

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Kaempferol em diluente para sêmen de carneiro refrigerado: ações sobre o balanço oxidativo, cinéticos e bioquímica espermática.

Tamires Silva dos Santos

Pelotas, 2021

Tamires Silva dos Santos

Kaempferol em diluente para sêmen de carneiro refrigerado: ações sobre o balanço oxidativo, cinéticos e bioquímica espermática.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Coorientadora: Dra. Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237k Santos, Tamires Silva dos

Kaempferol em diluente para sêmen de carneiro refrigerado : ações sobre o balanço oxidativo, cinéticos e bioquímica espermática / Tamires Silva dos Santos ; Antonio Sergio Varela Junior, orientador ; Carine Dahl Corcini, coorientadora. — Pelotas, 2021.

61 f.

Dissertação (Mestrado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Esperma. 2. Refrigeração. 3. Flavonoides. 4. Reprodução. 5. Sêmen. I. Varela Junior, Antonio Sergio, orient. II. Corcini, Carine Dahl, coorient. III. Título.

CDD : 636.308245

Tamires Silva dos Santos

Kaempferol em diluente para sêmen de carneiro refrigerado: ações sobre o balanço oxidativo, cinéticos e bioquímica espermática.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:31/08/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Orientador)
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Rio Grande (Furg)

Prof. Dr^a. Andréia Nobre Anciuti
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal
Doutor em Ciência Agrícola pela Universidade do Sul de Illinois em Carbondale

Prof. Dr^a. Stela Mari Meneghello Gheller
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr^a. Carine Dahl Corcini
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico essa dissertação
A minha mãe, Sandra
Minha irmã, Taiane

Agradecimentos

Primeiramente agradecer a Deus pela minha vida, por me abençoar e me dar força, para traçar meu caminho e alcançar os meus objetivos.

A minha mãe Sandra batalhadora que me criou sozinha, educou, ensinou a respeitar os outros e a lutar pelos meus sonhos, que mesmo com meio as dificuldades fez de tudo para que não faltasse nada a mim e minha irmã, te amo mãe.

A minha irmã Taiane que sempre está ao meu lado torcendo por mim e me incentivando.

Ao William que me apoiou e esteve presente nas horas boas e ruins, não deixando que eu desistisse e também me incentivando a ir em busca dos meus sonhos.

As minhas amigas Bruna Muradás e Talita Ochôa, pelo carinho companheirismo, incentivo, conselhos e momentos felizes que tivemos juntas.

Ao apóstolo Alfredo e apóstola Inês pela ajuda, conselhos orações e pela cobertura espiritual que me dão.

As minhas colegas da pós-graduação Fernanda, Karen e Camila que estiveram comigo todo tempo ajudando e sendo companheiras.

A Stella, Edenara, Etiane e Cléderson por me ajudarem no projeto de mestrado e outras atividades.

Ao grupo RAC e REPROPEL por terem me recebido de braços abertos, pelo carinho dos colegas e professores.

Ao meu orientador Antonio Sergio por me aceitar como sua orientada, pela dedicação, paciência e ensinamentos passados.

A minha coorientadora Carine Corcini pelo incentivo em fazer o mestrado, por toda paciência, ensinamento e resoluções de problemas.

Ao programa de Pós-Graduação da Veterinária e a minha banca pela disponibilidade, por dividirem suas experiências e aprendizado através de sugestões e críticas e estarem comigo nesse momento tão importante.

Obrigado a todos vocês de coração!

“Treine enquanto eles dormem, estude enquanto eles se divertem, persista enquanto eles descansam, e então viva o que eles sonham”.

Resumo

SANTOS, Tamires Silva dos. **Kaempferol em diluente para sêmen de carneiro refrigerado: ações sobre o balanço oxidativo, cinéticos e bioquímica espermática.** 2021. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O kaempferol é um flavonoide com inúmeras propriedades terapêuticas, dentre elas antitumoral, anti-inflamatório, antifúngico e antioxidante em diversos tipos celulares. Por tanto o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do kaempferol no sêmen refrigerado (4°C) de ovinos, em concentrações de 0,0001 µg/ml a 20 µg/ml durante diferentes tempos de exposição (2h, 24h e 48h). Foram realizadas análises de cinética espermática, através do sistema de análise espermática computadorizado (CASA), e funcionalidade celular por citometria de fluxo. Os resultados encontrados foram positivos referentes a ação antioxidante do Kaempferol nas 24 horas de exposição, observando uma redução significativa das espécies reativas de oxigênio e de peroxidação lipídica, os quais são marcadores de estresse oxidativo. Por fim, concluímos que a adição de kaempferol auxilia na preservação / manutenção da qualidade espermática.

Palavras-chave: Esperma; Flavonoides; Refrigeração; Reprodução; Sêmen

Abstract

SANTOS, Tamires Silva dos. **Kaempferol in refrigerated ram semen extender: actions on oxidative balance, Kinetics and sperm biochemistry.** 2021. 60f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Kaempferol is a flavonoid with numerous therapeutic properties, including antitumor, anti-inflammatory, antifungal and antioxidant properties in various cell types. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of kaempferol on refrigerated (4°C) ram semen, at concentrations from 0.0001 µg/ml to 20 µg/ml during different exposure times (2h, 24h and 48h). Analyzes of sperm kinetics were performed using the computerized sperm analysis system (CASA) and cellular functionality by flow cytometry. The results found were positive regarding the antioxidant action of Kaempferol in the 24 hours of exposure, observing a significant reduction in reactive oxygen species and lipid peroxidation, which are markers of oxidative stress. Finally, we conclude that the addition of kaempferol assists in the preservation / maintenance of sperm quality.

Keywords: Cooling; Flavonoids; Reproduction; Semen; Sperm.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Média \pm SE do parâmetro motilidade total (%) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	37
Tabela 2. Média \pm SE do parâmetro motilidade progressiva (%) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	38
Tabela 3. Média \pm SE do parâmetro Distância média percorrida (μm DAP) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	39
Tabela 4. Média \pm SE do parâmetro Distância curvilínea (μm DCL) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	40
Tabela 5. Média \pm SE do parâmetro Distância retilínea (μm DSL) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	41
Tabela 6. Média \pm SE do parâmetro Velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$ VAP) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	42
Tabela 7. Média \pm SE do parâmetro Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$ VCL) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	43
Tabela 8. Média \pm SE do parâmetro Velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$ VSL) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	44
Tabela 9. Média \pm SE do parâmetro retilinearidade (% STR) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	45
Tabela 10. Média \pm SE do parâmetro Linearidade (% LIN) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.	46

Tabela 11. Média \pm SE do parâmetro Wobble - oscilação ($\mu\text{m/s}$ WOB) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	47
Tabela 12. Média \pm SE do parâmetro Frequência de batimento cruzado (μm BCF) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	48
Tabela 13. Média \pm SE do parâmetro Amplitude de deslocamento da cabeça (μm ALH) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	49
Tabela 14: Média \pm SE do parâmetro integridade de acrossoma das células resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	50
Tabela 15: Média \pm SE do parâmetro funcionalidade de membrana das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	51
Tabela 16: Média \pm SE do parâmetro Atividade mitocondrial das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	52
Tabela 17: Média \pm SE do parâmetro Peroxidação lipídica (LPO) nas células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	53
Tabela 18: Média \pm SE do parâmetro Espécies reativas de oxigênio (ROS) das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	54
Tabela 19: Média \pm SE do parâmetro Integridade da membrana das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	55
Tabela 20: Média \pm SE do parâmetro Índice de fragmentação de DNA (DFI) das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	56
Tabela 21: Média \pm SE do parâmetro Fluidez de membrana das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.....	57

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALH	Amplitude de deslocamento lateral de cabeça
BCF	Frequência de batimentos do flagelo
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
DAP	Distância média percorrida
DCL	Distância curvilínea
DFI	Índice de fragmentação de DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DSL	Distância retilínea
LIN	Linearidade
LPO	Lipoperoxidação lipídica
ml	Mililitro
µg	Microlitro
h	Hora
min	Minutos
REPROPEL	Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal
ROS	Espécies reativas do oxigênio
STR	Retilinearidade
T	Tratamentos
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
V	Volume

VAP	Velocidade média percorrida
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade retilínea
WOB	Oscilação

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
%	Porcentagem

Sumário

1 Introdução.....	18
2 Artigo.....	22
3 Considerações Finais	58
Referências	59

1 Introdução

No Brasil a produção de ovinos é de 20,5 milhões de animais em 2021 (IBGE, 2021), em relação aos estados brasileiros, o destaque fica com a Bahia com 4,49 milhões de cabeças, e o Rio Grande do Sul com 3,05, sendo 22,1% da Bahia e 15,51% do Rio Grande do Sul a representatividade do rebanho brasileiro (MAGALHÃES, 2020).

A ovinocultura tem destaque no mercado comercial através da produção de carne, leite e derivados, além de insumos no setor industrial como calçados e vestuários, oriundos da pele dos animais (DE LUCENA et al., 2018). No entanto, o Brasil ainda tem uma deficiência na demanda interna, o que resulta em importações de produtos ovinos mas, nenhuma exportação (MONTEIRO et al., 2021).

Entretanto o país necessita de uma estruturação na produção e nos investimentos, visando atender em primeiro lugar o mercado nacional e posteriormente o internacional (SOUZA et al., 2012). Para isso o país deve investir no desenvolvimento de tecnologias voltadas a nutrição, sanidade, bem-estar animal, genética e reprodução pois são atividades responsáveis por trazerem melhorias na produtividade e rentabilidade dos rebanhos ovinos (DA FONSECA et al., 2014).

Com relação à reprodução animal existe diversas biotecnologias aplicadas, dentre elas a inseminação artificial (VARAGO et al., 2009), na qual em ovinos é pouco difundida isso se dá devido, à dificuldade na realização da técnica, aos resultados irregulares e baixos índices de fertilidade (ANEL et al., 2006). A inseminação artificial é muito empregada nos programas de melhoramento animal pois, potencializa o uso de reprodutores geneticamente superiores, através da seleção de características desejáveis com uma maior eficiência, também proporciona menores custos na criação de reprodutores, visto que um único animal fornece inúmeras doses inseminantes e permite a utilização de animais incapacitados na monta natural (LEBOEUF et al., 2000; DE OLIVEIRA et al., 2010).

Na inseminação artificial o sêmen de carneiro pode ser utilizado de diversas formas fresco no qual a taxa de prenhez é considerável boa, mas apresenta

sobrevida curta e número limitado de doses por animal, refrigerado ou congelado (MENEGUELLI et al., 2018).

