



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS PROFESSORA CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

USO DA POLPA DESIDRATADA DO FRUTO DE
***MAURITIA FLEXUOSA* COMO SUPLEMENTO AO**
DILUENTE DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

HOMERO BATISTA DA ROCHA

Bom Jesus-PI

2018

HOMERO BATISTA DA ROCHA

**USO DA POLPA DESIDRATADA DO FRUTO DE
MAURITIA FLEXUOSA COMO SUPLEMENTO AO
DILUENTE DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

Dissertação apresentada ao *Campus* Profa. Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Zootecnia, na área de Produção Animal (linha de pesquisa Melhoramento e Reprodução Animal), para obtenção do título de Mestre.

Bom Jesus – PI

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS PROFESSORA CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


Título: Uso da Polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* como suplemento ao diluente de congelação do sêmen caprino

Autor: M. V. Homero Batista da Rocha


Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

Aprovado em 31 de agosto de 2018.


Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI
Membro Presidente



Prof. Dra. Janaina de Fátima Saraiva Cardoso
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI
Membro



Dr. Anísio Ferreira Lima Neto
Embrapa Meio Norte
Membro

Bom Jesus – PI

2018

Dedicatória

*À minha família, em especial ao meu
avô Guilherme Batista da Silva e
minha avó Maria Carmina da Silva;*

Com muito amor e felicidade, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e por me manter com saúde, calma e tranquilidade em todos os momentos da minha vida!

Aos meus avós, Guilherme Batista e Maria Carmina por sempre me incentivarem a seguir pelos bons caminhos e pela excelente educação me dada. Obrigado por não me fazerem desistir dos meus objetivos, amo vocês!

Ao meu orientador prof. Dr. Ney Rômulo, por ter paciência, muita presteza e apoio. O meu muitíssimo obrigado!

A Profa. Dra. Ana Lys Barradas Mineiro pessoa ímpar e de um coração enorme que disponibilizou o laboratório Fisiopatologia da Reprodução para execução de grande parte desta pesquisa!

Ao Prof. Dr. José Adalmir Torres que disponibilizou o laboratório de biotecnologia para realização de parte das análises. Obrigado pela disponibilidade!

Agradecer ao Jeferson Lustosa residente de reprodução animal (UFPI) por toda ajuda nas avaliações das sondas fluorescentes e análises estatísticas.

Agradecer ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) da Universidade Estadual do Ceará pelas análises no sistema computadorizado CASA, em especial ao doutorando Marcimar Sousa.

Aos meus amigos (Kenney Porfirio, Pedro Henrique Fonseca, Felipe Ferreira, Misael Santana, Leonardo Furtado, Bruno Pachêco) e amigas (Tuanny Damasceno, Allana, Marlene Sipaúba, Letícia Soares) que compõem o Grupo de Pesquisa Sanidade e Reprodução Animal pela ajuda em todo decorrer do trabalho e além disso pela amizade, bons momentos, todo apoio e incentivo!

Aos meus amigos que ganhei em Teresina-PI, Daniel Lopes e Matheus Leopoldo. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos de mestrado, obrigado pela amizade e companheirismo!

Aos terceirizados, em especial ao Sr. Narciso pela ajuda prestada e disponibilidade, obrigado!

À CAPES, pelo apoio financeiro que me possibilitou dedicar-me de forma integral e exclusivamente à realização das minhas atividades de mestrado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO GERAL	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	xiii
CAPITULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. BIOQUÍMICA DO SÊMEN E DILUENTES SEMINAIS PARA CAPRINOS	18
3. CRIOPROTETORES SEMINAIS UTILIZADOS NO SÊMEN CAPRINO	20
4. MECANISMO TAMPÃO E CONTROLE DA OSMOLARIDADE NO SÊMEN CAPRINO.....	22
5. CRIOINJÚRIAS ESPERMÁTICAS	22
6. TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO SEMINAL <i>IN VITRO</i>	24
7. <i>COMPUTER-ASSISTED SPERM ANALYSIS (CASA)</i>	26
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
9. AGRADECIMENTOS	27
10. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES	27
11. REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 – Uso da Polpa desidratada do fruto de <i>Mauritia flexuosa</i> como suplemento ao diluente de congelação do sêmen caprino	36
RESUMO	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. METODOLOGIA	39
2.1 Locais experimentais	39
2.1 Animais Experimentais.....	39
2.3 Processamento do extrato bruto da polpa do fruto de <i>Mauritia flexuosa</i>	39
2.4 Coleta e análises seminais	40
2.5 Etapa 1	40
2.6 Etapa 2	41
2.7 Criopreservação seminal.....	41
2.8 Análises do sêmen pós-descongelação	42
2.9 Análise da morfologia espermática após descongelação.....	42
2.10 Análise da integridade da membrana e potencial mitocondrial.....	42
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4. RESULTADOS	43
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES.....	52
7. CONFLITO DE INTERESSES	53
8. AGRADECIMENTOS.....	53
9. REFERÊNCIAS	53

ANEXO - A	59
ANEXO - B	60

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Média (\pm d. p.) dos parâmetros motilidade (%) e do vigor (0-5) <i>pool</i> do sêmen caprino submetido ao teste de termorresistência (TTR) lento, pós-diluição em TRIS contendo ou não diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de <i>Mauritia flexuosa</i>	44
Tabela 2. Média (\pm d.p.) do percentual de espermatozoides morfologicamente normais do <i>pool</i> do sêmen caprino, submetido ao TTR lento, pós-diluição em TRIS contendo ou não diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de <i>Mauritia flexuosa</i>	45
Tabela 3. Média (\pm d. p.) dos parâmetros espermáticos (MT, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, WOB) do sêmen caprino criopreservado em meio TRIS-2,5% gema de ovo acrescido ou não de diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de <i>Mauritia Flexuosa</i> avaliados pelo CASA.....	47
Tabela 4. Média (\pm d. p.) dos parâmetros espermáticos para integridade de membrana plasmática (MP) e potencial de membrana mitocondrial (MM), pós-descongelção de espermatozoides caprinos em meio TRIS-2,5% gema acrescido ou não de diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de <i>Mauritia Flexuosa</i>	48

