os espermatozoides de possíveis danos causados pelo processo de criopreservação por cristalização de gelo atuando através da diminuição do ponto de congelação de uma substância, reduzindo a quantidade de sais e solutos presentes na fase líquida da amostra e diminuindo a formação de gelo dentro dos espermatozoides. A eficácia de substâncias crioprotetoras é também uma função do tempo de interação entre os crioprotetores e as células (DI SANTO *et al.*Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Advances in Urology**, 2012).

[022] O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para espermatozoide humano atuando na permeabilidade de membrana, tanto na estrutura como na estabilidade da bicamada lipídica, na associação de proteínas de superfície e do metabolismo celular. Em contrapartida sua utilização pode desencadear um resultado desfavorável na membrana e estrutura do acrossoma (DI SANTO *et al.*Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Advances in Urology**, 2012).

[023] Prins e Weidel (1986) (PRINS, G.S.; WEIDEL, L.A comprehensive study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.46, p.147-149, 1986), compararam oito crioprotetores para a criopreservação de sêmen humano, sendo que o TES - tampão citrato - gema com 6% de glicerol foi o que apresentou os melhores resultados quanto à viabilidade espermática no pós-descongelação. Em outro estudo comparativo com 12 tipos de meios, a melhor motilidade pós-descongelação foi obtida com o meio de congelação enriquecido com gema-citrato-dextrose-glicina e com 7,5% de glicerol (HAMMADEH, M. E. Evaluation of Cryoinjury of Spermatozoa After Slow (Programmed Biological Freezer) or Rapid (Liquid Nitrogen Vapour) Freeze–Thawing Techniques. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Vol. 18, No. 7, 2001).

[024] A incubação de sêmen utilizando meio enriquecido com gema de ovo que é um composto de lipoproteínas, fosfolipídios, colesterol, e vários outros componentes menos abundantes combinado com dois tampões (ácido sulfídrico N-tris (hidroximetila) metila-2-aminoetano - TES e TRIS), conhecido como *Test YolkBufffer* – TYB, tem mostrado aumento da penetração espermática para a criopreservação de sêmen com uma boa taxa de recuperação pós-descongelação (HAMMADEH, M. E. Evaluation of Cryoinjury of Spermatozoa After Slow (Programmed Biological Freezer) or Rapid (Liquid Nitrogen Vapour) Freeze–Thawing Techniques. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Vol. 18, No. 7, 2001).

[025] Também é comumente utilizado pelos laboratórios o crioprotetor a base de glicerol, gema de ovo e citrato (GEYC), que é preconizado pelo manual da OMS, onde foram descritas tanto a sua confecção como o protocolo de criopreservação adaptada para sua utilização (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. **Geneva: World Health Organization**,5th ed, 2010).

[026] A gema de ovo é um importante componente dos diluentes para a criopreservação de sêmen, pois atua como um crioprotetor externo ou não-penetrante, prevenindo possíveis danos provocados pelo choque térmico durante o processo de curva de congelação-descongelação (SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, 38, 1995, 1-36). Entretanto, a utilização de diluentes contendo gema de ovo apresenta desvantagens, tais como a opacidade óptica causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato à avaliação microscópica. Além disso, pode provocar prejuízos à respiração do espermatozoide, diminuição da motilidade e ainda transportar micro-organismos patogênicos (MARTIN, C. E. G., Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados. **Universidade Federal de Pelotas. Programa de pós-graduação em Veterinária**. Dissertação de mestrado. 2005. 20 pág., Pelotas-RS).

[027] Muitos meios crioprotetores diferentes têm sido desenvolvidos em um esforço de eliminar ou minimizar os efeitos da criopreservação em espermatozoides humanos e estudos tem avaliado e comparado diferentes meios para a recuperação da motilidade espermática (MURIEL L, et al. Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis. **Mol Hum Reprod**;10:203–9, 2004). Estes meios devem conter substâncias que mantenham as características dos espermatozoides, como: número, motilidade, vitalidade, e que induzam menos reação acrossômica e imunológica. Sua composição deve conter sais e proteínas na quantidade certa para conservação do sêmen, a fim de manter o equilíbrio físico-químico necessário à sobrevivência dos espermatozoides, não sendo tóxico e mantendo o pH e a osmolaridade fisiológicas (NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias Belém**, n.43, supl, 2006).

[028] O *Cocosnucifera* L. é da família Arecaceae, subfamília Cocosidea, família Palmea (coqueiro) é composta por algumas variedades, entre as quais, as mais importantes, do ponto de vista agronômico, sócioeconômico e agroindustrial são: *Typica* (variavel Gigante) e *Nana* (variavel Anã). Árvore de porte alto, monocotiledônea de países tropicais que teve a sua origem e cultivo na costa e ilhas da zona tropical. Pode alcançar uma altura de aproximadamente 30 m e viver em torno de 90 anos (BASTOS, H.I.G. et al. The effect of a natural solution of coconut water on the macrophage cultures: a morphological analysis. **Research Journal of Biological Sciences**, v.3, n.12, p.1437-1443, 2008).

[029] Constitui-se de uma das mais importantes das culturas perenes, capaz de gerar um sistema autosustentável de exploração, como ocorre em vários países, principalmente no continente asiático, pois sua estabilidade de produção ocorre entre 12 a 15 anos de idade e produz cocos continuamente por cerca de 70 anos, 12 a 13 vezes por ano (ARAGÃO, W.M. Água de coco. Brasília, **DF: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2001).

[030] As Filipinas e a Indonésia produzem 13 milhões de toneladas/ano e a Índia 9 milhões de toneladas/ano, explorando o coqueiro basicamente para produção de copra (albúmen sólido desidratado a 6%) e óleo, sendo considerados os principais produtores de coco mundiais (FAO. Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration. Adopted by the **International Technical Conference on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture**. FAO, Rome, Italy. 2003).

[031] No Brasil, o coqueiro está presente em 280 mil hectares, com aproximadamente 1,92 milhões de frutos produzidos. A produção brasileira se estende por uma área de 300 mil hectares, sendo os Estados de Sergipe, Bahia e Alagoas os maiores produtores, respondendo por 75% do total do país (LAGUNA, LE. Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (Cocos nucifera, l.) coco da praia e anão. **Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE**, 1996).

[032] Apesar de o coqueiro ser uma planta de múltipla utilidade, seus principais produtos são extraídos do fruto, como a copra, o óleo, o ácido láurico, a farinha do endosperma sólido, o leite de coco, a fibra, a ração animal e a água de coco (Almeida R, Soares AEE. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (Apismellifera; HYMENOPTERA: APOIDEA). **Interciencia** 202; 27:317-321). É considerado o terceiro cultivar de frutas em área plantada no Brasil, e importante fruta da pauta nacional de exportações (PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of Coffea canephora. **Annals of Botany**, v. 96, n. 01, p. 101-108, 2005).

[033] O líquido endospérmico do coco, popularmente conhecido como água de coco, é muito rico em propriedades nutricionais e terapêuticas sendo encontrado no coco pouco antes da fase de maturação, de sabor doce, considerada uma solução natural, estéril e ligeiramente ácida, apresentando um valor de pH na faixa de 4.0 a 5.6, que oscila de acordo com a idade do fruto, variedade e grau de maturação (CHUMBIMUNI-TORRES, K.Y.; KUBOTA, L.T. Simultaneous determination of calcium and potassium in coconut water by a flow-injection method with tubular potentiometric sensors. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.225-230, 2006).

[034] Com aproximadamente seis a oito meses de idade o coco contém aproximadamente 400 ml de água, 25% do peso do fruto. A água de coco contém fatores de crescimento, proteínas, sais, alcoóis, carboidratos, vitaminas, gorduras neutras e minerais. Sua composição básica possui eletrólitos diversos que promovem pressão osmótica, pH e densidade similar à observada no sangue, podendo ser utilizada na reposição dos eletrólitos eliminados pelo suor como sódio, potássio, magnésio e cálcio. Por ser isenta de pirogênicos e não causar hemólise tanto *in vivo* quanto *in vitro,* pode ser usada também como infusão intravenosa em quadros que necessitem reposição de carboidratos (ARAGÃO, W.M. Água de coco. Brasília, **DF: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2001).

[035] Os carboidratos contidos na água de coco de frutos frescos são predominantemente frutose e glicose (redutores), que com o avanço do estádio de maturação são transformados em sacarose (não-redutor) (ARAGÃO, W.M. Água de coco. Brasília, **DF: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2001).

[036] Os produtos químicos pertencentes ao coco despertam o interesse da indústria e comércio, pois são essencialmente um potencial aditivo alimentício que age como antioxidante natural. Esses produtos conferem o aroma à água de coco e são os alcoóis, cetonas, lactonas, aldeídos e ésteres, todos com cadeia curta de carbono, enquanto que o sabor tem como responsável o éster n-propiletanoato (FONSECA, A.M. *et al.* Coconut water (*Cocosnucifera* L.) – A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journalof Molecular Catalysis B: Enzimatic**, 2008).

[037] Na Índia, foram isoladas e identificadas substâncias como citocininas endógenas e a presença de zeatinaribosídeo e giberelinas, além do ácido-3-indol acético (IAA), do grupo das auxinas, sendo essa uma substância com atividade hormonal estimuladora do crescimento dos vegetais e que possui ação sobre o metabolismo dos espermatozoides (NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 2, p. 109-112. 1998).

[038] Além das funções relacionadas com a planta, verificou-se que algumas citocininas e alguns de seus derivados poderiam ser utilizados em aplicações médicas, como a supressão de crescimento de tumores em mamíferos, prevenção de formação de coágulos no sangue e retardo no envelhecimento do fibroblasto humano (GE, L.; YONG, J. W. H.; TAN, S. N.; YANG, X. H.; ONG, E. S. Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (Cocos nucifera L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**. 1133: p. 322-331, 2006).

[039] Há anos a água de coco vem sendo utilizada pela cultura popular como bebida capaz de combater a desidratação, sendo considerado por estudos recentes um importante repositor de eletrólitos. Assim, tem-se levantado a possibilidade do seu uso na reidratação, em casos de diarreia crônica, devido à quantidade de potássio e a presença de glicose (KUBERSKI, T. *et al.* Coconut water as a rehydration fluid. **New Zeland Medical Journal**, Wellington, v.641, n.90, p.98-100, 1979). Em virtude disso, ela tem sido recomendada para repor a perda de líquidos do trato gastrointestinal (KHAN, M.N.; MUTI, U.R.; KHAN, K.W. A study of chemical composition of Cocosnucifera L. (coconut) water and its usefulness as rehydration fluid. **Pakistan Journal of Botany**. v. 35, n. 5, p. 925-930, 2003). Sua utilização como solução no tratamento da desidratação grave ou desnutrição proteica de crianças e idosos ocorre devido à sua composição semelhante ao soro glicosado isotônico (LAGUNA, LE. Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades (Cocos nucifera,l.) coco da praia e anão. **Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE**, 1996).