O sêmen congelado permite facilidade no armazenamento, preservação espermática por maior tempo, troca de material genético entre as propriedades, formação de banco de germoplasmas para utilização fora da estação reprodutiva, e conseqüentemente menor uso de reprodutores no rebanho de fêmeas quando comparado a monta natural. Entretanto apresenta bons índices de fertilidade apenas quando aplicado pela técnica de laparoscopia (DE OLIVEIRA et al., 2010; VARAGO et al., 2009).

A refrigeração é outro método de armazenamento no qual, o sêmen em estado líquido é submetido a temperaturas baixas, causando inibição reversível no metabolismo celular (CÂMARA et al., 2011). O sêmen refrigerado tem algumas desvantagem, tais como baixa viabilidade, dificuldade de troca de material genético entre propriedades, entretanto pode ser empregado em técnicas de inseminação menos sofisticadas como a intra-cervical, apresentando índices de fertilidades superiores ao sêmen congelado (DE OLIVEIRA et al., 2010). Para a utilização do sêmen refrigerado requer um processo de pré-diluição antes da inseminação que tem como objetivo minimizar possíveis danos ocasionados pelo estresse térmico.

O diluente é fundamental para que se obtenha bons resultados (PAZ et al., 2018), tendo como função, fornecer energia, auxiliar no processo de tamponamento, manter a pressão osmótica e proteger a membrana do espermatozoide de eventuais lesões provocadas pelo choque térmico, o qual ocorre devida a queda rápida de temperatura e danos provocados durante o transporte. Idealmente o diluente deve ter baixo custo de produção e facilidade de preparo, visando aumentar o volume de ejaculado, maximizar o número de doses inseminantes, além de manter a viabilidade espermática até o momento da inseminação (ARAÚJO et al., 2016; CÂMARA et al., 2018). Dentre os principais constituintes do diluente estão os crioprotetores externos e internos e os antibióticos. Opcionalmente, são adicionados antioxidantes que proporcionam uma maior proteção e integridade a célula espermática (PAZ et al., 2018).

É desejável que se tenha uma boa proteção contra o estresse oxidativo nas células espermáticas durante a refrigeração, pois durante esse processo há a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são moléculas e radicais

livres altamente reativas, que possuem um elétron desemparelhado (SOUZA et al., 2018). E mesmo sendo essenciais para o funcionamento celular (NOGUEIRA et al., 2014), quando produzidas em excesso levam a toxicidade, resultando na perda da motilidade espermática em decorrência da lipoperoxidação lipídica (LPO), inibição da respiração celular espermática, lesões no DNA e perda de enzimas intracelulares que prejudicam a taxa de fertilização (BARRETO et al., 2007).

A célula espermática possui um mecanismo de defesa antioxidante primária de origem citoplasmática, que ajuda a proteger contra excessivos níveis de ROS e LPO. Contudo, durante o processo de diferenciação celular na espermatogênese, a célula espermática descarta parte do citoplasma e conseqüentemente, o antioxidante presente nela, deixando a célula mais suscetível ao estresse oxidativo (SOUZA et al., 2018). Dessa forma, faz-se necessário o uso de antioxidantes para a proteção celular durante os procedimentos de conservação do sêmen, evitando assim danos celulares ocasionados pelo estresse oxidativo (SILVA et al., 2011).

Existem diversas substâncias utilizadas com ação antioxidantes em sêmen ovinos entre elas hipotaurina, resveratrol, superóxido dismutase, glutathione redutase e a associação entre ácido ascórbico, trolox e a melatonina (SOUZA et al., 2018).

Os flavonoides estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são constituintes comuns em frutas, vegetais e algumas bebidas, são atribuídos a uma estrutura de difenilpropano (ALAM et al., 2020). Alguns estudos apontam que a sua utilização tem ampla atividade antioxidante (JOFRÉ et al., 2019). Vários são os efeitos dos flavonoides nos espermatozoides de diversas espécies, principalmente na redução do ROS que foi atribuída a manutenção da membrana plasmática, integridade acrossômica, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA, além de proteger os espermatozoides durante o processo de criopreservação (DURACKA et al., 2019). O Kaempferol é um flavonoide que tem diversas propriedades terapêuticas, entre elas: antitumoral causando a apoptose das células tumorais através da indução de danos no DNA e inibindo a viabilidade ao aumentar a parada da fase G2 celular (ZHU et al., 2019); anti-inflamatório inibindo a infiltração de células inflamatórias e reduzindo a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 através da inibição da ativação de NF- κ B em camundongos com mastite (CAO et al., 2014); antifúngico agindo contra o crescimento de biofilmes, podendo ser utilizado em ambiente médico e indústrias do ramo alimentício, na prevenção do

desenvolvimento de enfermidades causadas por biofilmes e pela deterioração do alimento (ROCHA et al., 2019); ação antioxidante reduzindo o estresse oxidativo tanto in vivo como in vitro (HOFER et al., 2020). Segundo autores, foi constatado que o efeito antioxidante ameniza o estresse oxidativo causado por H₂O₂ em blastocisto suíno, devido a diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS), e isso também foi visto em pele de camundongos lesionada (SEKIGUCHI et al., 2019; YAO et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do Kaempferol em diluentes tris gema para sêmen ovino, sob a qualidade das células espermática por um período de até 48 horas de refrigeração. Os parâmetros avaliados na qualidade espermática *in vitro foram*, a cinética e a funcionalidade celular. Por tanto este estudo tem como hipótese de que o kaempferol tem capacidade de reduzir os níveis de ROS nas células espermáticas e melhorar os parâmetros relacionados à cinética e a função celular nos espermatozoides de carneiros.

2 Artigo

Efeito do Kaempferol em células espermáticas de ovinos

Tamires Silva dos Santos; Stela Mari Meneghello Gheller; Clederson Idenio Schmitt;
Etiane Avila Zimmermann; Fernanda Rodrigues Mendonça; Carine Dahl Corcini e
Antonio Sergio Varela Junior

Submetido à revista Ciência Rural

Efeito do Kaempferol em células espermáticas de ovinos

Effect of Kaempferol on ram sperm cells

Resumo:

O objetivo do estudo foi avaliar, o efeito do kaempferol no sêmen refrigerado de ovinos, em concentrações de 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ a 20 $\mu\text{g/ml}$ em tempos de exposição diferentes 2h, 24h e 48h adicionados ao diluente base. Foram feitas análises de cinética através do sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) e funcionalidade celular por citometria de fluxo. Os resultados encontrados foram positivos referentes a ação antioxidante do Kaempferol, pois nas 24 horas de exposição, foi observado a redução significativa das espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, os quais são marcadores de estresse oxidativo. No presente estudo concluímos que a adição de kaempferol auxiliou na redução do estresse oxidativo, peroxidação lipídica e a fluidez de membrana, não apresentou nenhuma ação negativa sobre a cinética, parâmetros de qualidade de organelas e bioquímica espermática.

Palavras-chave: Citometria; Estresse oxidativo; Flavonoides; Peroxidação lipídica; Refrigeração.

Abstract:

The aim of the study was to evaluate the effect of kaempferol on refrigerated semen of sheep, at concentrations from 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ to 20 $\mu\text{g/ml}$ at different exposure times 2h, 24h and 48h, adding to the diluent base. Kinetic analyzes were performed using the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system and cellular functionality by flow cytometry. The results found were positive regarding the antioxidant action of Kaempferol, because in the 24 hours

of exposure, a significant reduction of reactive oxygen species and lipid peroxidation, which are markers of oxidative stress, was presented. None of the present studies concluded that the addition of kaempferol helped to reduce oxidative stress, lipid peroxidation and membrane fluidity, did not show any negative action on kinetics, organelle quality parameters and sperm biochemistry.

Key words: Cytometry; Oxidative stress; Flavonoids; Lipid peroxidation; Refrigeration.

Introdução

A criopreservação de sêmen ovino tem por finalidade a conservação de material genético de reprodutores juntamente com a preservação da função espermática a qual demanda atenção em diversas etapas tais como: diluição, resfriamento, congelação e descongelação a fim de obter resultados satisfatórios (DE SOUZA CASTELO et al., 2008; CALVACANTE et al., 2019). Existem alguns métodos de armazenamento seminal, a refrigeração é um deles no qual, o sêmen em estado líquido é submetido a temperaturas baixas, causando inibição reversível no metabolismo celular (CÂMARA et al., 2011). Existem algumas desvantagens nesse método tais como baixa viabilidade e dificuldade de troca de material genético entre propriedades, entretanto o sêmen pode ser empregado em técnicas de inseminação menos sofisticadas como a intra-cervical apresentando índices de fertilidades superiores ao sêmen congelado (DE OLIVEIRA et al., 2010).

Para a utilização do sêmen refrigerado o mesmo deve passar pelo processo de pré-diluição antes da inseminação que tem como objetivo aumentar o volume do ejaculado, maximizar o número de doses inseminantes e minimizar possíveis danos ocasionados pelo estresse térmico (ARAÚJO et al., 2016). A utilização de diluente nesse processo é

fundamental para obter bons resultados, pois tem como função fornecer energia, auxiliar no processo de tamponamento, manter a pressão osmótica e proteger a membrana do espermatozoide de eventuais lesões provocadas pelo choque térmico, o qual ocorre devida a queda rápida de temperatura e danos provocados durante o transporte (CÂMARA et al., 2018).

Os diluentes convencionais são compostos por substâncias energéticas, tamponantes, crioprotetores, antimicrobianas e antioxidantes (DE SOUZA CASTELO et al., 2008), com relação aos antioxidantes existem inúmeras moléculas utilizadas na criopreservação de ovinos dentre elas hipotaurina, resveratrol, superóxido dismutase, glutatona redutase e a associação entre ácido ascórbico, trolox e a melatonina (SOUZA et al., 2018) e outras ainda em estudo.

O Kaempferol é um flavonoide que tem diversas propriedades terapêuticas, entre elas: antitumoral causando a apoptose das células tumorais através da indução de danos no DNA e inibindo a viabilidade ao aumentar a parada da fase G2 celular (ZHU et al., 2019); anti-inflamatório inibindo a infiltração de células inflamatórias e reduzindo a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 através da inibição da ativação de NF- κ B em camundongos com mastite (CAO et al., 2014); antifúngico agindo contra o crescimento de biofilmes, podendo ser utilizado em ambiente médico e indústrias do ramo alimentício, na prevenção do desenvolvimento de enfermidades causadas por biofilmes e pela deterioração do alimento (ROCHA et al., 2019); ação antioxidante reduzindo o estresse oxidativo tanto in vivo como in vitro (HOFER et al., 2020). Segundo autores, foi constatado que o efeito antioxidante ameniza o estresse oxidativo causado por H₂O₂ em blastocisto suíno, devido a diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS), e isso também foi visto em pele de camundongos lesionada (SEKIGUCHI et al., 2019; YAO et al., 2019).