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Grupo controle e tratamentos à base da polpa desidratada do fruto de <i>Mauritia flexuosa</i>	39
Quadro 2. Grupo controle e tratamentos à base da polpa desidratada do fruto de <i>Mauritia flexuosa</i> adicionado 7% de glicerol.....	40
Quadro 3. Grupo controle e tratamentos à base de Tris-gema 2,5% contendo diferentes concentrações da polpa desidratada de <i>Mauritia flexuosa</i> ...	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FAO	Food and Agriculture Organization
%	Porcentagem
et al.	Colaboradores
pH	Potencial hidrogeniônico
Tris	Hidroximetilaminometano
°C	Graus Célsius
mL	microlitro
HOST	Teste hiposmótico
FDA	Diacetato de carboxifluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CASA	<i>Comuter-Assisted Sperm Analysis</i>
MT	Motilidade Total
MP	Motilidade progressiva
VAP	Velocidade de Trajeto
VCL	Velocidade linear
BCF	Frequência de batimentos flagelares
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
STR	Retilinearidade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
β	Beta
Kg	Quilograma
+	Mais
μ L	Microlitro
mm	Milimetro
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
LTDA	Limitada
μ m/s	Micrometro por segundo
IP	Iodeto de propídeo
TTR	Teste de Termorresistência

RESUMO GERAL

ROCHA, H. B. **Uso da Polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* como suplemento ao diluente de congelação do sêmen caprino.** 2018. 61P. Dissertação (Dissertação em zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Objetivou-se avaliar a qualidade *in vitro* do sêmen caprino utilizando diluente a base da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa*. Para isso o extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa* foi diluído em solução tampão em diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 10%) e foram avaliados pH e osmolaridade a 37 °C e após 24 horas de estocagem a 3 °C. Foram utilizados 3 caprinos, com idade média de 6 anos, clinicamente saudáveis. Foram utilizados 30 pools de sêmen dos 3 bodes. A coleta do sêmen foi realizada com auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida ($\pm 39^{\circ}\text{C}$) e acoplada a um tubo coletor graduado. O experimento foi realizado em duas fases. Sendo a primeira realizada o teste de toxicidade *in vitro* no total de 15 *pools*, sendo 15 coletas por animal. Os *pools* foram avaliados com a adição de 0,25%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 10% do diluente a base do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa* e avaliados os parâmetros espermáticos. Na segunda fase foram utilizados mais 15 pools de sêmen, que posteriormente foram diluídos em Tris-gema-glicerol GC e tris-glicerol contendo as melhores concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa*. As amostras foram submetidas a rampa de criopreservação com auxílio do aparelho Tk 3000[®]. Posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos. Após a descongelação as amostras foram avaliadas no sistema CASA quanto os parâmetros de motilidade total (MT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL), velocidade de percurso (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), índice de oscilação (WOB) e morfologia espermática pelo método de panótico rápido, atividade mitocondrial e integridade de membrana. A análise estatística dos dados foi realizada pelo PROC GLM do software SAS[®] e quando verificada significância ($p < 0,05$) procedeu-se o teste de Tukey. Na primeira etapa os grupos contendo baixa quantidade de extrato foram estatisticamente iguais ao grupo controle ($p > 0,05$). Já na segunda etapa, após descongelação os grupos contendo tris-2,5% gema ou não, foi observado diferença estatística entre os grupos testados nos parâmetros de VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, WOB ($p < 0,05$). Ademais pode se constatar que o extrato de origem vegetal atuou de forma benéfica adicionado ao diluente Tris-2,5% gema ou isento no sêmen caprino. A polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* adicionado no diluente tris-2,5% gema ou não em baixas concentrações permitiu a manutenção da viabilidade espermática no processamento/criopreservação no *pool* do sêmen caprino, podendo ser uma alternativa viável para aplicação a campo.

Palavras-chave: Caprinos, extrato bruto de *Mauritia flexuosa*, criopreservação

ABSTRACT

ROCHA, H. B. **Use of dehydrated pulp of *Mauritia flexuosa* fruit as a supplement to the freezing diluent of goat semen.** 2018. 61P. Dissertation (Dissertation in zootechnics) - Federal University of Piauí, 2018.