[040] A água de coco *in natura* proveniente de frutos com idade de seis meses (variedade verde da praia ou anão maduro) apresenta uma osmolaridade de aproximadamente 500 mOsm/Kg $H_2O$ e um pH entre 4,5 e 5,0. No entanto, a utilização da água de coco como diluente se depara com algumas dificuldades de ordem prática, tais como a disponibilidade de frutos com características ideais e a impossibilidade de armazenamento do produto (UCHÔA, D. C. Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluentes à base de água de coco. Fortaleza, 2004. Tese _ **Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará – UECE**. 2004).

[041] Os métodos de conservação devem objetivar a inibição da atividade enzimática e a garantia da qualidade microbiológica após a abertura do fruto, observando-se a manutenção e, o máximo possível, das características sensoriais originais (MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C.D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.72-77, 2005).

[042] O perfil nutricional da água de coco sofre variações significativas de acordo com os estádios de maturação do fruto (VIGLIAR, R.; SDEPANIAN, V. L.; FAGUNDES-NETO, U. Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in aninland region. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 4, p. 308-312, 2006), a variedade da espécie cultivada (JACKSON, J. C. *et al.* Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.9, n.84, p.1049-1052, 2004) e a composição do solo onde a planta é cultivada (KHAN, M.N.; MUTI, U.R.; KHAN, K.W. A study of chemical composition of Cocos nucifera L. (coconut) water and its usefulness as rehydration fluid. **Pakistan Journal of Botany**. v. 35, n. 5, p. 925-930, 2003). Até mesmo o índice de poluição do solo e do ambiente incide sobre sua composição (PETROIANU, G. A.; KOSANOVIC. M.; SHEHATTA, I. S.; MAHGOUB, B.; SALEH. A.; MALECK, W. H. Green coconut water for intravenous use: trace and minor lement content. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, New York, v. 17, n. 4, p. 273-282, 2004).

[043] A água de coco tem sido amplamente utilizada em biotecnologias relacionadas à reprodução animal bem como outros setores biotecnológicos. Como alternativa de diluente pobre em fosfolipídios, a água de coco apresentou excelente comportamento na preservação da viabilidade espermática e fertilidade, aumentando a vida útil e a motilidade dos espermatozoides (NUNES, J.F. *et al.* Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação in vitro e avaliação in vivo do sêmen na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.2, p.34, 1996).

[044] Em virtude dessa potencialidade, ela foi testada como diluente para sêmen de diversas espécies em diferentes formas: (a) *in natura* (ACIN), constituída por 50% de

água de coco filtrada + 25% de água destilada + 25% de solução de citrato de sódio a 5% (TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.I.; CAVALCANTE, S.G. Avaliação *in vitro* do sêmen suíno em BTS e na água de coco in natura e estabilizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.4, p. 198-201, 1998); (b) estabilizada (ACE), que é a ACIN envazada, passada por um processo de esterilização por ultrafiltração, através de membranas com microporos (ARAGÃO, W. M. (Ed.) COCO: pós-colheita. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 76 p, 2002) e mantida em refrigeração; (c) liofilizada (ACL), em que o produto é congelado e a água é retirada por sublimação; (d) sob forma de gel (ACG) (SALLES, M. G. F. Água de coco (Cocos nucifera L.) in natura e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino. Porto Alegre. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 54p. 1989); (e) em pó (ACP), obtida por meio da desidratação a alto vácuo, método que produz um pó com menos de 5% de umidade (SALGUEIRO, C.C.M; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, R.V. et al. Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) ou TRIS, resfriado e mantido a 4ºC por 24 horas. **In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 17.,Curitiba, 2007. p.149).

[045] A utilização da água de coco como diluente seminal e posterior utilização em técnicas de reprodução animal assistida, como inseminações artificiais em diferentes espécies, dentre elas, caprinos (SALLES, M. G. F. Água de coco (Cocos nucifera L.) in natura e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor do sêmen caprino. Porto Alegre. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 54p. 1989), ovinos (SOUSA, N. M.; TEIXEIRA, M. D. A.; OLIVEIRA, L. F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidor do sêmen ovino. In: **ANAISdo CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**,Olinda, p. 583, 1994), suínos (TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M. Fertility of sows inseminated with diluted semen in coconut water or B.T.S. extender. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, p. 249-254, 1990), caninos (MONTEZUMA Jr., P.A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco "in natura", com adição de gema de ovo, como diluente de congelação do sêmen canino, em pallets de 0,5 ml. In: **ANAIS do CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, Olinda, p.535, 1994), peixes de água doce

(Farias JO, Nunes JF, Carvalho MAM. Avaliação "in vitro" e "in vivo" do sêmen de Tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER) conservado à temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal** 1999; 1:44-58.), galos (BLESBOIS, E.; SOUSA, F.M.; GRASSEAU, I. Effects of 3-indole acetic acid (IAA) on the storage at 4º Cof fowl sperm. **In: WORLD'S POULTRY CONGRESS**, 20., 1996, New Delhi. New Delhi: WPC, 1996.), capotes (Souza NM, Teixeira MDA, Oliveira LF. Água de coco sob a forma de fração ativada liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidores do sêmen ovino. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Olinda, Brazil: Conselho Federal de Medicina Veterinária; 1994: 576) e abelhas (ALMEIDA, R.; SOARES, A.E.E. Usage of Green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (Apismellifera; HYMENOPTERA: APOIDEA). **Interciencia,** v.27, n.6, p.317-321, 2002).

[046] Além de diluente seminal, a água de coco mostrou ser eficiente como meio de cultura para a criopreservação de embriões murídeos, cultivo de embriões murídeos e bovinos e ainda na maturação de ovócitos bovinos. A água de coco favorece a clivagem celular no cultivo de embriões murídeos no estágio de uma célula e mantém a integridade celular após a congelação-descongelação de embriões de camundongas. Esses efeitos podem ser devidos à rica composição em carboidratos, aminoácidos e proteínas presentes na água de coco (BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, p.97-104, 1994; BLUME, H.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES Jr, A.P. Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.79-81, 1997).

[047] Com relação a estudos da água de coco na reprodução humana assistida, foram realizados estudos no Hospital Bretaneau em Tours (França), em 1995, com indivíduos oligozoospérmicos que serviram como doadores de sêmen. O estudo consistia na incubação do sêmen a 37 ºC após diluição em diferentes meios com diferentes doses de IAA. Foi observado o movimento do flagelo, bem como a velocidade do espermatozoide em um determinado tempo e foram obtidos valores superiores para todas as doses de IAA diluído em água de coco em relação ao diluente padrão (NUNES, J.F.;

COMBARNOUS, Y. Utilização Da Água De Coco E Suas Frações Ativas Como Diluidor Do Sêmen De Mamíferos Domésticos. **In: Simpósio Nacional De Biotecnologia Da Reprodução De Mamíferos Domésticos, 1., Anais... Fortaleza**, 1995, P. 57-63. 1995.)

[048] Devido à grande quantidade de potássio, cálcio e magnésio e do aminoácido arginina que estão contidos na composição da água de coco verde, o seu consumo regular tem a capacidade de reduzir o risco de doenças coronarianas. Com este propósito, foi estudado o efeito cardioprotetor da água de coco verde em infartos do miocárdio induzidos experimentalmente em ratos, sendo obtidos resultados satisfatórios (ANURAG, P.; RAJAMOHAN, T. Beneficial effects of tender coconut water against isoproterenol induced toxicity on heart mitochondrial activities in rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v.40, n.4, p.278-280, 2003). No ramo de estudos biotecnológicos baseados em química orgânica sintética, a água de coco vem sendo estudada e elaborada como biocatalizador em processos de redução e reações hidrolíticas, com excelentes resultados (FONSECA, A.M. *et al.*Coconut water (*Cocos nucifera* L.) – A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journalof Molecular Catalysis B: Enzimatic**, 2008).

[049] O conservante à base de água de coco para córnea de coelhos não apresentou qualquer alteração após uso prolongado (até 14 dias), comprovada sua higidez frente aos exames biomicroscópicos (*in vivo*) e histopatológico (NOGUEIRA, R.D.M.; VASCONCELOS, P.R.L. Água de coco como meio de cultura em conservante de córnea: estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v.59, n.6, p.395-401, 2000). Foi utilizada por Gopikrishna, Thomas e Kandaswamy (2008), como meio de conservação para dentes destinados a implantes, com excelentes resultados. Outros estudos com água de coco como meio de conservação para dentes destinados à implantes foram realizados por Moreira-Neto *et al.* (2009), avaliando a viabilidade dos fibroblastos (GOPIKRISHNA, V.; THOMAS, T.; KANDASWAMY,D. A quantitative analysis of coconut water: an new storage media for aulsed teeth. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics**, n.105, p.e61-e65, 2008; MOREIRA-NETO, J.J.S. *et al.* Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **International Endodontic Journal**, v.42, n.9, p.827-830, 2009).

[050] Desde 1997 iniciou-se um estudo que levou à padronização do fruto que seria o ideal para a utilização em processos biotecnológicos. Uma vez selecionado o fruto ideal, buscou-se a estabilização da água de coco, fato logrado no início de 2002. Salgueiro *et al.* (2002; PI0203590-1) desenvolveram um produto à base de água de coco, padronizado na forma de pó, permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se disponham do fruto, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias.

[051] Tal fato propiciou a padronização dos meios de conservação até então em estudo, não só para sêmen como para outros tipos celulares. Esses meios de conservação devem levar em conta as características de pH, osmolaridade e composição que possam influenciar diretamente a capacidade de manter as células viáveis após certo tempo. Em relação a pH e osmolaridade, quanto mais próxima às condições fisiológicas (300 mOsm/Kg $H_2O$; pH 7,0), melhor a capacidade do meio para preservar a vitalidade da células (MOREIRA-NETO, J.J.S. *et al.* Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **International Endodontic Journal**, v.42, n.9, p.827-830, 2009).

[052] Já que as amostras são diretamente secas e transformadas em pó, as reações são inibidas pela mudança de fase e, portanto, mantêm inalterada todas as suas qualidades. Os cálculos de rendimento permitem restituir, quando de sua reconstituição em água destilada, os parâmetros originais do líquido endospérmico exigidos na manutenção de suas propriedades. O produto básico (líquido endospérmico do coco), em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, e supera toda e qualquer tecnologia de conservação, uma vez que mantém as propriedades inerentes do produto original. A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva à manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco (NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.43, supl, 2006).

[053] Diversos estudos utilizando a ACP têm sido publicados na literatura: Criopreservação de sêmen canino em ACP-106 para posterior inseminação artificial

(CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine sêmen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.384-391, 2006).

[054] Meio de conservação ACP-201 de vírus em vacinas aviárias por via ocular (SOBRAL, M.H.N.R. Avaliação do diluente ocular a base de água de coco na forma em pó, para as vacinas contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, doença de Newcastle e doença infecciosa da bolsa pela mensuração da resposta imune humoral em frangos de corte. Fortaleza, 2005. 113p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará - UECE),** 2005).

[055] Meio de conservação ACP-201 para vacinas vivas contra vírus de Newcastle em pombos domésticos (*Columbalivia*) criados em cativeiro (CARDOSO, W.M. *et al.* Powdered coconut water – ACP 201® as vaccinal diluent to Newcastle Disease Virus in domestic pigeons (*Columba livia*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p.57-60, 2006).