Vários são os efeitos dos flavonoides nos espermatozoides de diversas espécies, principalmente na redução do ROS que foi atribuída a manutenção da membrana plasmática, integridade acrossômica, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA, além de proteger os espermatozoides durante o processo de criopreservação (DURACKA et al., 2019). Diante disso o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do Kaempferol em diluentes tris gema para sêmen ovino, sob a qualidade das células espermática por um período de até 48 horas de refrigeração.

Materiais e Métodos

Animais

Neste experimento foram utilizados quatro carneiros sem raça definida (SRD), sexualmente maduros e clinicamente saudáveis, alojados em instalações da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). A coleta de sêmen foi realizada no mês de março, sendo apenas uma única coleta pelo método de vagina artificial, em presença da fêmea (EVANS et al., 1987). Ejaculados com motilidade igual ou superior a 70% (AndroVision®: Software CASA - Minitube) (CBRA, 2013), foram utilizados para as avaliações no experimento. A concentração espermática foi avaliada pelo método de contagem em câmara de Neubauer (CBRA, 2013), no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Pelotas (REPROPEL- UFPeL) levando em consideração a concentração mínima de espermatozoides de $3,5 \times 10^9$ células/mL (CAVALCANTE et al., 2019), as amostras foram ajustadas para 400 milhões de células espermáticas através de uma rediluição.

Diluyente e tratamentos

A constituição do diluente base foi Tris-gema, sem adição de glicerol, com pH 6,9 e osmolaridade de 380mOsm (JHA et al., 2019) produzido no laboratório. O diluente foi preparado 24 horas antes da coleta e mantido resfriado (5° C) até o momento da coleta as amostras dos ejaculados foram diluídas em diluente base (1:1, v/v) no momento da coleta em condições isotérmicas, realizando-se análise imediata de motilidade e vigor espermático (COSTA et al., 2017). O kaempferol (Sigma 60010) foi diluído em DMSO (Sigma D5879) para formar uma solução mãe de 100 mcg e adicionado ao diluente controle nas concentrações estabelecidas. Todas as amostras utilizadas estavam nos padrões mínimos estabelecidos, foi realizada a diluição final (1×10^7 espermatozoides viáveis/mL) nos 12 tratamentos sendo os seguintes : Controle - Tris gema sem kaempferol; Tris gema + 0,0001 µg kaempferol /ml; Tris gema + 0,0005 µg de kaempferol/ ml; Tris gema + 0,001 µg de kaempferol /ml; Tris gema + 0,005µg de kaempferol /ml; Tris gema + 0,01 µg de kaempferol/ml; Tris gema + 0,05 µg de kaempferol/ml; Tris gema + 0,1 µg de kaempferol/ml; Tris gema + 0,5 µg de kaempferol/ml; Tris gema + 1 µg de kaempferol/ml; Tris gema + 10 µg de kaempferol/ml; e Tris gema + 20 µg de kaempferol/ml. Após diluição, a curva de resfriamento foi realizada em caixa condicionadora (Koolmate, Minitube, Ge), com taxa de resfriamento de 0,3 - 0,5°C/min até atingir a temperatura de 5°C, onde permaneceram acondicionadas até 48 h (COSTA et al., 2017).

Avaliações de qualidade seminal pós – refrigeração *in vitro*

As amostras acondicionadas foram analisadas nas 0h, 2h, 24h e 48 h após refrigeração para parâmetros de cinética espermática e nas 24h e 48h também foi avaliada a funcionalidade celular. Antes das análises de cinética espermática, alíquotas de 50µL de amostras resfriadas foram mantidas em banho Maria (10min/37°C).

Cinética Espermática

A análise de cinética espermática realizada através de Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), em lâmina de microscopia óptica recoberta por lamínula. As variáveis analisadas foram: Distancia média percorrida (DAP), Distancia Curvilínea (DCL), Distancia retilínea (DSL), velocidade média de percurso (VAP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade retilínea (VSL), Retilinearidade (STR), Linearidade (LIN), wobble – oscilação (WOB), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), em objetiva de 20x.

Funcionalidade celular

As análises de funcionalidade celular foram realizadas em citometria de fluxo (Attune Acoustic Focusing Cytometer® Applied Biosystems). Com exceção da avaliação de DNA, todas as células foram coradas com Hoescht (sigma 370470) (H33342), e as populações foram detectadas por fotodetector VL1 (filtro 450/40). Nas amostras contendo iodeto de propídio que emite fluorescência vermelha, a fotodeteção foi feita por BL3 (filtro 640 LP). O diacetado de carboxifluorceína, rodhamine 123, por fotodetector BL1 (filtro 530/30), analisados 10 mil eventos por amostra, com taxa de fluxo de 100 células/segundo.

Para a realização das análises se utilizou uma alíquota de 10µL de sêmen adicionado 10µL de diluente, incubadas em placa aquecida a 37°C/10 minutos (integridade de membrana, funcionalidade de mitocôndria, fluidez de membrana, integridade de acrossoma), 15 minutos (espécies reativas de oxigênio) e 30 minutos (lipoperoxidação lipídica). Após o período de incubação, foi adicionado 20µl de solução de Hoescht (10mg/ml), e a amostra foi incubada por 3 minutos antes da análise de citometria de fluxo. No momento da avaliação foi adicionado 1ml de PBS 1X – pH 7,2.

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) foram detectados com corante de diacetato de carboxifluoresceína fluorescente (DCF) e sondas de iodeto de propídio (IP). DCF emite uma fluorescência verde quando oxidado e IP emite fluorescência vermelha. O cálculo dos valores de ROS é alcançado pela intensidade mediana defluorescência verde usada apenas para medir espermatozoides viáveis (IP negativo) (PERRY et. al., 2020).

Na peroxidação lipídica (LPO) se adicionou 1 µL de Bodipy (sigma 900606) em 5µL de amostra. A taxa de peroxidação lipídica foi alcançada pela mediana da fluorescência verde intensidade (lipídio peroxidado) / mediana da intensidade da fluorescência verde mais a mediana do vermelho intensidade de fluorescência (lipídio não peroxidado) x 100,(PERRY et. al., 2020).

A integridade da membrana celular foi avaliada com sondas fluorescentes de diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (PI). DCF penetra nos espermatozóides e é convertido em uma forma não permeável composto fluorescente que retém no citoplasma, enquanto o IP só penetra no núcleo de células com membrana lesada. Nesta análise de funcionalidade celular se considerou apenas as células com coloração com DCF (FERNÁNDEZ et.al., 2013).

A fluidez da membrana plasmática foi determinada com aplicação de merocianina 540 (M540) - um hidrofóbico corante fluorescente - e iodeto de propídio (PI). Nesta avaliação, os espermatozóides foram divididos em alta fluidez e baixa fluidez; que foi determinado pela intensidade fluorescente, quanto maior é a fluorescência mais alta é a fluidez (PERRY et.al 2020).

Na análise de funcionalidade mitocondrial a sonda fluorescente utilizada - rodamina 123 que reage com mitocôndrias ativas emitindo coloração verde, quanto maior é a fluorescência emitida mais ativa essa mitocôndria (DOMINGUES et al., 2020).

Integridade de acrossoma foi estimada pela coloração das células com iodeto de propídio (PI) e FITC-PNA, determinando o valor de células com acrossoma que sofreram processo de capacitação *in vitro* (DOMINGUES et al., 2020).

Índice de fragmentação de DNA avaliado em amostra de 5µL de sêmen, 5µL de TNE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,001 M EDTA, pH 7,2). Depois de 30 segundos, 10µL de solução Triton 1X, e antes da análise se adicionou 10µL de acridineorange (2 mg / mL em água deionizada). A avaliação da estrutura celular se dá pela emissão da fluorescência verde sendo considerados com o DNA íntegro, enquanto aqueles com fluorescência vermelha ou laranja considerados como DNA não lesado (PERRY et.al., 2020)

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância simples e a comparação de médias entre os tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey. Sendo os tratamentos as variáveis significantes dependentes e as análises as significantes independentes. Para avaliação estatística foi utilizado o programa computacional Statistix 10®. O nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Alguns estudos desenvolvidos em espermatozoides humanos e suínos demonstraram que kaempferol auxilia na manutenção da integridade da membrana plasmática e do acrossoma, no potencial de membrana mitocondrial e na fragmentação do DNA, tem ação na diminuição de radicais superóxidos e conseqüentemente proporciona proteção celular nos processos de armazenamento de sêmen (DURACKAS et al., 2019; JAMALAN et al., 2015). Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos desenvolvidos com células espermáticas ovinas.

No presente trabalho com sêmen ovino quando comparamos o grupo controle com os diferentes tratamentos e tempo de refrigeração obteve-se uma pequena redução na motilidade total e progressiva dos espermatozoides, entretanto o tratamento de 20µg/ml apresentou maiores valores de motilidade total e progressiva do que o grupo controle, isso pode ter ocorrido pelo fato de ser a maior concentração de kaempferol. Já WOB e LIN, apenas o tratamento de 1µg/ml demonstrou melhores resultados em relação aos demais (Tabela 10 e 11).

Quando as células espermáticas foram expostas ao kaempferol por 24 horas nas concentrações de 20 µg/ml até 0,0001µg/ml (Tabela 18), foi observado a redução significativa no ROS (espécies reativas de oxigênio produzidas), diminuindo assim a peroxidação lipídica e a fluidez da membrana plasmática espermática. Entretanto, seu efeito não foi suficiente para proteger a ruptura da membrana, a funcionalidade da mitocôndria e ou diminuir o índice de fragmentação do DNA. Em fêmeas suínas também notou-se a redução do estresse oxidativo, quando os oócitos em processo de envelhecimento foram submetidos ao kaempferol, conseqüentemente houve a diminuição nos níveis de ROS, melhorando a qualidade oocitária, que resultou numa taxa superior de produção de embriões (YAO et al., 2019).

Ainda que no nosso estudo não se tenha obtido resultados positivos com relação a funcionalidade da mitocôndria, trabalhos em cultivo *in vitro* demonstraram aumento no número de mitocôndrias ativas oocitárias e manutenção da sobrevivência folicular, confirmando que o kaempferol pode ser utilizado como substituto de outros antioxidantes (SANTOS et al., 2019).