The objective was to evaluate the in vitro quality of goat semen using diluent based on the fruit pulp of *Mauritia flexuosa*. For this purpose, crude extract of *Mauritia flexuosa* fruit pulp was diluted in buffer solution at different concentrations (0.25%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% and 10%) and pH and osmolarity were evaluated at 37 ° C and after 24 hours of storage at 3 ° C. Three goats, with a mean age of 6 years, were used clinically healthy. We used 30 pools of semen from the 3 goats. Semen collection was performed using a specific artificial vagina for small ruminants, preheated (± 39 ° C) and coupled to a graduated collection tube. The experiment was carried out in two phases. The first was the in vitro toxicity test in a total of 15 pools, 15 of which were collected per animal. The pools were evaluated with the addition of 0.25%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% and 10% of the diluent based on the crude extract of the fruit pulp of *Mauritia flexuosa* and evaluated the spermatic parameters. In the second phase, a further 15 semen pools were used, which were later diluted in Tris-gem-glycerol GC and tris-glycerol containing the best concentrations of the crude extract of the pulp of the *Mauritia flexuosa* fruit. The samples were submitted to a cryopreservation ramp using the Tk 3000® device. Subsequently, the vanes were immersed in liquid nitrogen (-196 ° C) and stored in cryogenic cylinders. After thawing the samples were evaluated in the CASA system for the parameters of total motility (MT), curvilinear velocity (VCL), linear velocity (VSL), speed of travel (VAP), linearity (LIN), rectilinearity (STR), displacement (ALH), cross-beat frequency (BCF), oscillation index (WOB), and rapid panoptic sperm morphology, mitochondrial activity and membrane integrity. Statistical analysis of the data was performed by PROC GLM of the SAS® software and when the significance was verified ($p < 0.05$) the Tukey test was performed. In the first stage the groups containing low amount of extract were statistically equal to the control group ($p > 0.05$). In the second stage, after thawing the groups containing tris-2,5% yolk or not, a statistical difference was observed between the groups tested in VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, WOB ($p < 0, 05$). In addition it can be verified that the extract of plant origin acted in a beneficial way added to the diluent Tris-2,5% yolk or exempt in goat semen. The dehydrated pulp of *Mauritia flexuosa* fruit pulp added in the tris-2,5% yolk diluent or not at low concentrations allowed the maintenance of the sperm viability in the cryopreservation process in the goat semen pool and could be a viable alternative for field application.

Key-words: Goats, *Mauritia flexuosa* crude extract, cryopreservation

INTRODUÇÃO GERAL

A caprinocultura e ovinocultura são atividades produtivas realizadas em grande parte do Brasil, destacando as regiões Sul e Nordeste, locais onde se concentram o maior número desses animais. Vale ressaltar que a caprinocultura está aumentando na demanda nacional e mundial. A caprinocultura tem ganhado destaque no agronegócio brasileiro, com um rebanho acima de nove milhões de animais (FAO, 2016). O Estado do Piauí figura entre os grandes produtores, possuindo cerca de 1.228.950 cabeças de caprinos, representando segundo dados da FAO (2016), 13,5% do rebanho da região nordeste.

Entretanto a cadeia produtiva de caprinos ainda se caracteriza pela alta mortalidade dos rebanhos, provocada pelo nível tecnológico precário, gerando uma oferta irregular do produto e animais com maiores custos, causado pelo longo tempo de criação entre o nascimento e o abate (CORREIA et al., 2000). Diante disso, torna-se necessário a adoção de inovações tecnológicas voltadas a reprodução que surge como um fator de potencial favorável ao desenvolvimento da caprinocultura. Conforme relatos feitos por Teixeira et al. (2013), as inovações tecnológicas na área da reprodução para pequenos ruminantes ainda são limitadas, pela complexidade de manipulação trato reprodutivo, diferente dos grandes ruminantes, pois a prática é favorecida pela manipulação retal. Todavia, a inseminação artificial permite o crescimento da produção, pois dissemina a genética de qualidade superior no rebanho através de reprodutores selecionados. Essa biotecnologia, aliada a outras técnicas conhecidas e utilizadas há algum tempo como a indução e sincronização estral, possibilitam a produção de crias, carne e leite em determinados períodos do ano que não ocorreriam de forma natural, devido às espécies caprina e ovina serem poliéstricas estacionais de dias curtos (FONSECA, 2006), entretanto quanto mais próximo da linha do Equador (Regiões Nordeste e Norte) a estacionalidade é menor, desta forma pode se inferir que havendo aporte nutricional adequado os pequenos ruminantes apresentaram ciclicidade durante o ano todo (FONSECA, 2005).

Para a aplicação desta biotécnica torna-se imprescindível a utilização de sêmen de boa qualidade quando se almeja sucesso na inseminação artificial, por esse motivo seu processamento deve preservá-lo ao máximo. Ao longo dos últimos 60 anos houve o desenvolvimento progressivo das técnicas de congelação seminal. Vários diluentes e técnicas de criopreservação são descritas em diferentes espécies animais, como por exemplo, em bubalinos (CHACUR, 1996), caprinos (JIMENEZ-RABADAN et al.,

2013) e ovinos (AISEN et al., 2002). Neste sentido, no processo de criopreservação espermática, é necessário que o diluente proporcione a capacidade de manter o pH adequado, fornecer proteção e preservar a viabilidade celular, osmolaridade adequada e, ainda, capacidade de proteger os espermatozoides contra crioinjúrias (SALAMON; MAXWEL, 2000).

O Brasil em sua diversidade possui vários tipos de frutas nativas, acompanhadas de características sensoriais ímpares com alto teor nutricional e econômico (RUFINO et al., 2010). Como exemplo a polpa do fruto de *Mauritia flexuosa*, composta por carotenoides, polifenóis e ácido ascórbico, pode ser utilizada na prevenção de inúmeras doenças oriundas do estresse oxidativo, e possui quantidades consideráveis de caroteno sendo superior ao encontrado na couve e cenoura. Sua fração lipídica é composta por tocoferol e óleos que em sua maioria são ácidos graxos, oleico, palmítico e ômega-9, que contribuem na prevenção de doenças cardíacas. A polpa do fruto de *Mauritia flexuosa* possui elevadas quantidades de aminoácidos sulfurados importantes para bebês prematuros e triptofano precursor de niacina, composta também de fibras e dispõe da presença de diversos minerais (MANHÃES, 2007).