[056] Efeito da re-diluição pós-descongelação sobre a cinética e morfologia de espermatozoides caprinos congelados em a ACP-101 ou TRIS (OLIVEIRA, R.V. Efeitos de meios de re-diluição pós-descongelação sobre a cinética e morfologia de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS. Fortaleza, 2007. 138p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza)**, 2007).

[057] Estudo *in vitro* do ACP-108 como meio de conservação de sêmen refrigerado de capotes (*Numidameleagris*) (RONDON, R.M.M. *et al.* Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozoides de capote (*Numidameleagris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.4, p.848-854, 2008).

[058] Meio de criopreservação ACP-117 para sêmen de gatos e inseminação artificial intravaginal (SILVA, T.F.P. **Avaliações andrológicas, métodos de coleta e tecnologia do sêmen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-**

**117®).** Fortaleza, 2008. 164p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2008).

[059] Estudo comparativo entre ACP-102c e TRIS na criopreservação do sêmen de ovinos (CAVALCANTE, J.M.M. **Avaliação do sêmen ovino diluído e congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) ou TRIS**. Fortaleza, 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará – UECE), 2008).

[060] ACP-318 como meio de maturação de oócitos caninos (SILVA, A.E.F. *et al.* The influence of powdered coconut water (ACP-318®) in *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01487.x, 2009).

[061] Estudo da cinética de espermatozoides de Pirapitinga (*Piaractus branchypomus*) criopreservados em ACP-104 e outros meios (PESSOA, N.O. Avaliação científica do sêmen de Pirapitinga (Piaractus brachypomus) congelado à base de água de coco em pó (ACP-104®) ou Ringer em três meios de ativação. Fortaleza, 2009. 44p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará - UECE**, 2009).

[062] Meio de conservação ACP-101 adicionado de *Aloe vera* na refrigeração do sêmen caprino a 4ºC (MELO, M.A.P. **Água de coco em pó (ACP-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozoides de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós-descongelamento**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. 2010. 63p).

[063] Meio de conservação de folículos pré-antrais caninos (LIMA, G.L. *et al.* Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP®)-based medium. **Theriogenology**, v.74, p.146-152, 2010).

[064] Meio ACP-104 na criopreservação de sêmen de peixe de água doce (Curimba) (VIVEIROS, A.T.M. *et al.* Motility and fertility of subtropical fresh water fish

streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**. v.74, n.4, p.551-556, 2010).

[065] Avaliação do meio de conservação ACP-108 de sêmen de galos (*Gallusgallus*) e capotes (*Numida meleagris*) (LAVOR, C.T.B. Avaliação do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-108) sobre a qualidade do sêmen de galos (*Gallusgallus*) e capotes (*Numida meleagris*). **Tese (Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Estadual do Ceará**, 2011).

[066] O processo de produção de água de coco em pó, o qual já possui pedido de patente (PI1002346-1; PCT/BR 2011/000228), se baseia numa sequência de procedimentos. Conforme a finalidade do produto, o fruto é selecionado em função de suas propriedades físico-químicas, como: volume, peso, diâmetro do albúmen, pH, osmolaridade, teor de carboidratos, teor de aminoácidos, teor de minerais, dentre outros. A obtenção do fruto é iniciada pela rigorosa seleção e higienização do mesmo, seguida de colheita do líquido endospérmico do coco (água de coco), de forma asséptica, realizada amostragem após a filtração. O líquido filtrado é homogeneizado e inserido em sistema de secagem. Submetidas a um tratamento térmico, a mostra é seca e transformada em um pó, destituído de água livre, com alta solubilidade (NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.43, supl, 2006).

[067] Tal processo está baseado na padronização e estabilização da água de coco na forma de pó (ACP) e na subsequente formulação dos meios de conservação, onde são acrescentados aditivos específicos, dependendo do tipo de material biológico a ser conservado. Referidos meios poderão ser utilizados para a conservação celular de todas as espécies animais, incluindo o homem (NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.43, supl, 2006).

[068] O produto básico (líquido endospérmico do coco), em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, e

supera as tecnologias de conservação conhecidas, uma vez que mantém as propriedades inerentes do produto original. A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva à manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco (NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.43, supl, 2006).

[069] Nunes e Salgueiro (2006) descrevem alguns produtos à base de água de coco em pó que já se encontram em fase experimental: meio para desenvolvimento de células germinais; meio de manutenção, crescimento e maturação celular; meio de capacitação espermática; meio de lavagem celular; meio de coleta, lavagem, cultivo, manutenção e criopreservação para embriões; meio de criopreservação espermática; meio de criopreservação de ovócitos; meio de conservação e criopreservação de tecidos; meio de conservação e criopreservação de órgãos para transplante; meios de cultivo de micro-organismos (fungos, bactérias, vírus), protozoários e insetos; geles associados a biopolímeros para uso médico e veterinário na elaboração de membranas de hidrogel substitutivas; produtos cerâmicos para próteses ósseas e dentárias; como biomaterial; produtos de confeitaria; bebidas isotônicas, repositores energéticos, alimentos funcionais, produtos nutricionais para pacientes hospitalares; produtos cosméticos; juntamente com frutas e/ou verduras naturais, produtos de confeitaria, bebidas isotônicas, repositores energéticos, alimentos funcionais, produtos nutricionais para pacientes hospitalares e de produtos cosméticos (ou seja, antes de ser transformada em pó, a água de coco é acrescida de proporções variáveis de frutos e/ou verduras naturais, fazendo com que os valores nutricionais desses produtos sejam agregados aos da água de coco) (NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.43, supl, 2006).

[070] Neste contexto, Salgueiro em2006 desenvolveu um diluente de sêmen humano à base de água de coco, sendo este padronizado na forma de pó (ACP-113), permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se disponham do fruto (NUNES, J.F., SALGUEIRO, C.C.M. A água de

coco em pó como diluidor do sêmen de animais domésticos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n.43, supl, 2006).

[071] Após a formulação inicial do meio para sêmen humano à base de água de coco em pó, foi realizado estudo preliminar de seu uso na refrigeração a 4 °C do sêmen humano, não tendo sido submetido a quaisquer protocolos de congelação (FAUSTINO *et al.* Meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-113) na refrigeração a 4° C do sêmen humano - Estudo preliminar. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Humana**, 2006, Curitiba. Congresso Brasileiro de Reprodução Humana. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2006. v.22).

[072] Na sequência foi conduzido um estudo piloto com o uso de diluente à base de água de coco em pó na congelação do sêmen humano. O diluente ACP-113 utilizado na época consistia em uma formulação com pH 7,35 e 300 mOsm/kg $H_2O$ acrescida de 2,5% de gema de ovo, distinta da utilizada atualmente (pH 7,4 e 354 mOsm/Kg $H_2O$ com 20% de gema de ovo). Os protocolos de congelação utilizados diferem completamente. Além do que o estudo realizado resultou em menos de 5% de espermatozoides viáveis pós-descongelação, não tendo aplicação prática comercial em programas de conservação de germoplasma ou reprodução assistida (inseminação artificial ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides) (Luciana Rocha Faustino. Sêmen humano criopreservado em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-113®). 2007. 58f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Ciências Biológicas).

[073] No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir:

[074] O documento PI0203590-1 revela um meio de conservação de células espermáticas e processo para obtenção de fração constituinte do meio de conservação de células espermáticas. O meio de conservação à base de água de coco em pó formulado difere deste documento com relação aos reguladores de pH e osmolaridade, além de não terem sido acrescidos de gema de ovo e crioprotetores.

[075] O documento PI0401254-2 revela um processo de beneficiamento do líquido endospérmico do coco para a produção de água de coco em pó o qual utilizava o sistema de *spray dryer* para a liofilização do produto. A água de coco em pó resultante desse processamento piloto inicial difere deste documento por ter sido processada de maneira distinta da atual.

[076] O documento PI0505920-8 revela uma composição cicatrizante à base de água de coco em pó. O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[077] O documento US 3,005,756 revela um diluente de sêmen compreendendo dióxido de carbono. O diluente da presente invenção difere deste documento por compreender substancialmente água de coco em pó e gema de ovo.

[078] O documento US 3,472,735 descreve uma composição para inseminação artificial compreendendo sêmen, diluído em tiamina. A presente invenção difere deste documento por apresentar um diluente de sêmen humano à base de água de coco em pó e gema de ovo.

[079] O documento US 2003/0077566 A1 revela um meio de criopreservação e cultura de tecidos de mamíferos, preferencialmente sêmen, à base de vegetais, preferencialmente soja. A presente invenção difere deste documento por apresentar um diluente de sêmen humano à base de água de coco modificada por liofilização (em pó) acrescida de gema de ovo, modificação que proporciona propriedades melhoradas de seus ácidos, se comparado com o uso da água de coco *in natura*.

[080] O documento 00002210108827418 depositado no INPI em 21/12/2010 refere-se a um processo de manipulação do sêmen bovino visando à re-diluição deste congelado-descongelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-111). O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[081] O documento 0000221010886228 depositado no INPI em 30/12/2010 refere-se ao uso da água de coco em pó (ACP) ou desidratada como adjuvante para vacinas

aviárias, particularmente, para vacinas vivas aviárias aplicadas por diferentes vias. O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[082] O documento 0000221010886120 depositado no INPI em 30/12/2010 refere-se ao uso da água de coco em pó (ACP) ou desidratada como meio de manutenção e/ou crescimento celular, preferencialmente para células $C_{6/36}$ (*Aedes albopictus*). O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[083] O documento 0000221010886066 depositado no INPI em 06/01/2011 refere-se ao uso da água de coco em pó (ACP) ou desidratada como diluente para a conservação do sêmen fresco, refrigerado ou congelado de canídeos domésticos e selvagens em programas de reprodução animal assistida. O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[084] O documento 0000221101437558 depositado no INPI em 06/04/2011 refere-se ao uso da água de coco em pó (ACP) ou desidratada, adicionada de crioprotetores, como diluente para a conservação do sêmen congelado de canídeos domésticos e selvagens em programas de reprodução animal assistida. O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[085] O documento 0000221010886023 depositado no INPI em 05/07/2011 refere-se à meios de cultivo e isolamento de bactérias, particularmente ao uso da água de coco desidratada para esse fim, assim como composições dos meios de cultivo e isolamento contendo água de coco desidratada suplementada com fontes nitrogenadas. O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[086] O documento 0000221108279923 depositado no INPI em 20/09/2011 refere-se ao uso da água de coco em pó (ACP) ou desidratada como diluente para a conservação do sêmen fresco, refrigerado ou congelado de aves domésticas e exóticas em programas de reprodução animal assistida. O produto resultante difere deste documento por compreender formulação e uso distintos do da presente invenção.

[087] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta ao olhar dos inventores possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[088] Em um aspecto, a presente invenção proporciona o uso de água de coco liofilizada como diluente para conservação de sêmen humano. A novidade da presente invenção está centrada no fato de que se utiliza de um composto recentemente desenvolvido, a água de coco liofilizada, como diluente de sêmen humano (ACP-113), dada suas vantagens quanto à durabilidade, quando comparada à água de coco *in* natura e a outros diluentes convencionais.