O estudo apresentou efeitos satisfatórios com a redução dos níveis de peroxidação lipídica ($p > 0.05$) quando comparado ao controle, o mesmo foi demonstrado por JAMALAN (2015), no qual observou uma maior capacidade de proteção das células espermáticas, em decorrência ao uso do kaempferol na concentração de (100 µM) juntamente com a redução dos níveis de LPO quando comparado a outros produtos.

O potencial antioxidante dos flavonoides está relacionado com a quantidade de OH na sua estrutura, quanto maior, mais doação de elétron H^+ ocorrerá, conseqüentemente, melhor será o efeito antioxidante, um exemplo é quercetina, um flavonoide composto por cinco OH, que interage com a bicamada lipídica permitindo a doação direta de H^+ e elétrons radicais como o ROO, estabilizando e convertendo-os a ROOH, impedindo assim a continuidade em cascata do processo de peroxidação lipídica (SILVA et al.,2017). Correlacionando com o kaempferol é possível que o mesmo, possa agir igualmente a quercetina com doação de H^+ , pois é composto por quatro OH, o que justifica então a redução nos níveis da peroxidação lipídica encontrados nas células espermáticas ovina.

Após 48 horas de exposição das células espermáticas ovina ao kaempferol, não obtivemos diferença nos parâmetros cinéticos e bioquímicos em comparação ao grupo controle. Se faz necessário estudos futuros com a molécula para que se possa adequar a concentração e o tempo ideal visando melhorar o desempenho do sêmen quando submetido a algum processo de criopreservação, potencializando melhores resultados reprodutivos.

Conclusão

A adição de Kaempferol ao sêmen ovino refrigerado tem efeito positivo, na redução do estresse oxidativo, peroxidação lipídica e a fluidez de membrana, não tendo nenhuma ação negativa sobre a cinética, parâmetros de qualidade de organelas e bioquímica espermática.

Referencias

ARAÚJO, L. R. S. et al. Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, p. 26-35, 2016.

Disponível: < <https://www.scielo.br/j/cab/a/FWNbvVvvT6zztsvR98sq3yj/?lang=pt>>. Acesso Mar. 20, 2020. doi: 10.1590/1089-6891v17i118885.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011. Disponível: < www.cbra.org.br> Acesso: Dez. 10, 2020.

CÂMARA, T. S. et al. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. **Ciência. Anim. (Impr.)**, p. 67-83, 2018. Disponível:< <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-18648>>. Acesso Jan. 15, 2021.

CAO, R. et al. Protective Effects of kaempferol on Lipopolysaccharide-induced Mastitis in Mice. **Inflammation**, v. 37, p. 1453- 1458, 2014. Disponível: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10753-014-9870-9>> Acesso: Out. 12, 2020. doi: 10.1007/s10753-014-9870-9.

CAVALCANTE, J. M. M. et al. Concentração de proteínas do plasma seminal e sua relação com a criopreservação do sêmen ovino em diferentes diluentes. **Ciência Animal**, v. 29, n. 2, p. 45-55, 2019. Disponível:< <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9898>> Acesso: Dez.10, 2020.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte. p 91,2013.

COSTA, V. G. G et al. Efeito da adição de taurina sobre espermatozoides ovinos refrigerados a 5°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, p. 683–687, 2017. Disponível:< [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n3/p683-687%20\(RB700\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n3/p683-687%20(RB700).pdf)> Acesso: Jan. 10,2021.

DE OLIVEIRA, B. M. M.; PASSARINI, J. F. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS. ISSN 1679-8902 Ano VI| N° 9| Abr-Jun 2010, p. 106. Disponível:< <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/570019>> Acesso: Out. 11, 2020.

DE SOUZA CASTELO, T. et al. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

DOMINGUES, WILLIAM B. et al. Transfection of exogenous DNA complexed to cationic dendrimer induces alterations of bovine sperm microRNAome. **Theriogenology**, v. 156, p. 11-19, 2020. Disponível: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X20303769?casa_token=s2bkzPEHvyQAAAAA:I3e_wCL3YAz9PQx5ic6sx5pW->

4Z7jof4hv8SKu0PUr2CHH7XE733UGqX_hYXbc3R19CA-10WGGI> Acesso: Set. 29, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.06.025 2020.

DURACKA, M. et al. The effect of kaempferol and naringenin may improve the in vitro quality of stored boar semen. *Journal of Central European Agriculture*, v. 20, n.4, p. 1069-1-75, 2019. Disponível:< <https://jcea.agr.hr/en/issues/article/2294>> Acesso: Nov. 23, 2020. doi: 10.5513/JCEA01/20.4.2294.

EVANS, G.; MAXWELL, W. No Salamon's artificial insemination of sheep and goats. *Butterworths*, v. 2, p. 194, 1987.

FERNANDEZ GAGO, R. et al. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. n. May, p. 1–11, 2013. Disponível:< https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13001854?casa_token=Le32zxwg6_4AAAAA:anoIfs2hluOGGR0q42or-W7G1Ln0PeyUzQ6Ne64Nx6flwheyD3dnr0UYup4ix3u8QjesIhntSPM> Acesso: Dez. 12, 2020. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.05.003.

HOFER, Stefanie et al. Pharmacological targets of kaempferol within inflammatory pathways—a hint towards the central role of tryptophan metabolism. *Antioxidants*, v. 9, n. 2, p. 180, 2020. Disponível:< <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/2/180>>. Acesso Mar. 17, 2021. doi: 10.3390/antiox9020180.

JAMALAN, M. et al. Human Sperm Quality and Metal Toxicants: Protective Effects of some Flavonoids on Male Reproductive Function. *Int J Fertil Steril*. v. 9, p. 215-222, 2015. Disponível:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948074/>> Acesso: Out. 01, 2020. doi: 10.22074/ijfs.2016.4912.

JHA, P. K. et al. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. *Cryobiology*, v. 89, n. February, p. 35–41, 2019. Disponível:< <https://www.sciencedirect.com>> Acesso: Out. 15, 2020. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.06.001.

PAZ, Jessica Priscila. Uso de energético comercial como diluente de sêmen ovino resfriado. In: 27º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 7º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JUNIOR, Paraná, 2018.

PERRY, C. T et al. Exogenous ATP in the Cryopreservation of Brycon orbignyanus Spermatozoa. *Cryoletters*, v. 41, p. 13–18.

ROCHA, M. F. G. et al. Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: a possible alternative for the control of fungal biofilms. *Biofouling*, v. 35, p. 320–328, 2019. Disponível:<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2019.1604948>> Acesso: Dez. 01, 2020. doi: 10.1080/08927014.2019.1604948.

SANTOS, J. M. S. et al. Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium, stimulating sheep secondary follicle development through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Theriogenology*, v. 136, p. 86–94, 2019. Disponível:<

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X19302596?casa_token=fX3NdkS7gjkAAAAA:01iJUvRvExua-lmdzDjUoulFgX9nuoSsj5Quf1cO3syPpq7fvx4ZgXQQeuqO4EfJRNMoTatN1_k> Acesso: Dez. 16, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.036.

SEKIGUCHI, A. et al. Inhibitory effect of kaempferol on skin fibrosis in systemic sclerosis by the suppression of oxidative stress. *Journal of Dermatological Science*, v. 96, p. 8–17, 2019. Disponível:<

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181119302610>> Acesso: Jan. 15, 2021. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.08.004.

SILVA L. F. M. C. et al. Mecanismo de ação dos principais antioxidantes utilizados na criopreservação espermática de garanhões. *Veterinária e zootecnia*, p 418-434 ,2017.

SOUZA, W. L. et al. Antioxidantes e crioprotetores na conservação do sêmen ovino. *Nutritime Revista Eletrônica*, v. 15, n. 1, p. 8051–8064, 2018. Disponível:<
<https://www.nutritime.com.br/wp-content/uploads/2020/02/Artigo-454.pdf>> Acesso: Nov. 22, 2020.

YAO, X. et al . Kaempferol alleviates the reduction of developmental competence during aging of porcine oocytes. *Animal Science Journal*, v. 90, n. 11, p. 1417–1425, 2019.

Disponível: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/asj.13280>> Acesso: Nov. 05, 2020. doi: 10.1111/asj.13280.

YAO, X. et al. Kaempferol attenuates mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by H₂O₂ during porcine embryonic development. *Theriogenology*, v135, p. 174-180, 2019. Disponível:<

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18306770?casa_token=sCyAn2Oj18MAAAAA:C1Pm7Wnxikevu6xSDIfOshOPxSxSgN7cl92rbcxAuia3qFtRqwKO475rIU1xN-vtXTiT2S6M6K0> Acesso: Nov. 20, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.013.

ZHU. Li.; XUE. Lijun. Kaempferol Suppresses Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Breast Cancer Cells. *Oncology Research*,v. 27, p. 629–634, 2019. Disponível: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7848404/>> Acesso: Nov. 8, 2020. doi 10.3727/096504018X15228018559434.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não ter conflito de interesses

Contribuições do Autores

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Tabela 1. Média \pm se do parâmetro motilidade total (%) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	80,4 \pm 0,9	73,5 \pm 1,5 ^{ABC}	72,3 \pm 1,7 ^{AB}	67,0 \pm 2,5 ^{ABC}
0,0001 μ g/ml		69,1 \pm 1,6 ^{BC}	61,9 \pm 1,5 ^{CD}	61,6 \pm 1,5 ^C
0,0005 μ g/ml		67,5 \pm 2,1 ^C	72,9 \pm 1,9 ^A	67,0 \pm 0,9 ^{ABC}
0,001 μ g/ml		67,7 \pm 1,8 ^C	67,2 \pm 1,4 ^{ABCD}	61,7 \pm 1,6 ^C
0,005 μ g/ml		67,1 \pm 1,6 ^C	71,6 \pm 2,3 ^{AB}	69,8 \pm 1,8 ^{AB}
0,01 μ g/ml		65,2 \pm 2,2 ^C	72,1 \pm 1,3 ^{AB}	64,5 \pm 1,2 ^{BC}
0,05 μ g/ml		67,9 \pm 2,0 ^C	70,9 \pm 1,8 ^{AB}	70,2 \pm 2,0 ^{AB}
0,1 μ g/ml		69,7 \pm 2,2 ^{BC}	70,4 \pm 1,7 ^{AB}	67,4 \pm 1,3 ^{ABC}
0,5 μ g/ml		77,3 \pm 1,6 ^{AB}	68,9 \pm 1,7 ^{ABC}	63,4 \pm 1,6 ^{BC}
1 μ g/ml		73,6 \pm 1,9 ^{ABC}	68,2 \pm 1,5 ^{ABC}	73,2 \pm 1,4 ^A
10 μ g/ml		76,9 \pm 1,9 ^{AB}	59,3 \pm 1,7 ^D	64,2 \pm 1,2 ^{BC}
20 μ g/ml		79,0 \pm 0,6 ^A	64,4 \pm 1,6 ^{BCD}	62,8 \pm 1,7 ^{BC}