Face ao exposto, apesar dos vários estudos desenvolvidos utilizando diluentes de origem vegetal na biotecnologia do sêmen, há poucos relatos sobre a eficiência da polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* na conservação seminal. O presente trabalho foi elaborado para avaliar a viabilidade *in vitro* do sêmen caprino diluído em Tris contendo diferentes concentrações da polpa desidratada de *Mauritia flexuosa* e em Tris contendo 2,5% gema de ovo adicionado diferentes concentrações da polpa de desidratada de *Mauritia flexuosa*.

Esta dissertação foi desenvolvida e encontra-se estruturada conforme as normas para elaboração de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPI, com a seguinte organização: Introdução Geral; CAPÍTULO 1. Revisão de literatura elaborada de acordo com as normas da Revista Ciência Rural. CAPÍTULO 2. Artigo científico intitulado: “Uso da Polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* como suplemento ao diluente de congelamento do sêmen caprino”, elaborado de acordo com as normas da revista *Small Ruminant Research*.

CAPITULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

Elaborada de acordo com as normas da Revista Ciência Rural

(<http://www.scielo.br/revistas/cr/pinstruc.htm>)

1 **Avanços das biotécnicas reprodutivas na criopreservação do sêmen caprino**

2 **Advances in reproductive biotechnology in cryopreservation of goat sêmen**

3 **Homero Batista da Rocha^I, Ney Rômulo de Oliveira Paula^{II*}**

4
5 **-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-**

6
7 ^(I) Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Bairro
8 Planalto Horizonte s/n, Bom Jesus-PI, CEP: 64900-000, Brasil

9 ^(II) Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí,
10 Bairro Ininga s/n, Teresina – PI, CEP: 64049-550, Brasil.

11 *Autor para correspondência: E-mail: neyromulo@ufpi.edu.br

12 **RESUMO**

13 Esta revisão de literatura propõe como objetivo informar através de um compilado de
14 informações de artigos científicos sobre os avanços na aplicação das biotécnicas
15 reprodutivas na conservação do sêmen caprino. A vista disso, a biotécnica de
16 criopreservação espermática auxilia significativamente neste processo, tornando
17 necessário relatar os processos envolvendo a congelação seminal para armazenamento
18 por longos períodos e para isso ainda são utilizados meios de conservação compostos de
19 substâncias de origem animal, a exemplo da gema de ovo e do leite desnatado, e esses
20 produtos além de implicar em riscos sanitários, podem inviabilizar a comercialização
21 internacional de doses inseminantes, diminuindo desta forma a difusão de material
22 genético de valor superior, além de que essas substâncias já consagradas na literatura
23 apresentam resultados satisfatórios, porém que não podem ser mais superados com a sua
24 utilização. Apesar do consagrado sucesso das pesquisas na criopreservação de sêmen
25 caprino, aliado a outros componentes como meios diluentes e crioprotetores que
26 participam de forma significativa na manutenção da viabilidade espermática no pós-
27 descongelamento, ainda são necessárias mais pesquisas visando otimizar ainda mais esta
28 biotécnica reprodutiva.

29
30 **Palavras-chave:** Caprinocultura, Criopreservação, Diluentes de origem vegetal

31
32
33
34
35
36
37
38
39

1 **ABSTRACT**

2 This literature review aims to inform through a compilation of information from
3 scientific articles on the advances in the application of reproductive biotechnology in
4 the conservation of goat semen. In view of this, the biotechnology of sperm
5 cryopreservation helps significantly in this process, in view of this it is necessary to
6 report the processes involving the seminal freezing for storage for long periods and for
7 this still means of conservation composed of substances of animal origin are used, for
8 example the egg yolk and skimmed milk, and these products, as well as implying health
9 risks, may prevent the international marketing of inseminating doses, thus reducing the
10 dissemination of genetic material of superior value, in addition to those substances
11 already enshrined in the literature present results satisfactory but can not be overcome
12 with their use. Despite the established success of research on cryopreservation of goat
13 semen, together with other components such as diluents and cryoprotectants, which play
14 a significant role in maintaining sperm viability in post-thawing, further research is still
15 needed to further optimize this reproductive biotechnology.

16
17 **Key words:** Goats, Cryopreservation, Diluents of plant origin

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura exerce grande importância no setor do agronegócio brasileiro com um rebanho acima de nove milhões de animais (FAO, 2016), onde a região Nordeste se destaca pelo seu elevado efetivo de animais com mais de 9 milhões de animais (FAO, 2016). A demanda por proteína animal de qualidade tem aumentado pelos consumidores, necessitando que o mercado se adapte a essas exigências (ANUALPEC, 2012). Entretanto, há necessidade de aperfeiçoamento dos sistemas de manejo sanitário, alimentar, reprodutivo e zootécnico dos rebanhos. Dentro desse contexto, a utilização de biotécnicas reprodutivas que contribuam com o melhoramento genético de caprinos são importantes pois contribuem com o sucesso, aumentando a produtividade.

Dentre essas biotécnicas a inseminação artificial ganha destaque por permitir a utilização de indivíduos melhorados. Além disso, evita o deslocamento de animais, os custos com a manutenção de machos reprodutores na propriedade e controle de enfermidades reprodutivas (TRALDI, 1994). Neste contexto, a criopreservação seminal tem sido amplamente empregada objetivando o aumento reprodutivo, sendo uma biotécnica imprescindível nos programas de inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões (HAFEZ; HAFEZ, 2004). E o emprego de diluentes nestas biotécnicas exercem grande importância, na conservação do sêmen caprino. Que por sua vez devem aumentar o ejaculado, manter pH adequado, evitar crioinjúrias e ainda apresentar efeitos benéficos sobre a fertilidade (SALAMON; MAXWEL, 2000).