[089] É um dos objetos da presente invenção um processo de diluição de sêmen humano compreendendo a etapa de misturar ao sêmen:

i) de 3% a 15%, de água de coco substancialmente liofilizada;

ii) de 2% a 30% de gema de ovo;

iii) de 0% a 21% de crioprotetores isolados ou em combinação; e

iv) água ultra pura (Milli-Q) ou bidestilada ou destilada, em uma taxa de diluição média de cerca de 4:1 a cerca de 1:4 (sêmen:diluente).

[090] Em uma realização preferencial, a proporção de água de coco substancialmente liofilizada em (a) é de 8,22%.

[091] Em uma realização preferencial, a proporção de gema de ovo em (b) é de 20%.

[092] Em uma realização preferencial, os crioprotetores em (c) são selecionados do grupo que compreende glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol, propanodiol, propilenoglicol, metanol, metilformamida, dimetilformamida, dimetilacetamida, ficoll, dextranos, polivinilpirrolidona, hidroxitoluenobutilado, álcool polivinílico, trealose, rafinose, lactose, sacarose, glicose, frutose e combinação dos mesmos.

[093] Em uma realização preferencial, a taxa de diluição de (d) é de 1:1 (sêmen:diluente).

[094] Em uma realização preferencial, o diluente possui pH variando entre 6.8 e 7.8.

[095] Em uma realização preferencial, o diluente possui osmolaridade variando entre 280 e 400 mOsm/Kg $H_2O$.

[096] Em uma realização preferencial, a mistura é acondicionada em criotubos estéreis de 2 ml de capacidade.

[097] É um objeto adicional da presente invenção o processo de criopreservação de sêmen humano compreendendo as etapas de:

[098] a) diluir o sêmen humano em:

i) de 3% a 15%, de água de coco substancialmente liofilizada;

ii) de 2% a 30% de gema de ovo;

iii) de 0% a 21% de crioprotetores isolados ou em combinação; e

iv) água ultra pura (Milli-Q) ou bidestilada ou destilada, em uma taxa de diluição média de cerca de 4:1 a cerca de 1:4 (sêmen:diluente).

[099] b) acondicionar a mistura a uma temperatura entre cerca de 37ºC e cerca de 4ºC.

[100] Em uma realização preferencial, a proporção de água de coco substancialmente desidratada em (i) é de 8,22%.

[101] Em uma realização preferencial, a proporção de gema de ovo em (ii) é de 20%.

[102] Em uma realização preferencial, os crioprotetores em (iii) são selecionados do grupo que compreende glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol, propanodiol, propilenoglicol, metanol, metilformamida, dimetilformamida, dimetilacetamida, ficoll,

dextranos, polivinilpirrolidona, hidroxitoluenobutilado, álcool polivinílico, trealose, rafinose, lactose, sacarose, glicose, frutose e combinação dos mesmos.

[103] Em uma realização preferencial, a taxa de diluição média em (iv) é de cerca de 2:1 a cerca de 1:2 (sêmen:diluente), mais preferencialmente, de 1:1 (sêmen:diluente).

[104] Em uma realização preferencial, o diluente possui pH variando entre 6.8 e 7.8.

[105] Em uma realização preferencial, o diluente possui osmolaridade variando entre 280 e 400 mOsm/Kg $H_2O$.

[106] Em uma realização preferencial, a mistura é acondicionada em criotubos estéreis de 2 ml de capacidade.

[107] Em uma realização preferencial, a mistura na etapa (b) é acondicionada em refrigerador e submetida à rampa de congelação e armazenada em nitrogênio líquido.

[108] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

## Descrição Detalhada da Invenção

[109] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

### Processo de Diluição de Sêmen Humano

[110] É um dos objetos da presente invenção um processo de diluição de sêmen humano compreendendo a etapa de misturar ao sêmen:

i) de 3% a 15%, de água de coco substancialmente liofilizada;

ii) de 2% a 30% de gema de ovo;

iii) de 0% a 21% de crioprotetores isolados ou em combinação; e

iv) água ultra pura (Milli-Q) ou bidestilada ou destilada, em uma taxa de diluição média de cerca de 4:1 a cerca de 1:4 (sêmen:diluente).

[111] Em uma realização preferencial, a proporção de água de coco substancialmente desidratada em (a) é de 8,22%.

[112] Em uma realização preferencial, a proporção de gema de ovo em (b) é de 20%.

[113] Em uma realização preferencial, os crioprotetores em (c) são selecionados do grupo que compreende glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol, propanodiol, propilenoglicol, metanol, metilformamida, dimetilformamida, dimetilacetamida, ficoll, dextranos, polivinilpirrolidona, hidroxitoluenobutilado, álcool polivinílico, trealose, rafinose, lactose, sacarose, glicose, frutose e combinação dos mesmos.

[114] Em uma realização preferencial, a taxa de diluição de (d) é de 1:1 (sêmen:diluente).

[115] Em uma realização preferencial, o diluente possui pH variando entre 6.8 e 7.8.

[116] Em uma realização preferencial, o diluente possui osmolaridade variando entre 280 e 400 mOsm/Kg $H_2O$.

[117] Em uma realização preferencial, a mistura é acondicionada em criotubos estéreis de 2 ml de capacidade.

Água de Coco Desidratada (em Pó)

[118] Tendo a água de coco liofilizada (ou em pó) uma composição rica e balanceada, promove condições fisiológicas para manutenção da qualidade espermática, além de pH e pressão osmótica ajustados à espécie. Os minerais contidos na sua composição, como o sódio e o potássio, são fundamentais para a viabilidade espermática; os carboidratos (frutose e glicose) como fonte energética, e os aminoácidos promovem sua manutenção. Além disso, é uma substância atóxica e inócua e não interage causando reações indesejáveis ao espermatozóide ou ao trato genital da mulher após inseminação artificial. Todas estas condições fazem da ACP um produto para ser utilizado como diluente para a conservação do sêmen humano a fresco, refrigerado ou congelado.

[119] A composição da invenção, em uma concretização preferencial, compreende apenas a água de coco em pó. Opcionalmente, são também acrescidos de reguladores de pH e/ou de osmolaridade de acordo com a utilização do sêmen a fresco, refrigerado ou congelado para inseminação pela via intra-vaginal ou uterina.

Processo de Preservação de Sêmen Humano

[120] O processo de preservação de sêmen humano, conforme a presente invenção, compreende as etapas de:

[121] a) diluir o sêmen humano em:

i) de 3% a 15%, de água de coco substancialmente liofilizada;

ii) de 2% a 30% de gema de ovo;

iii) de 0% a 21% de crioprotetores isolados ou em combinação; e

iv) água ultra pura (Milli-Q) ou bidestilada ou destilada, em uma taxa de diluição média de cerca de 4:1 a cerca de 1:4 (sêmen:diluente).

[122] b) acondicionar a mistura a uma temperatura de 4 ºC por 10 minutos.

[123] Em uma realização preferencial, a mistura é acondicionada em criotubos estéreis de 2 ml de capacidade.

[124] Em uma realização preferencial, a mistura é acondicionada em refrigerador.

[125] c) diluir o sêmen humano em:

i) de 3% a 15%, de água de coco substancialmente liofilizada;

ii) de 2% a 30% de gema de ovo;

iii) de 0% a 21% de crioprotetores isolados ou em combinação; e

iv) água ultra pura (Milli-Q) ou bidestilada ou destilada, em uma taxa de diluição média de cerca de 4:1 a cerca de 1:4 (sêmen:diluente).

[126] d) acondicionar a mistura a uma temperatura de -20 ºC por 10 minutos.

[127] Em uma realização preferencial, a mistura é acondicionada em freezer.

[128] e) acondicionar a mistura a uma temperatura de -80 ºC por 10 minutos.

[129] Em uma realização preferencial, a mistura é acondicionada em freezer.

[130] f) acondicionar a mistura em *racks* de congelação e transferir para botijão criogênico com $N_2L$ (-196 °C).

[131] g) descongelar a mistura em temperatura ambiente (25 ºC) por 10 minutos, seguido de banho Maria a 37 ºC por mais 10 minutos.

**Exemplo 1. Realização Preferencial**

Tipo, área de estudo e participantes

[132] O presente estudo foi realizado na Universidade Federal de Sergipe (UFS) em parceria com a CEMISE VIDA / CLIFERT - Centro de Reprodução Humana, clínica especializada em reprodução humana assistida, Aracaju-SE, e a Universidade Estadual do Ceará (UECE).

[133] Foram designados possíveis sujeitos deste estudo, pacientes que procuraram a CEMISE VIDA / CLIFERT, para realização de exame de análise seminal. Todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar da pesquisa em questão, mediante esclarecimento dos termos deste estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente, concordando com a participação voluntária dos procedimentos a serem realizados. Vale ressaltar que o material utilizado neste estudo foi o remanescente do espermograma, o qual seria descartado.

[134] O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Tiradentes, Aracaju-SE, estando presente o consentimento informado com todas as informações sobre a pesquisa, mantendo-se o sigilo dos dados e conservando os princípios éticos referentes à pesquisa em seres humanos, destacando-se a beneficência, não maleficência e autonomia.

Casuística

[135] Foram incluídos neste estudo, 30 *pools* formados por amostras de sêmen de 127 pacientes que procuraram a CEMISE VIDA / CLIFERT, para realização de exame de análise seminal, que apresentaram os seguintes critérios de inclusão:

[136] Critérios de inclusão: (1) homens com idade entre 18 a 45 anos; (2) apresentando-se com tempo de abstinência sexual entre dois e sete dias, dentro dos parâmetros preconizados pela OMS (2010) (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization,5th ed, 2010); (3) parâmetros seminais normais quanto ao volume, concentração e motilidade espermática segundo parametros da OMS (2010) (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization,5th ed, 2010): Volume ejaculado ≥ 1,5 ml; Concentração > $15x10^6$ espermatozoides/ ml de sêmen; Motilidade (progressivos) > 32%; (4) Ter voluntariamente fornecido o termo de consentimento livre e esclarecido.

[137] Critérios de exclusão: (1) pacientes com perda de plasma seminal no momento da coleta; (2) pacientes que apresentem qualquer tipo de distúrbio ejaculatório; (3) pacientes que tenham realizado mais de uma ejaculação no mesmo recipiente na coleta; (4) pacientes que tenham anomalia pélvica e/ou testicular clinicamente significativa; (5) pacientes que não colheram o sêmen através de masturbação, e foram realizados a relação sexual (coito interrompido), uso de saliva, preservativos, água ou outro lubrificante.

Coleta do material

[138] As amostras foram coletadas por masturbação em uma sala particular, em ambiente tranquilo, com caixa de passagem diretamente para o laboratório onde foram realizadas as análises. As amostras ejaculadas foram depositadas em frasco de plástico estéril que comprovadamente não apresenta efeitos tóxicos sobre os espermatozoides. Após a coleta das amostras, as mesmas foram imediatamente submetidas à análise seminal de rotina.