^{ABCD} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 2. Média \pm se do parâmetro motilidade progressiva (%) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	76,1 \pm 1,0	69,3 \pm 1,5 ^{ABC}	66,6 \pm 2,0 ^A	61,8 \pm 2,5 ^{ABC}
0,0001 μ g/ml		65,8 \pm 1,8 ^{ABC}	56,1 \pm 1,6 ^{BC}	55,9 \pm 1,7 ^C
0,0005 μ g/ml		64,4 \pm 2,3 ^{BC}	67,3 \pm 2,0 ^A	62,0 \pm 1,0 ^{ABC}
0,001 μ g/ml		64,5 \pm 1,9 ^{BC}	61,8 \pm 1,5 ^{AB}	56,3 \pm 1,6 ^{BC}
0,005 μ g/ml		62,3 \pm 1,8 ^{BC}	67,7 \pm 2,3 ^A	63,7 \pm 1,9 ^{ABC}
0,01 μ g/ml		61,5 \pm 2,4 ^C	66,9 \pm 1,4 ^A	58,3 \pm 1,4 ^{ABC}
0,05 μ g/ml		64,2 \pm 2,0 ^{BC}	64,6 \pm 1,9 ^{AB}	64,6 \pm 2,0 ^{AB}
0,1 μ g/ml		66,3 \pm 2,2 ^{ABC}	64,1 \pm 1,9 ^{AB}	60,2 \pm 1,6 ^{ABC}
0,5 μ g/ml		73,5 \pm 1,8 ^A	62,0 \pm 1,9 ^{AB}	57,4 \pm 1,8 ^{BC}
1 μ g/ml		70,9 \pm 2,0 ^{AB}	62,6 \pm 1,6 ^{AB}	66,1 \pm 1,6 ^A
10 μ g/ml		73,9 \pm 1,9 ^A	51,5 \pm 1,8 ^C	56,4 \pm 1,2 ^{BC}
20 μ g/ml		74,7 \pm 0,7 ^A	57,1 \pm 1,6 ^{BC}	56,4 \pm 1,9 ^{BC}

^{ABC} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 3. Média \pm se do parâmetro distância média percorrida (μm dap) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μg /ml	32,1 \pm 0,5	33,0 \pm 0,7 ^{DEF}	26,0 \pm 0,7 ^D	30,4 \pm 0,7 ^{CD}
0,0001 μg /ml		32,5 \pm 0,6 ^{EF}	27,5 \pm 0,5 ^{ABCD}	33,8 \pm 1,0 ^{ABC}
0,0005 μg /ml		37,5 \pm 0,8 ^{AB}	28,6 \pm 0,6 ^{ABCD}	33,7 \pm 0,7 ^{ABC}
0,001 μg /ml		36,3 \pm 0,8 ^{BC}	28,8 \pm 0,5 ^{ABCD}	34,2 \pm 0,6 ^{ABC}
0,005 μg /ml		32,9 \pm 0,7 ^{EF}	30,3 \pm 0,5 ^A	31,9 \pm 0,7 ^{BCD}
0,01 μg /ml		35,1 \pm 0,6 ^{BCDE}	29,5 \pm 0,7 ^{AB}	36,1 \pm 1,3 ^A
0,05 μg /ml		31,6 \pm 0,7 ^F	29,4 \pm 0,8 ^{ABC}	34,9 \pm 1,0 ^{AB}
0,1 μg /ml		36,0 \pm 0,7 ^{BCD}	29,6 \pm 0,8 ^{AB}	34,3 \pm 1,0 ^{ABC}
0,5 μg /ml		37,4 \pm 0,8 ^{AB}	27,9 \pm 0,8 ^{ABCD}	35,3 \pm 1,0 ^{AB}
1 μg /ml		39,9 \pm 0,5 ^A	29,4 \pm 0,7 ^{ABC}	29,6 \pm 0,7 ^D
10 μg /ml		36,5 \pm 0,6 ^{BC}	27,2 \pm 0,6 ^{BCD}	32,1 \pm 0,4 ^{BCD}
20 μg /ml		34,4 \pm 0,8 ^{BCDEF}	26,6 \pm 0,6 ^{CD}	28,2 \pm 0,6 ^D

^{ABCDEF} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 4. Média \pm se do parâmetro distância curvilínea ($\mu\text{m dcl}$) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μg /ml	53,0 \pm 1,0	55,2 \pm 1,0 ^{BCD}	42,5 \pm 0,9 ^D	53,4 \pm 2,0 ^{CDE}
0,0001 μg /ml		54,2 \pm 1,4 ^{CD}	45,6 \pm 0,7 ^{ABCD}	60,8 \pm 1,6 ^{ABC}
0,0005 μg /ml		61,3 \pm 1,2 ^A	47,6 \pm 0,8 ^{ABCD}	56,5 \pm 1,4 ^{ABCD}
0,001 μg /ml		59,3 \pm 1,3 ^{ABC}	48,7 \pm 1,0 ^{ABC}	57,8 \pm 0,8 ^{ABCD}
0,005 μg /ml		54,4 \pm 1,0 ^{CD}	50,0 \pm 0,9 ^A	55,5 \pm 1,1 ^{BCD}
0,01 μg /ml		58,3 \pm 0,7 ^{ABCD}	49,0 \pm 1,0 ^{ABC}	62,9 \pm 2,0 ^A
0,05 μg /ml		53,6 \pm 1,4 ^D	50,2 \pm 1,3 ^A	60,8 \pm 1,9 ^{ABC}
0,1 μg /ml		60,3 \pm 1,2 ^{AB}	48,8 \pm 1,3 ^{ABC}	59,0 \pm 1,6 ^{ABC}
0,5 μg /ml		61,3 \pm 1,2 ^A	44,7 \pm 1,4 ^{CD}	62,31 \pm 1,8 ^{AB}
1 μg /ml		61,7 \pm 1,0 ^A	49,8 \pm 1,3 ^{AB}	51,0 \pm 1,5 ^{DE}
10 μg /ml		60,6 \pm 1,2 ^{AB}	46,6 \pm 1,0 ^{ABCD}	55,5 \pm 1,0 ^{BCD}
20 μg /ml		59,5 \pm 1,5 ^{ABC}	45,1 \pm 0,9 ^{BCD}	48,3 \pm 1,0 ^E

^{ABCDE} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 5. Média \pm se do parâmetro distância retilínea ($\mu\text{m dsl}$) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 $\mu\text{g/ml}$	21,6 \pm 0,3	23,5 \pm 0,5 ^E	19,6 \pm 0,7 ^{CD}	21,3 \pm 0,3 ^{CDE}
0,0001 $\mu\text{g/ml}$		23,4 \pm 0,4 ^E	20,9 \pm 0,4 ^{ABCD}	23,5 \pm 0,6 ^{ABC}
0,0005 $\mu\text{g/ml}$		27,2 \pm 0,6 ^{AB}	21,1 \pm 0,5 ^{ABCD}	24,7 \pm 0,5 ^{AB}
0,001 $\mu\text{g/ml}$		26,6 \pm 0,6 ^{BC}	21,9 \pm 0,4 ^{ABC}	25,3 \pm 0,5 ^{AB}
0,005 $\mu\text{g/ml}$		23,5 \pm 0,5 ^E	22,8 \pm 0,4 ^A	22,9 \pm 0,3 ^{BCD}
0,01 $\mu\text{g/ml}$		25,1 \pm 0,4 ^{BCDE}	22,4 \pm 0,6 ^{AB}	25,5 \pm 0,8 ^A
0,05 $\mu\text{g/ml}$		22,9 \pm 0,4 ^E	22,0 \pm 0,7 ^{ABC}	25,3 \pm 0,7 ^{AB}
0,1 $\mu\text{g/ml}$		25,9 \pm 0,5 ^{BCD}	21,9 \pm 0,7 ^{ABCD}	24,8 \pm 0,7 ^{AB}
0,5 $\mu\text{g/ml}$		27,3 \pm 0,6 ^{AB}	20,8 \pm 0,8 ^{ABCD}	25,5 \pm 0,6 ^A
1 $\mu\text{g/ml}$		29,0 \pm 0,4 ^A	22,2 \pm 0,6 ^{ABC}	20,8 \pm 0,4 ^{DE}
10 $\mu\text{g/ml}$		26,4 \pm 0,5 ^{BC}	19,9 \pm 0,4 ^{BCD}	22,8 \pm 0,3 ^{BCD}
20 $\mu\text{g/ml}$		24,3 \pm 0,6 ^{CDE}	19,3 \pm 0,5 ^D	20,0 \pm 0,4 ^E

^{ABCDE} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas ($P > 0.05$).

Tabela 6. Média \pm se do parâmetro velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$ vap) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μg /ml	72,2 \pm 1,2	72,8 \pm 1,5 ^{DEF}	57,7 \pm 1,6 ^B	67,2 \pm 1,8 ^{CD}
0,0001 μg /ml		71,9 \pm 1,5 ^{EF}	60,5 \pm 1,0 ^{AB}	75,7 \pm 2,4 ^{ABC}
0,0005 μg /ml		82,6 \pm 1,8 ^{AB}	63,5 \pm 1,3 ^{AB}	75,5 \pm 1,8 ^{ABC}
0,001 μg /ml		79,9 \pm 1,8 ^{BCD}	63,2 \pm 1,1 ^{AB}	75,7 \pm 1,3 ^{ABC}
0,005 μg /ml		72,7 \pm 1,6 ^{EF}	66,7 \pm 1,0 ^A	70,8 \pm 1,7 ^{BCD}
0,01 μg /ml		77,8 \pm 1,3 ^{BCDE}	65,7 \pm 1,4 ^A	81,2 \pm 3,0 ^A
0,05 μg /ml		70,1 \pm 1,6 ^F	65,9 \pm 1,7 ^A	78,7 \pm 2,5 ^{AB}
0,1 μg /ml		79,9 \pm 1,6 ^{BCD}	66,3 \pm 1,6 ^A	77,3 \pm 2,6 ^{AB}
0,5 μg /ml		83,3 \pm 1,7 ^{AB}	62,8 \pm 1,7 ^{AB}	78,4 \pm 2,3 ^{AB}
1 μg /ml		88,5 \pm 1,3 ^A	65,3 \pm 1,6 ^A	66,7 \pm 1,7 ^{CD}
10 μg /ml		81,5 \pm 1,4 ^{ABC}	61,2 \pm 1,2 ^{AB}	71,6 \pm 1,0 ^{BCD}
20 μg /ml		76,5 \pm 1,9 ^{BCDEF}	58,8 \pm 1,3 ^B	62,2 \pm 1,5 ^D