Diante disso, esta revisão de literatura foi desenvolvida com o objetivo de difundir conhecimentos relacionados aos avanços das biotécnicas reprodutivas na criopreservação do sêmen caprino.

2. BIOQUÍMICA DO SÊMEN E DILUENTES SEMINAIS PARA CAPRINOS

O sêmen caprino possui particularidades distintas das outras espécies, destas destaca-se a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbouretrais, liberadas no plasma seminal (BEZERRA, 2010). Ainda conforme esses autores, essas enzimas hidrolisam lecitina, fosfolipídios em maior quantidade nas membranas plasmáticas, em lisolecitinas e ácidos graxos, que são altamente tóxicos para os espermatozoides. Diante desse contexto, as composições enzimáticas do sêmen e dos diluentes seminais de caprinos são de grande importância no processo de conservação seminal desta espécie.

1 Neste contexto, os diluentes são utilizados objetivando aumentar o volume do
2 ejaculado, entretanto devem permitir a sobrevivência dos gametas masculinos e que
3 sejam isentos de substâncias tóxicas (GONÇALVES et al., 2001). Contudo é importante
4 ressaltar que um diluente de qualidade deve proporcionar substâncias que proteja as
5 células espermáticas contra o choque térmico, soluções tampão utilizadas para manter o
6 pH, manter a pressão osmótica ideal (aproximadamente 300 mOsm), o equivalente ao
7 sêmen, possuir antibióticos, com amplo espectro bacteriano. Além do mais, é necessário
8 proporcionar substratos adicionais objetivando manter o metabolismo de energia do
9 espermatozoide (CHACUR et al., 2012). Geralmente, os ingredientes de um diluente
10 variam desde componentes químicos puros a produtos de origem animal ou vegetal
11 (GIL et al., 2003).

12 Os diluentes comumente utilizados são a base de Tris (hidroximetil
13 aminometano) (MAIA et al., 2008), leite desnatado (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A gema
14 de ovo também possui capacidade de proteger os espermatozoides contra crioinjúrias
15 (ABOAGLA; TERADA, 2004) e reduz as trocas metabólicas que atuam de forma
16 negativa na motilidade (AHMAD et al., 2008). As macromoléculas a exemplo da
17 caseína do leite, as proteínas contidas na gema de ovo e o glicerol são atualmente, os
18 crioprotetores mais adicionados nos diluentes de sêmen dos ovinos (VALENTE et al.,
19 2010).

20 Entretanto, é necessário considerar um fator, exclusivo do macho caprino, pois
21 as glândulas bulbouretrais produzem, de forma singular, uma fosfolipase responsável
22 por hidrolisar a lecitina da gema de ovo, produzindo ácidos graxos e lisolecitina, esta
23 última age na membrana espermática causando danos (ROY, 1957). Nunes et al. (1982)
24 descobriram a existência de uma fração protéica do plasma seminal (BU-III), oriunda
25 das glândulas bulbouretrais, que atua em conjunto do leite, inibindo a motilidade dos
26 espermatozoides promovendo uma reação acrossômica. Ainda estes mesmos autores
27 relataram que essa lisolecitina é tóxica por exercer ação detergente sobre os lipídios da
28 membrana plasmática.

29 Todavia, a utilização de aditivos de origem animal na diluição seminal resulta
30 em riscos sanitários, não favorecendo apenas aos agentes microbiológicos, mas também
31 por contaminantes capazes de colocar em risco a qualidade do produto (GIL et al.,
32 2003). Em vista disso, tem sido utilizado diluentes de origem vegetal a exemplo da água
33 de coco (OLIVEIRA et al., 2011) e lecitina de soja (FOROUZANFAR et al., 2010)

1 estão sendo utilizados para a criopreservação seminal, apresentando bons resultados
2 quando utilizado no sêmen de ovinos e caprinos.

3 Neste sentido, a água de coco tem apresentado como excelente diluente para o
4 sêmen de caprinos, pela presença de uma molécula do grupo das auxinas, denominado
5 de ácido 3-indol-acético, que confere as células espermáticas aumento na motilidade e
6 no vigor espermático (SALLES, 1989). Além do mais, este diluente contém na sua
7 composição aminoácidos açúcares, vitaminas e minerais. O mesmo autor relata que, por
8 causa da baixa concentração de fosfolipídeos, a água de coco ainda não apresenta
9 características favoráveis como diluente na criopreservação espermática, neste sentido
10 quando utilizada para a criopreservação, recomenda-se acrescentar 2,5% de gema de ovo
11 (OLIVEIRA et al., 2011).

12 A lecitina de soja, um composto fosfolipídico natural, sendo constituído
13 principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e ácido
14 fosfatídico (DALMAZZO, 2012), também ácidos graxos esteárico, oleico e palmítico,
15 os quais prevalecem nas membranas biológicas, conferindo estabilidade estrutural
16 (CRESPILO et al., 2014). Mesmo apresentando composição lipídica compatível com
17 a membrana espermática do caprino, os resultados do uso da lecitina de soja no sêmen
18 dessa espécie são inconsistentes (SALMANI et al., 2014; VIDAL et al., 2013).

19 **3. CRIOPROTETORES SEMINAIS UTILIZADOS NO SÊMEN CAPRINO**

20 A criopreservação seminal é uma biotécnica que trouxe inúmeros benefícios à
21 reprodução animal, seja para animais de interesse econômico ou aqueles ameaçados de
22 extinção, ou mesmo no tratamento da infertilidade masculina (WATSON, 2000). Essa
23 biotécnica pode ser utilizada basicamente de duas formas; na refrigeração ou na
24 congelação seminal (YOSHIDA, 2000).