Métodos laboratoriais

[139] Análise seminal básica: Para a análise seminal de rotina foi utilizado 0,5 ml da amostra de sêmen, segundo critério da OMS (2010) (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization,5th ed, 2010). Para todas as amostras foram realizadas as análises seminais básicas: avaliação do tempo de liquefação, volume, pH, viscosidade, concentração, motilidade espermática e morfologia pelo critério de Kruger (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization,5th ed, 2010)).

[140] Formação do *pool* de sêmen: O material remanescente da análise seminal de rotina, que seria descartado, foi utilizado para este estudo. Após serem realizadas as análises seminais básicas individuais, aquelas amostras cujos pacientes concordaram em participar do estudo e cujas amostras seminais preencheram os critérios de inclusão, foram a cada dia, misturadas em um ou mais *pools* de 7,5 ml para a realização das técnicas de criopreservação incluídas neste estudo. Foram avaliados 30 *pools* de amostras seminais.

Testes funcionais complementares:

[141] (a) *Vitalidade*: A verificação da vitalidade dos espermatozoides é especialmente importante para as amostras com menos de 40% espermatozoides progressivamente móveis, apesar de poder ser determinada rotineiramente em todas as amostras. Para este estudo, a vitalidade dos espermatozoides foi avaliada através do teste de eosina, onde a porcentagem de espermatozoides vivos é identificada através da integridade da membrana a partir de exclusão de corante. Este método baseia-se no princípio de que as membranas danificadas permitem a entrada do corante pela impermeabilidade da membrana dos espermatozoides mortos (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization, 5th ed, 2010). A vitalidade espermática deve ser avaliada o mais rapidamente possível após a liquefação

da amostra de sêmen, de preferência em até 30 min., sendo aceitável até uma hora após a ejaculação, a fim de limitar os efeitos deletérios da desidratação ou mudanças de temperatura sobre vitalidade (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization, 5th ed, 2010). A solução de esosina a 0,5% foi preparada diluindo-se 0,25 g de eosina amarela (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em 50 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%). A solução foi aquecida até a fervura, sendo então esfriada em temperatura ambiente (25 ºC). Logo após foi filtrada com o uso de filtro de papel (90 g/m$^2$). Para a análise da vitalidade espermática 5 µl de cada amostra seminal homogeneizados foram colocados em lâmina (26 x 76 mm), adicionados de 5 µl da solução de eosina a 0,5% e homogeneizados com o auxílio da ponteira da pipeta por 15 segundo, sendo então cobertos com lamínula (18 x 18 mm). As lâminas/lamínulas foram levadas para análise em microscópio de contraste de fases (400x), sendo avaliados 200 espermatozoides em vivos (não corados) e mortos (corados) (OMS_ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization, 5th ed, 2010).

[142] (b) *Avaliação da integridade de acrossoma*: Os espermatozoides foram classificados em células com membrana acrossomal intacta ou lesada, utilizando microscopia de epifluorescência (Eclipse 50i, Nikon Microscopes) equipado com um filtro de excitação de 450-490 nm, um espelho dicroico de 505 nm e um filtro de barreira de 520 nm, em aumento de 400x. A sonda fluorescente testada para a verificação da integridade do acrossoma foi a aglutinina de amendoim (PNA – *Peannut Agglutinin*) conjugada com isoticionato de fluoresceína (FITC - *Fluoresceinisothiocyanite*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A PNA é uma lectina de amendoim (*Arachishypogea*) que apresenta a característica de ligar-se a glicoconjugados presentes na membrana acrossomal externa. Em espermatozoides com membrana acrossomal intacta é observado todo o contorno do acrossoma.

[143] (c) *Avaliação da integridade de membrana*: A integridade da membrana espermática foi avaliada utilizando microscopia de epifluorescência (Eclipse 50i, Nikon Microscopes) equipado com um filtro de excitação de 450-490 nm, um espelho dicroico de 505 nm e um filtro de barreira de 520 nm, em aumento de 400x, sendo os espermatozoides classificados como íntegros ou lesados. Foi utilizado o Iodeto de Propídio (IP) que se liga ao DNA celular corando em vermelho os espermatozoides com membranas lesadas, porém é impermeável em membranas íntegras. Por outro lado, o Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) é permeável à membrana e diesterificado no interior da célula, cujo produto resultante, se liga ao citoplasma de células intactas, causando a fluorescência verde ao longo de todo o espermatozoide.

[144] (d) *Avaliação da atividade mitocondrial*: O potencial de membrana mitocondrial é o parâmetro que melhor reflete a função mitocondrial e é um indicador do estado de energia desta organela. Ele pode ser usado para avaliar a atividade da cadeia respiratória e do sistema de transporte de elétrons. A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada através do corante catiônico lipofílico JC1 (5,5', 6,6'– tetracloro- 1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolo – carbocianina).

[145] (e) *Análise da associação entre as sondas fluorescentes PI, DCF, FICT-PNA e JC-1*: Baseados em testes previamente realizados e citações literárias, as sondas fluorescentes foram associadas para análise. Foram colocados 50 µl de sêmen em um Eppendorf e acrescentados 50 µl de TRIS. Em seguida, foram colocados 5 µl de DCF e incubado por 10 min. em banho Maria a 37 °C. Foram acrescentadas as sondas IP 2 µl e 50 µl de Solução de PNA (20 µl de PNA+ 150 µl de PBS *Free*) e incubado por 8 min. em banho Maria a 37 °C, 10 µl de JC-1 foi acrescentado e deixado por 10 min. a temperatura ambiente (25 °C). Após o preparo da amostra, uma preparação de lâmina e lamínula foi realizada e 100 espermatozoides foram avaliados imediatamente em aumento de 400x em microscopia de epifluorescência (Eclipse 50i, Nikon Microscopes) e classificados quanto ao padrão de coloração, localizado no Laboratório de

Andrologia da CEMISE VIDA. Os espermatozoides foram classificados em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda (CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v. 42, p. 479-488, 2007). MPIAICAM = Membrana Intacta, Acrossoma Intacto, Com Atividade Mitocondrial. MPIAISAM = Membrana Intacta, Acrossoma Intacto, Sem Atividade Mitocondrial. MPIALCAM = Membrana Intacta, Acrossoma Lesado, Com Atividade Mitocondrial. MPIALSAM = Membrana Intacta, Acrossoma Lesado, Sem Atividade Mitocondrial. MPLAICAM = Membrana Lesada, Acrossoma Intacto, Com Atividade Mitocondrial. MPLAISAM = Membrana Lesada, Acrossoma Intacto, Sem Atividade Mitocondrial. MPLALCAM = Membrana Lesada, Acrossoma Lesado, Com Atividade Mitocondrial. MPLALSAM = Membrana Lesada, Acrossoma Lesado, Sem Atividade Mitocondrial.

Congelação seminal

[146] A taxa de sobrevivência de células congeladas-descongeladas depende da formação mínima de cristais intracelulares. Este processo é obtido utilizando crioprotetores e aplicando protocolos com taxas de congelação - descongelação que minimizem a formação de cristais de gelo a partir da água intracelular (SHERMAN, J. Cryopreservation of human semen. In: CRC Press BR (ed.) **Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility**. FL, USA; 1990).

[147] Foi verificado o número de criotubos que foram necessários para a congelação e identificados com o nome do protocolo utilizado, número do *pool*, data e número da congelação.

*Meios diluentes:*

[148] (a) TYB: *FreezingMedium Test Yolk Buffer* (Irvine Scientific, EUA), composto por: TES (N-tris[hidroximetil]metil-2-ácido aminoetano sulfônico; $C_6H_{15}NO_6S$; PM = 229,2); TRIS (2-amino-2-hidroximetil-1,3 propanodiol); $C_4H_{11}NO_3$; PM =

121,1); D (-) Frutose ($C_6H_{12}O_6$; PM = 180,16); Citrato de sódio tribásico P.A. ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$; PM = 194,10); Gema de ovo (20% v/v); Glicerol (6%) ($C_3H_8O_3$; PM = 92,09); Gentamicina (10 mg; Geyer Medicamentos S.A., Porto Alegre/RS).

[149] (b) GEYC: Gema-citrato-glicerol, composto por: Glicose ($C_6H_{12}O_6$; PM = 180,16; Sigma-Aldrich, Alemanha); Citrato de sódio tribásico P.A. ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$; PM = 194,10; ; Sigma-Aldrich, Alemanha); Glicina ($C_2H_5NO_2$; PM = 75,07; Sigma-Aldrich, Alemanha); Glicerol (15%) ($C_3H_8O_3$; PM = 92,09; Sigma-Aldrich, Alemanha); Gema de ovo (20% v/v). Modo de preparo: Em 65 ml de água estéril purificada foram adicionados 1,5 g de glicose e 1,3 g de citrato de sódio tribásicodihidratado. Logo após, foram adicionados 15 ml de glicerol, seguido de homogeneização. Em seguida foram adicionados 1,3 g de glicina. Quando dissolvido, foi filtrado através de membrana de 0,45 µm. Por fim, foram adicionados 20 ml de gema de ovo fresco (obtido a partir de ovos específicos livre de patógenos, com aproximadamente 10 ml de gema por ovo). A suspensão foi colocada em banho Maria a 56 °C durante 40 min., com homogeneização. Culturas bacterianas foram realizadas nesta fase, para testar a esterilidade. O diluente foi armazenado a -20 ºC em alíquotas de 2 ml em criotubos estéreis.

[150] (c) ACP-113c: Meio de criopreservação para sêmen humano à base de água de coco em pó (ACP Biotecnologia, Fortaleza, Brasil) composto por: Água de coco em pó (ACP-113); Gema de ovo; Glicerol ($C_3H_8O_3$; PM = 92,09; Sigma-Aldrich, Alemanha); Antibiótico. Modo de preparo: O diluente ACP-113 foi ressuspenso em água *Milli-Q*, acrescido de gema de ovo, filtrado, acrescido de glicerol e antibiótico. Logo após foi armazenado a -20 ºC em alíquotas de 2 ml em criotubos estéreis.

[151] (d) ACP-113cS: Meio de criopreservação para sêmen humano à base de água de coco em pó sequencial (ACP Biotecnologia, Fortaleza, Brasil), composto por: Parte A [Água de coco em pó (ACP-113); Gema de ovo;

Antibiótico] e Parte B [Água de coco em pó (ACP-113); Gema de ovo; Glicerol ($C_3H_8O_3$; PM = 92,09; Sigma-Aldrich, Alemanha); Antibiótico]. Modo de preparo: O diluente ACP-113 foi ressuspenso em água *Milli-Q*, acrescido de gema de ovo, filtrado, acrescido de glicerol e antibiótico. Logo após foi armazenado a -20 °C em alíquotas de 2 ml em criotubos estéreis.