^{ABCDEF} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 7. Média \pm se do parâmetro velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s vcl}$) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 $\mu\text{g/ml}$	118,9 \pm 2,3	121,8 \pm 2,3 ^{BCD}	93,9 \pm 2,1 ^D	117,9 \pm 4,5 ^{CDE}
0,0001 $\mu\text{g/ml}$		119,9 \pm 3,3 ^{CD}	100,4 \pm 1,6 ^{BCD}	135,9 \pm 4,0 ^{AB}
0,0005 $\mu\text{g/ml}$		134,9 \pm 2,8 ^A	105,7 \pm 2,0 ^{ABC}	126,3 \pm 3,5 ^{ABCD}
0,001 $\mu\text{g/ml}$		130,4 \pm 2,8 ^{ABCD}	107,0 \pm 2,3 ^{ABC}	127,7 \pm 1,8 ^{ABCD}
0,005 $\mu\text{g/ml}$		120,4 \pm 2,3 ^{CD}	110,2 \pm 2,0 ^{AB}	122,8 \pm 2,9 ^{BCDE}
0,01 $\mu\text{g/ml}$		128,3 \pm 1,7 ^{ABCD}	108,8 \pm 2,0 ^{ABC}	141,1 \pm 4,8 ^A
0,05 $\mu\text{g/ml}$		118,8 \pm 3,4 ^D	112,3 \pm 2,9 ^A	136,8 \pm 4,8 ^{AB}
0,1 $\mu\text{g/ml}$		133,8 \pm 2,8 ^{AB}	108,9 \pm 2,8 ^{ABC}	132,7 \pm 4,2 ^{ABC}
0,5 $\mu\text{g/ml}$		136,5 \pm 2,7 ^A	100,3 \pm 2,9 ^{BCD}	138,0 \pm 4,1 ^{AB}
1 $\mu\text{g/ml}$		136,6 \pm 2,3 ^A	110,6 \pm 2,8 ^{AB}	114,9 \pm 3,6 ^{DE}
10 $\mu\text{g/ml}$		135,3 \pm 2,9 ^A	104,6 \pm 2,1 ^{ABCD}	124,0 \pm 2,6 ^{BCD}
20 $\mu\text{g/ml}$		132,3 \pm 3,6 ^{ABC}	99,4 \pm 2,0 ^{CD}	106,3 \pm 2,6 ^E

^{ABCDE} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas ($P > 0.05$).

Tabela 8. Média \pm se do parâmetro velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$ vsI) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μg /ml	48,6 \pm 0,7	52,1 \pm 1,1 ^F	43,5 \pm 1,5 ^{BC}	47,2 \pm 0,7 ^{CDE}
0,0001 μg /ml		51,8 \pm 0,9 ^F	46,0 \pm 0,9 ^{ABC}	53,0 \pm 1,5 ^{ABC}
0,0005 μg /ml		60,1 \pm 1,3 ^{ABC}	46,9 \pm 1,1 ^{ABC}	55,4 \pm 1,4 ^{AB}
0,001 μg /ml		58,8 \pm 1,3 ^{BCD}	48,1 \pm 0,9 ^{AB}	55,9 \pm 1,0 ^{AB}
0,005 μg /ml		52,1 \pm 1,1 ^F	50,4 \pm 1,0 ^A	50,9 \pm 0,8 ^{BCD}
0,01 μg /ml		55,7 \pm 0,9 ^{CDEF}	49,8 \pm 1,3 ^A	57,5 \pm 1,9 ^A
0,05 μg /ml		50,8 \pm 1,0 ^F	49,4 \pm 1,5 ^{AB}	57,0 \pm 1,6 ^{AB}
0,1 μg /ml		57,8 \pm 1,1 ^{BCDE}	48,9 \pm 1,5 ^{AB}	56,1 \pm 1,8 ^{AB}
0,5 μg /ml		61,0 \pm 1,3 ^{AB}	46,8 \pm 1,5 ^{ABC}	56,8 \pm 1,4 ^{AB}
1 μg /ml		64,3 \pm 1,0 ^A	49,5 \pm 1,3 ^A	47,0 \pm 1,0 ^{DE}
10 μg /ml		59,1 \pm 1,0 ^{BCD}	44,9 \pm 1,0 ^{ABC}	51,0 \pm 0,7 ^{BCD}
20 μg /ml		54,2 \pm 1,3 ^{DEF}	42,5 \pm 1,1 ^C	44,4 \pm 1,1 ^E

^{ABCDEF} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 9. Média \pm se do parâmetro retilinearidade (% str) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	0,67 \pm 0,003	0,710 \pm 0,003 ^{CD}	0,739 \pm 0,006 ^{ABCDE}	0,710 \pm 0,01 ^{AB}
0,0001 μ g/ml		0,718 \pm 0,004 ^{ABCD}	0,752 \pm 0,003 ^{AB}	0,705 \pm 0,008 ^{AB}
0,0005 μ g/ml		0,722 \pm 0,002 ^{ABC}	0,731 \pm 0,005 ^{ABCDE}	0,729 \pm 0,006 ^{AB}
0,001 μ g/ml		0,730 \pm 0,004 ^A	0,755 \pm 0,003 ^A	0,736 \pm 0,008 ^A
0,005 μ g/ml		0,715 \pm 0,003 ^{BCD}	0,747 \pm 0,006 ^{ABCD}	0,721 \pm 0,008 ^{AB}
0,01 μ g/ml		0,712 \pm 0,002 ^{BCD}	0,745 \pm 0,005 ^{ABCD}	0,710 \pm 0,007 ^{AB}
0,05 μ g/ml		0,723 \pm 0,003 ^{ABC}	0,737 \pm 0,007 ^{ABCDE}	0,724 \pm 0,009 ^{AB}
0,1 μ g/ml		0,721 \pm 0,003 ^{ABC}	0,724 \pm 0,006 ^{DE}	0,723 \pm 0,004 ^{AB}
0,5 μ g/ml		0,726 \pm 0,003 ^{AB}	0,731 \pm 0,007 ^{BCDE}	0,725 \pm 0,007 ^{AB}
1 μ g/ml		0,722 \pm 0,003 ^{ABC}	0,749 \pm 0,003 ^{ABC}	0,704 \pm 0,006 ^{AB}
10 μ g/ml		0,718 \pm 0,004 ^{ABCD}	0,726 \pm 0,003 ^{CDE}	0,708 \pm 0,006 ^{AB}
20 μ g/ml		0,704 \pm 0,002 ^D	0,716 \pm 0,005 ^E	0,709 \pm 0,005 ^{AB}

^{ABCDE} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 10. Média \pm se do parâmetro linearidade (% lin) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μ g /ml	0,40 \pm 0,003	0,421 \pm 0,003 ^{CD}	0,450 \pm 0,006 ^{AB}	0,414 \pm 0,01 ^{ABCD}
0,0001 μ g/ml		0,441 \pm 0,007 ^{BC}	0,452 \pm 0,004 ^{AB}	0,388 \pm 0,006 ^D
0,0005 μ g/ml		0,440 \pm 0,004 ^{BC}	0,437 \pm 0,004 ^{ABCD}	0,441 \pm 0,008 ^A
0,001 μ g /ml		0,445 \pm 0,004 ^B	0,446 \pm 0,003 ^{ABC}	0,4346 \pm 0,007 ^{AB}
0,005 μ g/ml		0,430 \pm 0,005 ^{BC}	0,452 \pm 0,006 ^{AB}	0,413 \pm 0,005 ^{BCD}
0,01 μ g/ml		0,426 \pm 0,004 ^{BCD}	0,448 \pm 0,005 ^{AB}	0,403 \pm 0,004 ^{CD}
0,05 μ g/ml		0,434 \pm 0,006 ^{BC}	0,430 \pm 0,006 ^{BCD}	0,418 \pm 0,007 ^{ABC}
0,1 μ g/ml		0,428 \pm 0,002 ^{BCD}	0,442 \pm 0,006 ^{ABC}	0,418 \pm 0,003 ^{ABC}
0,5 μ g/ml		0,441 \pm 0,002 ^{BC}	0,459 \pm 0,006 ^A	0,409 \pm 0,004 ^{BCD}
1 μ g /ml		0,467 \pm 0,004 ^A	0,442 \pm 0,003 ^{ABC}	0,411 \pm 0,006 ^{BCD}
10 μ g/ml		0,434 \pm 0,005 ^{BC}	0,424 \pm 0,004 ^{CD}	0,411 \pm 0,006 ^{BCD}
20 μ g/ml		0,407 \pm 0,003 ^D	0,420 \pm 0,003 ^D	0,413 \pm 0,004 ^{BCD}

^{ABCD} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 11. Média \pm se do parâmetro wobble - oscilação (% wob) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	0,60 \pm 0,004	0,591 \pm 0,003 ^{BC}	0,605 \pm 0,005 ^B	0,577 \pm 0,007 ^{BC}
0,0001 μ g/ml		0,609 \pm 0,008 ^B	0,598 \pm 0,003 ^{BCD}	0,550 \pm 0,005 ^D
0,0005 μ g/ml		0,608 \pm 0,007 ^B	0,594 \pm 0,003 ^{BCD}	0,598 \pm 0,007 ^A
0,001 μ g/ml		0,609 \pm 0,006 ^B	0,589 \pm 0,003 ^{BCD}	0,587 \pm 0,004 ^{AB}
0,005 μ g/ml		0,598 \pm 0,006 ^{BC}	0,603 \pm 0,003 ^{BC}	0,571 \pm 0,003 ^{BC}
0,01 μ g/ml		0,596 \pm 0,005 ^{BC}	0,597 \pm 0,004 ^{BCD}	0,567 \pm 0,002 ^{BCD}
0,05 μ g/ml		0,596 \pm 0,006 ^{BC}	0,581 \pm 0,004 ^D	0,574 \pm 0,003 ^{BC}
0,1 μ g/ml		0,593 \pm 0,003 ^{BC}	0,608 \pm 0,007 ^{AB}	0,577 \pm 0,002 ^{BC}
0,5 μ g/ml		0,604 \pm 0,003 ^B	0,626 \pm 0,005 ^A	0,563 \pm 0,003 ^{CD}
1 μ g/ml		0,64 5 \pm 0,004 ^A	0,584 \pm 0,003 ^{CD}	0,583 \pm 0,006 ^{ABC}
10 μ g/ml		0,601 \pm 0,004 ^{BC}	0,581 \pm 0,004 ^D	0,577 \pm 0,004 ^{BC}
20 μ g/ml		0,576 \pm 0,003 ^C	0,584 \pm 0,002 ^D	0,581 \pm 0,003 ^{ABC}