25 Neste sentido torna-se necessário a utilização de crioprotetores com o intuito de
26 reduzir os danos físicos e químicos causados pelos processos de refrigeração,
27 criopreservação e descongelação dos espermatozoides (PURDY, 2006). A caseína
28 presente no leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol são os crioprotetores
29 comumente utilizados nos diluentes seminais (EVANS; MAXWELL, 1987). Estes
30 podem ser classificados como crioprotetores penetrantes (intracelular) e crioprotetores
31 não penetrantes (extracelular) (CORCUERA et al., 2007).

32 Os crioprotetores penetrantes (intracelulares) são caracterizados por moléculas
33 de tamanho pequeno que agem tanto no meio intracelular e extracelular, que pode
34 atravessar a membrana plasmática e controlar a pressão osmótica intra e extracelular

1 (AMANN, 1999). Possuem capacidade de desidratar as células, com menor formação de
2 cristais de gelo interno, e conseqüente reduzindo danos a membrana do espermatozoide
3 no pós-descongelamento. Os mais utilizados são o glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol,
4 dimetilsulfóxido e dimetilformamida (GRAHAM, 1995).

5 O glicerol também é o mais eletivo para a criopreservação seminal de caprinos
6 (PURDY, 2006). Este promove a redução da concentração do soluto nos meios intra e
7 extracelulares, reduzindo a formação e tamanho dos cristais de gelo (DALIMATA;
8 GRAHAM, 1997) através de ligações de hidrogênio em meio as moléculas de água e
9 seus três grupos funcionais de hidroxilas. Porém o crioprotetor pode causar danos ao
10 sêmen de caprinos, conter graus de toxicidade em concentrações acima de 7%
11 (LEBOUEF et al., 2000). Os danos envolvem mudanças nas estruturas citoplasmáticas,
12 modificação da polimerização da tubalina e interferência direta nas proteínas da
13 membrana plasmática (PARKS; GRAHAM, 1992).

14 Os crioprotetores não penetrantes atuam em nível de membrana espermática,
15 alterando-a, agem como soluto e reduzem o ponto de congelamento do meio. Os principais
16 crioprotetores não penetrantes comumente empregados tem como base a gema de ovo
17 e/ou leite desnatado (SILVA; GUERRA, 2011), as lipoproteínas e a lecitina
18 (fosfatidilcolina) da gema de ovo, a lactose e as caseínas preservam as células
19 espermáticas contra crioinjúrias (DALMAZZO, 2012).

20 Por conta da sensibilidade do sêmen caprino aos diluentes contendo gema de
21 ovo e/ou leite, também pela sua composição ser variável e pelos riscos sanitários
22 resultantes da presença desses produtos de origem animal nos crioprotetores não
23 penetrantes nos diluentes seminais, crioprotetores isentos de substratos de origem
24 animal, a exemplo da lecitina de soja, tem sido utilizado na criopreservação espermática
25 de caprinos (SALMANI et al. 2014; VIDAL et al., 2013), bovinos (CRESPILHO et al.,
26 2014), bubalinos (AKHTER et al., 2012), caninos (DALMAZZO, 2012), ovinos (DEL
27 VALLE et al., 2012), equinos (PAPA et al., 2011) e suínos (ZHANG et al., 2009).

28 Outras fontes de origem vegetal têm sido utilizadas na criopreservação do sêmen
29 de pequenos ruminantes. Del Valle et al. (2013) analisando o sêmen ovino após
30 descongelamento utilizando o óleo de coco em meio ao óleo de palma ao diluente não
31 constataram diferença entre os grupos testados. Entretanto, Santos (2013) encontraram
32 motilidade espermática progressiva satisfatória após a inclusão de 4% do óleo de coco
33 ao meio diluente de caprinos.

1 4. MECANISMO TAMPÃO E CONTROLE DA OSMOLARIDADE NO SÊMEN 2 CAPRINO

3 A atividade metabólica da célula espermática resulta em formação de um meio
4 ácido, o que reduz o potencial hidrogênioônico (pH) no diluente. E ainda, caso haja
5 bactérias no sêmen diluído estas irão produzir metabólitos que também diminuem o pH
6 do meio (YÁNIZ et al., 2011). O pH adequado para preservação dos parâmetros
7 espermáticos é próximo da neutralidade, desta forma, grande parte dos meios diluentes é
8 tamponada com pH 6,9 e 7,1 (ENGLAND; PONZIO, 1996).

9 Todavia a maior parte dos diluentes seminais de caprinos possuem pH variando
10 entre 6,0 a 8,0 e ainda torna-se necessário impedir grandes flutuações de pH, pois estas
11 possibilitam a perda da capacidade fecundante ou mortalidade espermática (PURDY,
12 2006).

13 De forma natural, quem exerce poder tampão sobre sêmen caprino é o plasma
14 seminal. Entretanto, nos casos onde o plasma seminal é removido *in vitro*, é
15 imprescindível que seja adicionado substâncias com poder tamponante aos diluentes.
16 Por isso, meios tampões a exemplo do citrato de sódio, fosfato, Tris e os tampões
17 zwitteriônicos (TES, BES, HEPES e MOPS) são rotineiramente utilizados para
18 controlar o pH dos diluentes (PURDY, 2006).