[152] O meio ACP foi testado quanto à esterilidade para micro-organismos aeróbios, anaeróbios, fungos e determinação de proteínas solúveis. Seguiu-se um protocolo de esterilidade que não alterou as características organolépticas da ACP. Foi utilizado um processo de esterilização por filtragem com micromembranas de diferentes dimensões. Foram seguidas diretrizes preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para obtenção de meios diluentes/conservantes de sêmen, livres de patógenos.

Protocolos de congelação

[153] (a) Protocolo ACP-113cS (MOD): O meio crioprotetor foi descongelado a temperatura ambiente (25°C) e homogeneizado; aquecido para 37 ° C em placa aquecedora; adicionado em igual volume da amostra (1:1, v/v), gota a gota, sob agitação, em frações de 25% do volume a cada vez, com intervalo de 5 minutos entre cada adição, com homogeneização do tubo, permanecendo na geladeira (4°C) neste intervalo. A amostra foi incubada a -20°C em posição horizontal por 10 minutos, em seguida foi incubada a uma temperatura de -80°C por 10 minutos; os criotubos foram colocados imediatamente em racks de congelação e transferidos para um botijão de N2L (-196°C). Para o meio sequencial foi utilizado o protocolo da seguinte forma: os meios de congelação ACP-113cS (Parte A e B) foram descongelados em temperatura ambiente (25°C) e homogeneizados; foram aquecidos para 37 °C em placa aquecedora; foi adicionado o ACP-113cS (Parte A) em metade do volume da amostra (2:1, v/v), gota a gota, com agitação. Logo após, a amostra foi mantida em geladeira a 4 □C por 10 min. Em seguida foi adicionado o ACP-113cS (Parte B), que foi mantido a 4 °C em geladeira, com a outra metade do volume da amostra (2:1,

v/v), gota a gota, descendo pelas paredes do tubo, com agitação suave, com intervalo de 5 minutos entre cada adição, com homogeneização do tubo, permanecendo na geladeira (4°C) neste intervalo. A amostra foi incubada a -20 ºC em posição horizontal por 10 min.; em seguida incubada a -80 °C por 10 min. Os criotubos foram colocados imediatamente em racks de congelação e transferidos para um botijão criogênico com N2L (-196 °C).

[154] (b) Protocolo TYB: O meio de congelação foi descongelado em temperatura ambiente (25 ºC) e homogeneizado; foi aquecido para 37 °C em placa aquecedora; foi adicionado em igual volume da amostra (1:1, v/v), gota a gota, com agitação. Após a adição do meio de congelação, a amostra foi mantida em geladeira a 2-5 °C por 90 min. A amostra foi incubada a -20 ºC em posição horizontal por 30 min.; em seguida incubada a -80 °C por 30 min. Os criotubos foram colocados imediatamente em *racks* de congelação e transferidos para um botijão criogênico com $N_2L$ (-196 °C). Quando o meio ACP 113c sequencial foi utilizado, independetemente do protocolo, o mesmo foi adicionado ao sêmen da seguinte forma: ACP 113cS-A foi adicionado ao sêmen fresco na quantidade de 50% do volume total do meio a ser congelado e refrigerado a 4°C por 10 min; em seguida os 50% restantes do meio ACP 113cS-B foram adicionados conforme protocolos descritos acima.

[155] (c) Protocolo OMS (2010): O meio de congelação foi descongelado em temperatura ambiente (25 ºC) e homogeneizado; foi aquecido para 37 °C em placa aquecedora; foi adicionado em metade do volume da amostra (2:1, v/v), gota a gota, com agitação, em frações de 25% do volume a cada vez, com mistura suave durante cerca de 10 min. em temperatura ambiente (25 ºC). Após a adição do meio de congelação, a amostra foi incubada a 30-35 °C por cinco minutos em banho Maria. A amostra foi incubada a -20 ºC em posição horizontal por 30 min. Em seguida a amostra foi incubada a -80 °C por 30 min.; os criotubos foram colocados imediatamente em *racks* de congelação e transferidos para um botijão criogênico com $N_2L$ (-196 °C). Quando o meio ACP 113c sequencial foi utilizado, independetemente do protocolo, o mesmo foi

adicionado ao sêmen da seguinte forma: ACP 113cS-A foi adicionado ao sêmen fresco na quantidade de 50% do volume total do meio a ser congelado e refrigerado a 4°C por 10 min; em seguida os 50% restantes do meio ACP 113cS-B foram adicionados conforme protocolos descritos acima.

Descongelação seminal

[156] Foram retirados quantos criotubos fossem necessários a partir do botijão criogênico e colocados sobre papel absorvente, até atingir a temperatura ambiente (25 ºC), em no máximo 10 min. As amostras foram então colocadas em banho Maria a 37 °C por cinco minutos. Imediatamente após a retirada do banho Maria cada uma das amostras foi avaliada quanto às análises seminais básicas e testes funcionais pós-descongelação. As amostras podem ser descongeladas diretamente no banho Maria.

Análises estatísticas

[157] Os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico SPSS 18. Os parâmetros descritivos das análises dos *pools* de sêmen incluíram informações sobre médias, desvio padrão (DP) e frequências. As diferenças entre os grupos em relação aos parâmetros pós-descongelação foram avaliadas pelo teste de médias pareado (*t de Student pareado*) ou ANOVA com pós-teste Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

[158] Após a preparação do *pool* seminal, as amostras tinham um volume médio de 6,24 ± 1,00 ml. As amostras foram submetidas à análise seminal básica e os resultados dos parâmetros gerais do sêmen fresco e pós-descongelação do sêmen criopreservado utilizando o meio e protocolo de congelação respectivos avaliados estão descritos na Tabela 1 abaixo.

[159] A análise de parâmetros seminais pós-descongelação foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, foram comparados os parâmetros seminais pós-descongelação entre os meios e seus respectivos protocolos de congelação (TYB / TYB e GEYG / OMS) com duas formulações do ACP-113c usando os protocolos (ACP-

113c/TYB, ACP-113c/OMS, ACP-113cS/TYB, e ACP-113cS/OMS), com o objetivo de avaliar qual dos meios e protocolos de ACP-113c apresentavam melhores resultados após a descongelação. A Figura 1 mostra os parâmetros de pós-descongelação encontrados nos seis primeiros grupos avaliados.

[160] Observou-se que a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal pós-descongelação foi semelhante entre os grupos. No entanto, a concentração, motilidade e vitalidade dos espermatozoides pós-descongelação foram menores nos grupos ACP-113c e ACP-113cS, quando os protocolos TYB e OMS foram utilizados. Por outro lado, quando apenas os meios ACP-113c foram observados, os melhores resultados foram obtidos com ACP-113cS e protocolo TYB.

[161] Com base nestas observações e com o objetivo de melhorar os resultados pós-descongelação com ACP-113cS, foi desenvolvido o protocolo modificado com base na utilização do ACP para espécies animais, que foi denominado de MOD, e comparados os parâmetros pós-descongelação do meio / protocolo de congelação padrão ouro (TYB / TYB) com meio ACP-113cS usando o protocolo MOD (protocolo ACP-113cS/MOD). O meio TYB também foi testado com o protocolo MOD como controle (TYB / MOD) (Figura 2).

[162] Os resultados dos parâmetros seminais pós-descongelação usando o protocolo MOD mostrou que a combinação do meio ACP-113cS com o protocolo MOD decorreu na mesma concentração, espermatozoides progressivamente móveis recuperados e vitalidade. Entretanto, a porcentagem de morfologia normal pós-descongelação de espermatozoides são mais elevadas nos grupo ACP-113cS/MOD do que TYB/TYB.

[163] Para a análise de atividade funcional dos espermatozoides pós-descongelação com os meios propostos, foram selecionados os melhores resultados do meio ACP-113c com o protocolo correspondente, ACP-113cS/MOD, e o melhor meio e protocolo padrão, TYB/TYB, e utilizada a análise de epifluorescência para avaliar a integridade da membrana, integridade acrossômica e atividade mitocondrial conforme a Figura 3.

[164] A análise dos parâmetros funcionais pós-descongelação mostrou que a porcentagem de espermatozoides com a integridade de membrana normal, integridade acrossômica e atividade mitocondrial são semelhantes entre os grupos TYB e ACP-113cS quando considerados todos os parâmetros juntos ou analisados separadamente (Figura 4).

[165] Quando analisados os parâmetros associados, com a utilização da associação de sondas fluorescentes IP, DCF e JC-1 também houve uma equivalência nos parâmetros de integridade de membrana, acrossoma e atividade mitocondrial entre os dois meios (Tabela 2).

[166] Foi realizada correlação entre os parâmetros funcionais (integridade de membrana, acrossoma e atividade mitocondrial) e os parâmetros seminais básicos (morfologia, vitalidade, motilidade) nos meios TYB e ACP-113c. Nas amostras criopreservadas em TYB foi observada uma correlação positiva entre vitalidade e integridade de membrana, assim como vitalidade e integridade de acrossoma (Tabela 3). Nas amostras criopreservadas em ACP-113c, foi observada relação de significância entre a integridade de membrana e a motilidade, e entre a integridade de membrana e a vitalidade (Tabela 4).

[167] Ao analisar os resultados dos testes compreendidos nas tabelas anexas, conclui-se que a diluição do sêmen humano em água de coco em pó (ACP-113c) resulta em uma boa recuperação de espermatozoides, com atividade funcional equivalente ao meio padrão ouro, especialmente quando associado ao protocolo modificado proposto, com melhoras no parâmetro de morfologia espermática, que é considerado critério indispensável e preditor em técnicas de reprodução assistida com a utilização de ICSI.

[168] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

# REIVINDICAÇÕES

1. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO"**, utilizando como base a água de coco em pó ou liofilizada para produção de meio de cultura **CARACTERIZADO por** ser capaz do processo de diluição e criopreservação de sêmen humano conservando as características funcionais dos espermatozoides pós descongelação.

2. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO por** resfriamento seminal por qualquer método convencional ou não convencional.

3. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1 e 2, **CARACTERIZADO por** congelação e/ou criopreservação seminal por qualquer método convencional ou não convencional, ou mesmo por ultra-freezer.

4. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **CARACTERIZADO por** tempo de resfriamento e congelamento que pode variar entre 1 a 24 horas.

5. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN**

**HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 e 4, **CARACTERIZADO por** temperatura de congelamento que pode variar entre 0°C a -196°C.

6. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4 e 5, **CARACTERIZADO por** etapa de mistura ao sêmen, com uma porcentagem de 1% a 70%, de água de coco substancialmente liofilizada;

7. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4 e 5, **CARACTERIZADO por** etapa de mistura ao sêmen, com uma porcentagem de 1% a 70% de gema de ovo;

8. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, **CARACTERIZADO por** etapa de mistura ao sêmen, com uma porcentagem de 0% a 70% de crioprotetores isolados ou em combinação;

9. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, **CARACTERIZADO por** etapa de mistura ao sêmen, com água ultra pura (Milli-Q) ou bidestilada ou destilada, em uma taxa de diluição média de cerca de 10:1 a cerca de 1:10 (sêmen:diluente).

10. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN**

**HUMANO"**, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, **CARACTERIZADO por** componentes misturados ao sêmen possuírem pH entre 5.0 e 9.0.

11. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO"**, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, **CARACTERIZADO por** componentes misturados ao sêmen possuírem osmolaridade variando entre 200 e 600 mOsm/Kg $H_2O$.

12. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO"**, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, **CARACTERIZADO por** temperatura de acondicionamento que pode variar entre 0°C a - 200°C.

13. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO"**, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, **CARACTERIZADO por** acondicionamento palhetas, microtubos, criotubos ou quaisquer materiais de acondicionamento convencional e/ou não convencional.

14. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO"**, de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, **CARACTERIZADO** pela mistura ser acondicionada em refrigerador, em freezer, e em botijão criogênico ou quaisquer acondicionador convencional e/ou não convencional.

15. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14, **CARACTERIZADO** pelo descongelamento da mistura em temperaturas de 20 °C a 39°C.

16. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15, **CARACTERIZADO por** sua utilização de forma única/ isolada ou composto por 2 ou mais meios sequenciais em combinação.

17. **"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP- 113C) NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO",** de acordo com a reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, **CARACTERIZADO por** etapa de embalamento onde o produto pode ser guardado em embalagens estéreis preferencialmente, do tipo laminada ou não laminada, potes de vidro âmbar ou não, como também em embalagens de plástico transparente ou não, como também em cápsulas ou ampolas.

***Tabela 1***

| | **Sêmen fresco (Média±DP)[a,b,c,d]** | **Pós-descongelameto (Média±DP) - TYB[a]** | **Pós-descongelameto (Média±DP) - GEYC[b]** | **Pós-descongelameto (Média±DP) – ACP-113c[c]** | **Pós-descongelameto (Média±DP) – ACP-113cS[d]** |
|---|---|---|---|---|---|
| Concentração ($10^6$/ml) | 61.28±22.37 | 25.80±11.22 | 27.73±14.51 | 21.60±7.89 | 24.70±10.68 |
| Espermatozoides com motilidade progressiva(A+B) (%) | 53.60±14.86 | 21.52±12.16 | 12.95±11.46 | 15.76±9.77 | 23.17±13.74 |
| Espermatozoides morfologicamente normais (%) | 3.17±2.27 | 1.63±1.03 | 1.63±1.30 | 1.77±1.13 | 2.20±1.16 |
| Vitalidade (%) | 63.57±19.13 | 45.53±20.14 | 31.10±13.48 | 33.33±14.16 | 46.30±23.27 |

DP: desvio padrão. a, b, c, d: $p<0.05$

***Tabela 2***

| | | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão | P |
|---|---|---|---|---|---|
| **Membrana, Acrossoma e Mitocôndria normais** | ACP-113c | 24,70 | 11,31 | 2,06 | 0,209 |
| | TYB | 22,37 | 9,55 | 1,74 | |
| **Membrana e acrossoma normais** | ACP-113c | 6,23 | 5,28 | 0,963 | 0.200 |
| | TYB | 8,30 | 5,36 | 0,979 | |
| **Membrana e Mitocôndria normais** | ACP-113c | 4.73 | 3,98 | 0,727 | 0.223 |
| | TYB | 3,83 | 3,73 | 0,682 | |
| **Membrana normal** | ACP-113c | 4,17 | 3,02 | 0,551 | 0.952 |
| | TYB | 4,20 | 3,55 | 0,648 | |
| **Acrossoma e Mitocôndria normais** | ACP-113c | 5,67 | 5,29 | 0,966 | 0.625 |
| | TYB | 5,07 | 3,08 | 0,563 | |
| **Acrossoma normal** | ACP-113c | 7,27 | 4,46 | 0,815 | 0.290 |
| | TYB | 9,63 | 10,90 | 1,99 | |
| **Mitocôndria normal** | ACP-113c | 11,00 | 6,23 | 1,14 | 0.520 |
| | TYB | 9,67 | 9,78 | 1,79 | |
| **Todos alterados** | ACP-113c | 36,20 | 12,60 | 2,30 | 0.820 |
| | TYB | 36,90 | 13,80 | 2,51 | |

***Tabela 3***

| | | **Morfologia** | **Vitalidade** | **Integridade de Membrana** | **Integridade Acrossoma** | **Atividade Mitocondrial** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Motilidade | Correlação de Pearson | 0,011 | 0,218 | 0,310 | 0,237 | 0,313 |
| | P | 0,956 | 0,248 | 0,095 | 0,208 | 0,092 |
| Morfologia | Correlação de Pearson | | -0,201 | 0,051 | 0,143 | -0,075 |
| | P | | 0,287 | 0,789 | 0,452 | 0,693 |
| Vitalidade | Correlação de Pearson | | | **0,612** | **0,451** | 0,086 |
| | P | | | **0,000** | **0,012** | 0,651 |
| Integridade Membranar | Correlação de Pearson | | | | 0,518** | 0,396* |
| | P | | | | 0,003 | 0,030 |
| Integridade Acrossomal | Correlação de Pearson | | | | | -0,036 |
| | P | | | | | 0,849 |

***Tabela 4***

| | | **Morfologia** | **Vitalidade** | **Integridade de Membrana** | **Integridade Acrossomal** | **Atividade Mitocondrial** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Motilidade | Correlação de Pearson | -0,026 | 0,529 | **0,541** | 0,334 | 0,160 |
| | P | 0,892 | 0,003 | **0,002** | 0,071 | 0,399 |
| Morfologia | Correlação de Pearson | | 0,022 | 0,236 | 0,286 | 0,270 |
| | P | | 0,908 | 0,209 | 0,125 | 0,149 |
| Vitalidade | Correlação de Pearson | | | **0,450** | 0,229 | 0,307 |
| | P | | | **0,013** | 0,223 | 0,099 |
| Integridade Membranar | Correlação de Pearson | | | | 0,742 | 0,617 |
| | P | | | | 0,000 | 0,000 |
| Integridade Acrossomal | Correlação de Pearson | | | | | 0,632 |
| | Correlação de Pearson | | | | | 0,000 |

***Figura 1***

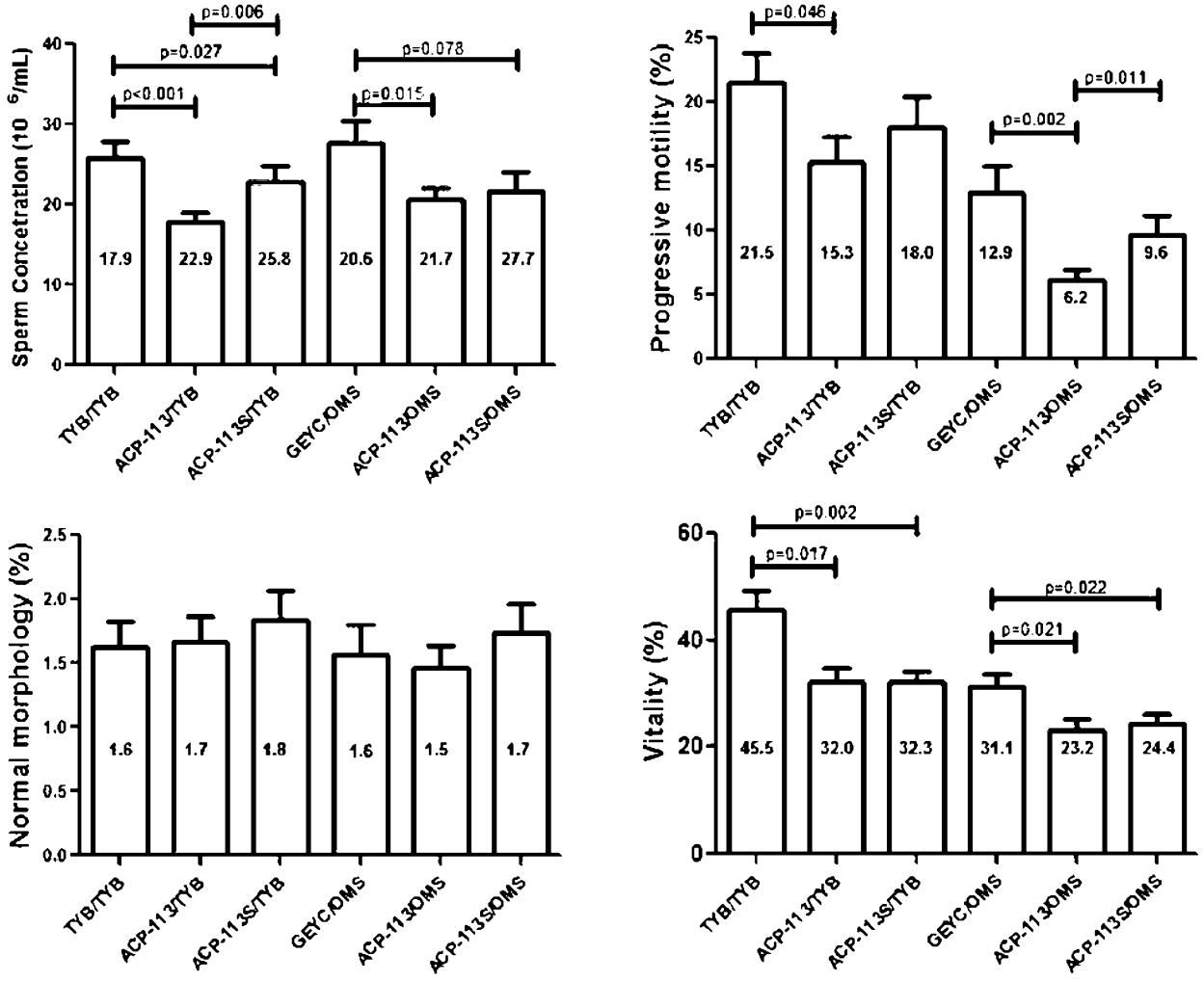

Sperm Concetration (10 6/mL)
p=0.006
p=0.027
p<0.001
p=0.078
p=0.015
17.9
22.9
25.8
20.6
21.7
27.7
Progressive motility (%)
p=0.046
p=0.011
p=0.002
21.5
15.3
18.0
12.9
6.2
9.6
Normal morphology (%)
1.6
1.7
1.8
1.6
1.5
1.7
Vitality (%)
p=0.002
p=0.017
p=0.022
p=0.021
45.5
32.0
32.3
31.1
23.2
24.4
TYB/TYB
ACP-113/TYB
ACP-113S/TYB
GEYC/OMS
ACP-113/OMS
ACP-113S/OMS