^{ABCD} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 12. Média \pm se do parâmetro frequência de batimento cruzado ($\mu\text{m bcf}$) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μg /ml	27,4 \pm 0,1	29,3 \pm 0,2 ^{ABC}	29,6 \pm 0,2 ^{BCD}	30,9 \pm 0,2 ^{ABC}
0,0001 μg /ml		29,5 \pm 0,3 ^{ABC}	30,8 \pm 0,2 ^A	32,2 \pm 0,3 ^A
0,0005 μg /ml		28,4 \pm 0,3 ^{CD}	29,9 \pm 0,2 ^{BC}	31,5 \pm 0,4 ^{AB}
0,001 μg /ml		29,3 \pm 0,3 ^{ABC}	30,3 \pm 0,2 ^{AB}	31,8 \pm 0,3 ^{AB}
0,005 μg /ml		28,5 \pm 0,3 ^{BCD}	29,5 \pm 0,1 ^{CD}	31,4 \pm 0,2 ^{AB}
0,01 μg /ml		28,7 \pm 0,3 ^{BCD}	29,3 \pm 0,2 ^{CDE}	31,5 \pm 0,3 ^{AB}
0,05 μg /ml		29,9 \pm 0,2 ^A	29,7 \pm 0,2 ^{BC}	30,8 \pm 0,3 ^{BC}
0,1 μg /ml		29,5 \pm 0,2 ^{AB}	28,6 \pm 0,2 ^{EF}	31,6 \pm 0,4 ^{AB}
0,5 μg /ml		28,4 \pm 0,2 ^{BCD}	28,1 \pm 0,2 ^F	30,6 \pm 0,3 ^{BCD}
1 μg /ml		26,4 \pm 0,1 ^E	29,5 \pm 0,2 ^{BCD}	29,5 \pm 0,2 ^{CD}
10 μg /ml		27,9 \pm 0,1 ^D	28,8 \pm 0,2 ^{DEF}	29,7 \pm 0,2 ^{CD}
20 μg /ml		28,1 \pm 0,2 ^D	28,5 \pm 0,2 ^{EF}	29,3 \pm 0,3 ^D

^{ABCDEF} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas ($P > 0.05$).

Tabela 13. Média \pm se do parâmetro amplitude de deslocamento da cabeça (μm alh) espermática resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto			
	0 hora	2 horas	24 horas	48 horas
0 μg /ml	3,43 \pm 0,05	3,137 \pm 0,04 ^{BCD}	2,802 \pm 0,05 ^F	3,127 \pm 0,1 ^{CD}
0,0001 μg /ml		3,012 \pm 0,09 ^D	2,929 \pm 0,06 ^{DEF}	3,515 \pm 0,09 ^{ABB}
0,0005 μg /ml		3,238 \pm 0,05 ^{ABCD}	3,153 \pm 0,08 ^{ABCDE}	3,275 \pm 0,09 ^{ABC}
0,001 μg /ml		3,167 \pm 0,06 ^{ABCD}	3,017 \pm 0,07 ^{CDEF}	3,241 \pm 0,06 ^{ABC}
0,005 μg /ml		3,075 \pm 0,06 ^{CD}	3,049 \pm 0,07 ^{BCDEF}	3,207 \pm 0,08 ^{BCD}
0,01 μg /ml		3,219 \pm 0,05 ^{ABCD}	3,262 \pm 0,04 ^{ABC}	3,639 \pm 0,09 ^A
0,05 μg /ml		3,078 \pm 0,08 ^{CD}	3,403 \pm 0,04 ^A	3,600 \pm 0,11 ^{AB}
0,1 μg /ml		3,358 \pm 0,06 ^{ABC}	3,312 \pm 0,007 ^{AB}	3,428 \pm 0,08 ^{ABC}
0,5 μg /ml		3,445 \pm 0,05 ^A	3,181 \pm 0,06 ^{ABCD}	3,485 \pm 0,07 ^{ABC}
1 μg /ml		3,237 \pm 0,05 ^{ABCD}	3,153 \pm 0,05 ^{ABCDE}	3,335 \pm 0,09 ^{ABC}
10 μg /ml		3,423 \pm 0,07 ^{AB}	3,114 \pm 0,03 ^{BCDE}	3,490 \pm 0,09 ^{ABC}
20 μg /ml		3,388 \pm 0,07 ^{AB}	2,915 \pm 0,06 ^{EF}	2,821 \pm 0,06 ^A

^{ABCDEF} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 14. Média \pm se do parâmetro integridade de acrossoma das células resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	83,3 \pm 0,8 ^A	7,62 \pm 1,1 ^C
0,0001 μ g/ml	55,1 \pm 7,5 ^{AB}	65,8 \pm 6,7 ^{AB}
0,0005 μ g/ml	62,1 \pm 8,0 ^{AB}	58,3 \pm 5,9 ^{AB}
0,001 μ g/ml	63,2 \pm 8,7 ^{AB}	61,0 \pm 3,0 ^{AB}
0,005 μ g/ml	65,2 \pm 7,9 ^{AB}	59,2 \pm 7,9 ^{AB}
0,01 μ g/ml	61,6 \pm 7,4 ^{AB}	59,3 \pm 4,6 ^{AB}
0,05 μ g/ml	57,3 \pm 8,7 ^{AB}	60,9 \pm 4,0 ^{AB}
0,1 μ g/ml	58,1 \pm 8,4 ^{AB}	73,5 \pm 2,6 ^A
0,5 μ g/ml	50,3 \pm 9,7 ^{AB}	61,6 \pm 5,0 ^{AB}
1 μ g/ml	33,8 \pm 10,6 ^B	75,0 \pm 3,5 ^A
10 μ g/ml	30,1 \pm 10,2 ^B	60,8 \pm 1,7 ^{AB}
20 μ g/ml	35,9 \pm 7,8 ^B	47,7 \pm 8,3 ^B

^{AB} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05).

Tabela 15. Média \pm se do parâmetro funcionalidade de membrana das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	51,63 \pm 8,3 ^{AB}	37,3 \pm 4,3 ^{AB}
0,0001 μ g/ml	48,3 \pm 5,6 ^B	27,6 \pm 3,3 ^{AB}
0,0005 μ g/ml	55,3 \pm 5,5 ^{AB}	26,8 \pm 2,0 ^{AB}
0,001 μ g/ml	77,5 \pm 1,3 ^A	19,5 \pm 3,0 ^B
0,005 μ g/ml	59,1 \pm 8,8 ^{AB}	24,2 \pm 1,9 ^{AB}
0,01 μ g/ml	56,5 \pm 7,6 ^{AB}	32,1 \pm 6,0 ^{AB}
0,05 μ g/ml	56,9 \pm 5,6 ^{AB}	25,2 \pm 3,9 ^{AB}
0,1 μ g/ml	63,1 \pm 6,9 ^{AB}	30,2 \pm 3,3 ^{AB}
0,5 μ g/ml	64,4 \pm 4,3 ^{AB}	40,0 \pm 6,4 ^{AB}
1 μ g/ml	77,30 \pm 2,4 ^A	44,4 \pm 8,3 ^A
10 μ g/ml	80,6 \pm 2,0 ^A	32,8 \pm 9,3 ^{AB}
20 μ g/ml	62,1 \pm 2,5 ^{AB}	44,7 \pm 8,4 ^A

^{AB} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05)

Tabela 16. Média \pm se do parâmetro atividade mitocondrial das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	37221 \pm 4534 ^A	29124 \pm 724 ^C
0,0001 μ g/ml	59482 \pm 8692 ^A	93823 \pm 20359 ^A
0,0005 μ g/ml	48202 \pm 5944 ^A	28153 \pm 2082 ^C
0,001 μ g/ml	49902 \pm 5327 ^A	36435 \pm 7220 ^{BC}
0,005 μ g/ml	77263 \pm 24972 ^A	25952 \pm 704 ^C
0,01 μ g/ml	35278 \pm 465 ^A	33189 \pm 1917 ^C
0,05 μ g/ml	68309 \pm 4211 ^A	25531 \pm 3303 ^C
0,1 μ g/ml	54756 \pm 7818 ^A	18177 \pm 1098 ^C
0,5 μ g/ml	81725 \pm 15377 ^A	71950 \pm 17983 ^{AB}
1 μ g/ml	71973 \pm 19152 ^A	35462 \pm 4260 ^{BC}
10 μ g/ml	51874 \pm 18382 ^A	33873 \pm 1256 ^{BC}
20 μ g/ml	49061 \pm 10601 ^A	87272 \pm 14711 ^A

^{ABC} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05)

Tabela 17. Média \pm se do parâmetro peroxidação lipídica (lpo) nas células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g /ml	58,4 \pm 0,9 ^A	58,6 \pm 0,0 ^A
0,0001 μ g/ml	28,1 \pm 3,2 ^B	35,4 \pm 3,2 ^{AB}
0,0005 μ g/ml	27,0 \pm 3,0 ^B	38,8 \pm 3,9 ^{AB}
0,001 μ g /ml	24,7 \pm 2,0 ^B	43,0 \pm 3,1 ^{AB}
0,005 μ g/ml	28,8 \pm 2,8 ^B	44,8 \pm 2,3 ^{AB}
0,01 μ g/ml	30,2 \pm 3,0 ^B	46,0 \pm 2,6 ^{AB}
0,05 μ g/ml	28,8 \pm 2,9 ^B	40,9 \pm 4,2 ^{AB}
0,1 μ g/ml	27,3 \pm 3,0 ^B	33,1 \pm 5,6 ^{AB}
0,5 μ g/ml	21,3 \pm 1,0 ^B	32,5 \pm 6,6 ^{AB}
1 μ g /ml	20,8 \pm 0,8 ^B	42,0 \pm 4,1 ^{AB}
10 μ g/ml	22,3 \pm 1,0 ^B	36,6 \pm 5,1 ^{AB}
20 μ g/ml	23,0 \pm 3,9 ^B	26,3 \pm 5,9 ^B

^{AB} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05)