19 A sobrevivência do espermatozoide caprino se dá em alta faixa de gradiente
20 osmótico, de 250 a 625 mOsm. Porém, é recomendado que osmolaridade do meio seja
21 mantida num gradiente de 300 a 320 mOsm (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995).
22 Conforme pesquisa realizada por Purdy (2006) o espermatozoide caprino apresenta
23 maior viabilidade quando em meio mais hiperosmótico. Diante disso, maiores danos
24 podem ser evitados quando os espermatozoides caprino são criopreservados em
25 diluentes com osmolaridade entre 425 e 525 mOsm.

26 5. CRIOINJÚRIAS ESPERMÁTICAS

27 A criopreservação é um procedimento que causa danos aos espermatozoides por
28 reduzir seu tempo de sobrevivência e, por consequência, sua capacidade fertilizante
29 (YESTE et al., 2014a). A redução na fertilidade se dá pelo impacto do processo de
30 congelação/descongelação sobre a integridade da membrana plasmática e de outros
31 parâmetros funcionais (WATSON, 2000). É importante salientar as variações inerentes
32 de cada indivíduo e ejaculados relacionados à tolerância espermática ao congelamento,
33 podem ser observados em várias espécies (CASAS et al., 2009; YESTE et al., 2013;
34 2014b). A fase mais complicada se dá durante as etapas de criopreservação e

1 descongelção, onde ocorrem oscilações no volume da célula, favorecendo as injúrias
2 quando os limites de tolerância das membranas são ultrapassados (BECKER-SILVA,
3 2004).

4 O processo de refrigeração do sêmen decorre em faixas de temperaturas que
5 variam de 2 a 15°C, sendo mais comum de 4 a 5 °C (LEBOEUF et al., 2000). Esse
6 procedimento tem como objetivo reduzir de forma reversível a motilidade e a atividade
7 metabólica do espermatozoide através da diminuição gradual da temperatura
8 (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1995). Segundo Bezerra (2010) a cada 10°C reduzidos em
9 relação a temperatura corporal, o metabolismo da célula espermática é diminuído à
10 metade, assim, ao alcançar a temperatura de 5°C, o espermatozoide opera com cerca de
11 10% do seu metabolismo para sua sobrevivência.

12 Os danos causados aos espermatozoides pela criopreservação são irreversíveis e
13 conseqüentemente reduzem a fertilidade da célula quando comparado ao sêmen *in*
14 *natura* ou refrigerado (MORAES et al., 2015). Os efeitos da criopreservação e
15 descongelção diminui a integridade do acrossoma, viabilidade e motilidade
16 espermática. Alguns efeitos deletérios causados pela criopreservação podem ter como
17 origem o estresse osmótico. Neste caso quando o espermatozoide é submetido a
18 temperaturas abaixo de 0°C, há a formação de cristais de gelo extracelulares e também
19 um meio com maior osmolaridade independente do líquido remanescente em que as
20 células espermáticas estão expostas, aumentando a tensão osmótica nos
21 espermatozoides (GIBB; AITEKEN, 2016). Comumente o sêmen caprino é envasado
22 em palhetas e descongelado a 37°C por 30 segundos.

23 O tipo de fosfolípídeo em maior proporção na membrana pode também
24 influenciar na sensibilidade ao choque térmico causado pelo frio e que quanto mais
25 conteúdo de proteína a membrana tiver, menor a resistência ao choque térmico. Além da
26 mudança na fase de transição lipídica, as crioinjúrias na membrana podem se dar por
27 alterações de composição na membrana do espermatozoide (CHAKRABARTY et al.,
28 2007). A membrana do espermatozoide caprino possui alta concentração de
29 fosfolípídeos, destaca-se a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, e esfingomiélna, em
30 ácidos graxos poli-insaturados, dentre esses os mais encontrados são o oleico, linoleico,
31 araquidônico e docosahexaenoico, possui relação a um baixo nível de colesterol (RANA
32 et al., 1993).

33 Em uma pesquisa realizada por Chakrabarty et al. (2007), ao analisarem as
34 injúrias de membrana causadas pelo processo de criopreservação de espermatozoides

1 epididimários de caprinos, constataram diminuição no conteúdo de fosfatidilcolina,
2 fosfatidiletanolamina e de ácidos graxos poli-insaturados, e em, especial
3 docoshexaenoico, fato que pode estar associado à perda da função espermática. Diante
4 disso, esses autores recomendam a adição de fosfolipídeos ou fontes de fosfolipídeos
5 aos meios de criopreservação, concordando com estudos realizados por Holt (2000) e
6 Salamon e Maxwell (2000), de que a inclusão de lipídeos aos diluentes de sêmen
7 tenham capacidade de reduzir os danos causados pelo choque térmico.

8 A criopreservação altera a regulação de cálcio na célula espermática normal,
9 provocando aumento no nível de cálcio intracelular em relação ao sêmen fresco e,
10 impede a capacidade do espermatozoide controlar o influxo deste íon. Os danos
11 causados no sistema regulador de cálcio na criopreservação são capazes de predispor as
12 células, a uma falha na regulação da capacitação e da reação do acrossoma,
13 provavelmente colaborando com a redução da fertilização do sêmen criopreservado
14 (BAILEY; BUUHR, 1993).

15 A criopreservação espermática compreende várias respostas biofísicas, ainda não
16 completamente elucidadas, das células e dos tecidos. A taxa de sobrevivência
17 espermática ao resfriamento, congelação e aquecimento são dependentes das taxas de
18 resfriamento e aquecimento utilizadas, do tempo em que o espermatozoide se mantém
19 em cada etapa, do transporte de substâncias e da formação de cristais de gelo
20 (PICKETT; AMANN, 1987).