***Figura 2***

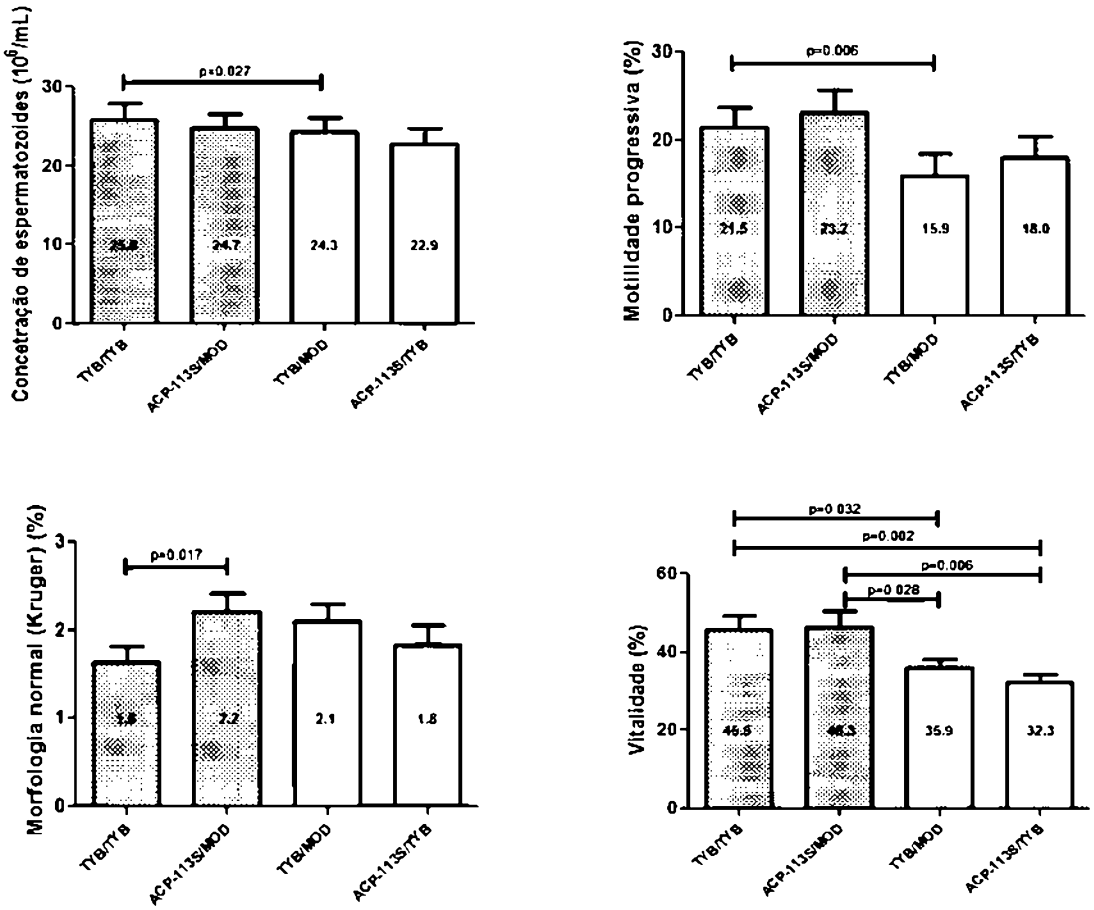

Concetração de espermatozoides ($10^6$/mL)
p=0.027
25.8
24.7
24.3
22.9
TYB/TYB
ACP-113S/MOD
TYB/MOD
ACP-113S/TYB
Motilidade progressiva (%)
p=0.006
21.5
23.2
15.9
18.0
Morfologia normal (Kruger) (%)
p=0.017
1.6
2.2
2.1
1.8
Vitalidade (%)
p=0.032
p=0.002
p=0.006
p=0.028
45.5
46.3
35.9
32.3

***Figura 3***

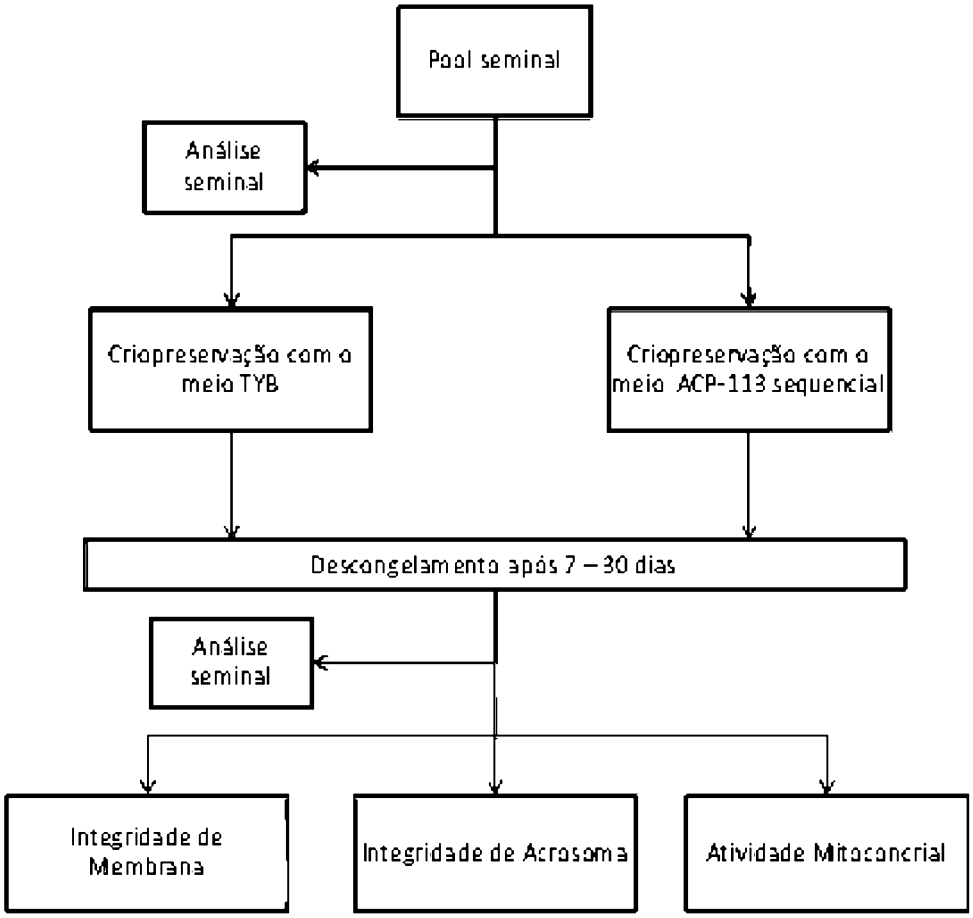
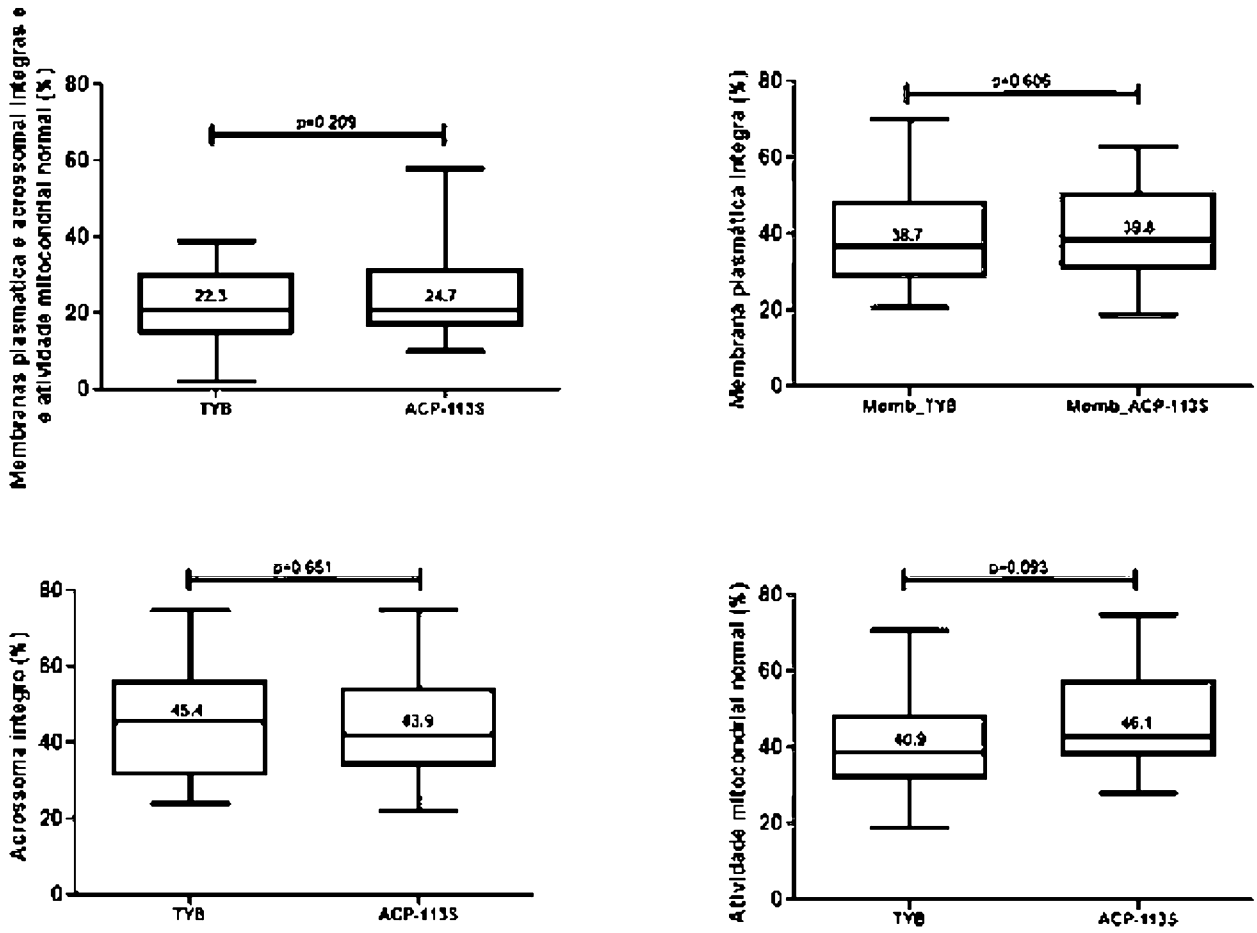

Pool seminal
Análise seminal
Criopreservação com o meio TYB
Criopreservação com o meio ACP-113 sequencial
Descongelamento após 7 – 30 dias
Análise seminal
Integridade de Membrana
Integridade de Acrosoma
Atividade Mitocondrial

***Figura 4***


Membranas plasmática e acrossomal íntegras e atividade mitocondrial normal (%)
p=0.209
22.3
24.7
TYB
ACP-113S
Membrana plasmática íntegra (%)
p=0.605
38.7
39.4
Memb_TYB
Memb_ACP-113S
Acrossoma íntegro (%)
p=0.651
45.4
43.9
TYB
ACP-113S
Atividade mitocondrial normal (%)
p=0.093
40.9
46.1
TYB
ACP-113S

## Resumo

**"DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ NO PROCESSO DE DILUIÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO"**

A presente invenção objetiva o desenvolvimento e analise da eficiência de meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-113c) comparado ao meio convencional padrão ouro no mercado – *Freezing Medium test yolk buffer* (TYB) e meio preconizado pela OMS – Gema de ovo-citrato-glicerol (GEYC), em protocolo modificado de criopreservação para sêmen humano, proporcionando o uso da água de coco em pó (ACP) ou liofilizada como diluente para a conservação do sêmen humano a fresco, refrigerado ou congelado em programas de reprodução humana assistida.