Tabela 18. Média \pm se do parâmetro espécies reativas de oxigênio (ros) das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	3153 \pm 113 ^A	1291 \pm 75 ^B
0,0001 μ g/ml	2422 \pm 291 ^B	3321 \pm 426 ^{AB}
0,0005 μ g/ml	2823 \pm 249 ^B	11808 \pm 3725 ^A
0,001 μ g/ml	2943 \pm 321 ^B	10980 \pm 3925 ^A
0,005 μ g/ml	2792 \pm 361 ^B	9558 \pm 3901 ^{AB}
0,01 μ g/ml	2796 \pm 422 ^B	3114 \pm 466 ^{AB}
0,05 μ g/ml	3385 \pm 394 ^B	3216 \pm 437 ^{AB}
0,1 μ g/ml	3872 \pm 715 ^B	2829 \pm 313 ^{AB}
0,5 μ g/ml	2227 \pm 155 ^B	3490 \pm 483 ^{AB}
1 μ g/ml	2103 \pm 279 ^B	2251 \pm 170 ^{AB}
10 μ g/ml	2216 \pm 141 ^B	2145 \pm 158 ^{AB}
20 μ g/ml	2937 \pm 339 ^B	2420 \pm 268 ^{AB}

^{AB} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05)

Tabela 19. Média \pm se do parâmetro integridade da membrana das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	17,0 \pm 1,6 ^{CDEF}	36,9 \pm 3,6 ^A
0,0001 μ g/ml	16,4 \pm 1,6 ^{CDEF}	22,4 \pm 1,0 ^{CD}
0,0005 μ g/ml	23,0 \pm 1,9 ^{ABC}	20,7 \pm 1,5 ^D
0,001 μ g/ml	22,7 \pm 1,4 ^{ABCD}	24,3 \pm 4,4 ^{BCD}
0,005 μ g/ml	15,4 \pm 1,6 ^{EF}	29,3 \pm 4,0 ^{ABCD}
0,01 μ g/ml	14,8 \pm 0,3 ^{EF}	20,5 \pm 1,4 ^D
0,05 μ g/ml	25,2 \pm 0,8 ^{AB}	23,3 \pm 1,4 ^{CD}
0,1 μ g/ml	21,2 \pm 1,5 ^{ABCDE}	31,3 \pm 2,8 ^{ABCD}
0,5 μ g/ml	16,2 \pm 0,4 ^{CDEF}	37,8 \pm 1,6 ^A
1 μ g/ml	15,5 \pm 1,7 ^{DEF}	37,7 \pm 2,1 ^A
10 μ g/ml	11,7 \pm 0,4 ^F	34,6 \pm 1,7 ^{ABC}
20 μ g/ml	20,0 \pm 1,4 ^{BCDE}	40,9 \pm 3,5 ^A

^{ABCDEF} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05)

Tabela 20. Média \pm se do parâmetro índice de fragmentação de dna (dfi) das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	6,53 \pm 0,33 ^{AB}	7,92 \pm 0,6 ^{CD}
0,0001 μ g/ml	6,60 \pm 1,1 ^{AB}	18,2 \pm 2,2 ^A
0,0005 μ g/ml	5,38 \pm 0,7 ^{AB}	13,7 \pm 2,0 ^{AB}
0,001 μ g/ml	8,02 \pm 2,2 ^A	7,34 \pm 1,0 ^{CD}
0,005 μ g/ml	3,82 \pm 0,7 ^{AB}	12,1 \pm 2,0 ^{BC}
0,01 μ g/ml	4,55 \pm 0,4 ^{AB}	9,21 \pm 0,7 ^{BCD}
0,05 μ g/ml	3,59 \pm 0,3 ^B	9,07 \pm 0,7 ^{BCD}
0,1 μ g/ml	5,22 \pm 0,7 ^{AB}	8,33 \pm 0,9 ^{BCD}
0,5 μ g/ml	4,32 \pm 0,8 ^{AB}	9,35 \pm 1,0 ^{BCD}
1 μ g/ml	6,52 \pm 0,9 ^{AB}	9,51 \pm 0,8 ^{BCD}
10 μ g/ml	7,70 \pm 0,6 ^{AB}	5,42 \pm 0,4 ^D
20 μ g/ml	7,11 \pm 1,0 ^{AB}	5,80 \pm 0,8 ^D

^{ABCD} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05)

Tabela 21. Média \pm se do parâmetro fluidez de membrana das células espermáticas resfriada com diferentes concentrações de kaempferol e diferentes períodos de exposição.

Kaempferol	Período de exposição do produto	
	24 horas	48 horas
0 μ g/ml	89768 \pm 4528 ^A	43397 \pm 8618 ^A
0,0001 μ g/ml	23387 \pm 8134 ^B	18019 \pm 5156 ^A
0,0005 μ g/ml	24193 \pm 8456 ^B	23831 \pm 4458 ^A
0,001 μ g/ml	23400 \pm 7339 ^B	33311 \pm 7915 ^A
0,005 μ g/ml	26079 \pm 9027 ^B	45736 \pm 12871 ^A
0,01 μ g/ml	21511 \pm 6979 ^B	37020 \pm 10094 ^A
0,05 μ g/ml	32195 \pm 11899 ^B	41254 \pm 11232 ^A
0,1 μ g/ml	29907 \pm 11217 ^B	38219 \pm 9363 ^A
0,5 μ g/ml	5204 \pm 283 ^B	45149 \pm 13019 ^A
1 μ g/ml	6479 \pm 401 ^B	18040 \pm 4376 ^A
10 μ g/ml	5081 \pm 239 ^B	24097 \pm 6131 ^A
20 μ g/ml	31974 \pm 12097 ^B	24260 \pm 7042 ^A

^{AB} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas (P>0.05)

3 Considerações Finais

As células espermáticas ovina sofrem diversos danos devido ao estresse oxidativo levando à perda da viabilidade, mesmo sob refrigeração. Portanto, o Kaempferol demonstrou-se um excelente antioxidante para redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e fluidez de membrana. Estes resultados podem embasar estudos futuros utilizando concentrações diferentes desta molécula, bem como, outros métodos de criopreservação, visando o uso do Kaempferol em protocolos a nível comercial.

Referências

ALAM, W.; KHAM, H.; SHAH, M. A.; CAULI, O.; SASO, L. Kaempferol as a Dietary Anti-Inflammatory Agent: Current Therapeutic Standing. **Molecules**, V. 25, p 4073, 2020.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; DE PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 30-42, 2006.

ARAÚJO, L. R. S.; BARROS, T. B.; GUIMARÃES, D. B.; CANTANHÊDE, L. F.; DIAS, A. V.; TONIOLLI, R. Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, p. 26-35, 2016.

BARRETO, R. M.; PESSOA, M. M. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno¹.

CAO, R.; FU, K.; LY, X.; LI, W.; ZHANG, N. Protective Effects of kaempferol on Lipopolysaccharide-induced Mastitis in Mice. **Inflammation**, v. 37, p. 1453- 1458, 2014.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.

CÂMARA, T. S.; NUNES, T. G. P.; TONIOLLI, R. Diluentes seminais para pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, p. 67-83, 2018.

DA FONSECA, J. F.; CRUZ, R. D. C.; FRANCO OLIVEIRA, M. E.; GONCALVES DE SOUZA, J. M.; MOREIRA VIANA, J. H. Biotecnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos. 2014.

DE LUCENA, C. C.; MARTINS, E.; MAGALHAES, K.; HOLANDA FILHO, Z. F. Produtos de origem caprina e ovina: mercado e potencialidades na região do Semiárido brasileiro. 2018.

DE OLIVEIRA, B. M. M.; PASSARINI, J. F. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS. **ISSN 1679-8902 Ano VII| Nº 9| Abr-Jun 2010**, p. 106.

DE SOUZA, J. D. F., DE SOUZA, O. R. G.; CAMPEÃO, P. Mercado e comercialização na ovinocultura de corte no Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 50., 2012, Vitória

DURACKA, M.; DEBACKER, M.; BUCKO, O.; LUKAC, N.; TVRDA, E. The effect of kaempferol and naringenin may improve the in vitro quality of stored boar semen. **Journal of Central European Agriculture**, v. 20, n.4, p. 1069-1-75, 2019.

HOFER, S.; GEISLER, S.; LISANDRELLI, R.; NGUYEN NGOC, H.; GANZERA, M.; SCHENNACH, H.; KURZ, K. Pharmacological targets of kaempferol within inflammatory pathways—a hint towards the central role of tryptophan metabolism. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 180, 2020.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo agropecuário 2021. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br> > Acesso em 22 mai. 2023.

JOFRÉ, I.; CUEVAS, M.; DE CASTRO, L. S.; DE AGOSTINI LOSANO, J. D.; TORRES, M. A.; ALVEAR, M.; ROMERO, F. Antioxidant Effect of a Polyphenol-Rich Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) extract and its effect on the regulation of metabolism in refrigerated boar sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 113-141, 2000.

MAGALHÃES, K. A.; HOLANDA FILHO, Z. F.; MARTINS, E. C.; DE LUCENA, C. C. Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal 2019. 2020.

MENEGUELLI, T.; MONICO, I. Z.; BELTRAME, R. T.; JUNIOR, N. N. M. MÉTODOS RUDIMENTARES PARA RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE OVINOS. **UNESC em Revista**, v. 2, n. 2, p. 12-26, 2018.

MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M. V.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil**. Texto para Discussão, 2021.

PAZ, Jessica Priscila. Uso de energético comercial como diluente de sêmen ovino resfriado. In: 27º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 7º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JUNIOR, Paraná, 2018.

NOGUEIRA, B. G.; BITENCOURT, J. L.; SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; COSTA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014.

ROCHA, M. F. G.; SALES, J. A.; ROCHA, M. G.; GALDINO, L. M.; AGUIAR, L.; NETO, W. A. P.; CORDEIRO, R. A.; BRANCO, D. S. C. M. C.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N. Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: a possible alternative for the control of fungal biofilms. **Biofouling**, v. 35, p. 320–328, 2019.

SEKIGUCHI, A.; MOTEGI, S. I.; FUJIWARA, C.; YAMAZAKI, S.; INOUE, Y.; UCHIYAMA, A.; AKAI, R.; IWAWAKI, T.; ISHIKAWA, O. Inhibitory effect of kaempferol on skin fibrosis in systemic sclerosis by the suppression of oxidative stress. **Journal of Dermatological Science**, v. 96, p. 8–17, 2019.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370–384, 2011.

SOUZA, W. L.; MORAIS, E. A.; TONIOLLI, R. Antioxidantes e crioprotetores na conservação do sêmen ovino. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 15, n. 1, p. 8051–8064, 2018.

YAO, X.; JIANG, H.; NANXU, Y.; PIAO, X.; GAO, Q.; KIM, N. H. Kaempferol attenuates mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by H₂O₂ during porcine embryonic development. **Theriogenology**, v135, p. 174-180, 2019.

ZHU, L.; XUE, L. Kaempferol Suppresses Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Breast Cancer Cells. **Oncology Research**, v. 27, p. 629–634, 2019.