21 **6. TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO SEMINAL *IN VITRO***

22 A avaliação seminal *in vitro* é de grande importância para determinar a
23 eficiência reprodutiva de um macho reprodutor, pois complementa os dados obtidos na
24 realização do exame clínico. Esse auxílio tem importância determinante na avaliação
25 dos testículos, dos epidídimos e em todo sistema reprodutor, contribuindo no
26 diagnóstico de animais com subfertilidade ou infertilidade (BATISTA; GUERRA,
27 2010).

28 Comumente as avaliações laboratoriais com o intuito de estimar o potencial
29 fecundante de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%), vigor (1-5),
30 concentração espermática (milhões/mL), anormalidades espermáticas (%) e o teste de
31 termoresistencia (lento ou rápido) (SIQUEIRA et al., 2007). Segundo o manual para
32 exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA, 2013) em caprinos quando se
33 utiliza o método de coleta por vagina artificial é necessário ter as seguintes
34 características espermáticas: volume 0,5 – 1,5 mL, cor branca ou amarelo-marfim,

1 turnilhonamento ≥ 4 , motilidade 80%, vigor ≥ 3 , concentração $2 - 5 \times 10^9/\text{mL}$, número
2 total de espermatozoides/ejaculado $3-5 \times 10^9$ e espermatozoides morfológicamente
3 normais $\geq 80\%$. E quando for submetido a criopreservação é desejável os seguintes
4 parâmetros seminais por dose: motilidade $\geq 30\%$, vigor ≥ 2 , número de espermatozoides
5 por palheta (0,25 e 0,50 mL) 40×10^6 móveis e espermatozoides normais $\geq 80\%$ (CBRA,
6 2013).

7 Todavia, a forma mais eficaz de avaliação da preservação da capacidade de
8 fecundação do espermatozoide na dose seminal é a taxa de concepção após a
9 inseminação artificial (SIQUEIRA et al., 2009). Entretanto as técnicas que analisam a
10 funcionalidade de organelas espermáticas (acrossomas e mitocôndrias), ou ainda a
11 integridade de alguns componentes celulares (membranas, cromatina), tem sido
12 considerada nas últimas décadas (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004).

13 A análise da integridade da membrana espermática é um valoroso quando se
14 pretende obter sucesso da criopreservação, pois ela tem extrema sensibilidade ao choque
15 causado pelo frio (PENA et al., 2005). O teste hiposmótico (HOST), é utilizado como
16 teste complementar para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática, a célula
17 espermática é exposta a uma solução de baixa osmolaridade, o que resultará no influxo
18 de água, objetivando estabelecer o equilíbrio entre o meio intracelular e extracelular. E
19 esse influxo de água promove o aumento do volume da célula, a expansão da membrana
20 e o enrolamento ou dobramento de cauda do espermatozoide, que podem ser verificadas
21 com auxílio de microscopia de contraste de fase (OLIVEIRA et al., 2013).

22 Porém, a integridade de acrossoma não reflete necessariamente a integridade de
23 membrana, sendo necessário a utilização de testes que combinem ambas as avaliações
24 (HOLT, 2000). Dentre as técnicas para avaliação da membrana plasmática espermática
25 sobressaem as sondas fluorescentes permeáveis, identificando as membranas com
26 danos, a exemplo as que utilizam corantes diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e
27 iodeto de propídio (IP) (CELEGHINI, 2003).

28 O iodeto de propídio tem apresentado resultados satisfatórios por ser de fácil
29 utilização, preparo e aplicação da técnica, além de ter estabilidade e eficiência na
30 avaliação da integridade da membrana, seja de forma isolada ou em conjunto de outro
31 corante fluorescente para analisar a membrana plasmática (PETERSON et al., 2007).
32 Ainda segundo este autor, esta sonda tem atração pelo DNA e cora de vermelho o
33 núcleo de células apresentando membrana plasmática danificada. Neves et al. (2009)

1 constataram que a utilização do diacetato de carboxifluoresceína associado ao iodeto de
2 propídio para verificação demonstrou relação com a morfologia espermática.

3 Em suma, a avaliação do potencial de membrana mitocondrial é realizada com o
4 objetivo de verificar riscos de apoptose dos espermatozoides, pois a interrupção deste
5 parâmetro é considerada um sinal de estresse, ocasionado pelo aumento da concentração
6 de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MARCHESI; FENG, 2007). A sonda JC-1 é
7 utilizada para verificar a funcionalidade mitocondrial (ARRUDA et al., 2007), que tem
8 como advento a atuação nas mudanças de polarização da membrana mitocondrial
9 interna (SILVA; GADELHA, 2006). A fluorescência lançada altera do verde para o
10 laranja ou vermelho podendo variar conforme aumento do potencial de membrana
11 (REERS et al., 1991).

12 **7. COMPUTER-ASSISTED SPERM ANALYSIS (CASA)**

13 O CASA é um *hardware* e *software* que permite capturar e analisar
14 continuamente fotos das células espermáticas, que quando juntas formam um filme com
15 percurso da célula. Através desse sistema são obtidas informações mais precisas e
16 acuradas do movimento individual de cada espermatozoide (AMANN; KARTZ, 2004).
17 A criação do sistema CASA possibilitou adquirir informações concisas sobre as
18 características cinéticas das células espermáticas do ejaculado (AMANN; WABERSKI,
19 2014).

20 Vale ressaltar que o computador possui a programação de acordo com a espécie
21 animal, que é programado com uma micrometragem e outra máxima, os objetos com
22 tamanhos que contemplam esta faixa são tidos como espermatozoides. Fragmentos
23 visualizados com tamanho inferior ao tamanho mínimo são tidos como parte do fundo
24 (MORTIMER; MAXWELL, 1999)

25 Este tipo de análise realizada pelo CASA quantifica características específicas
26 inerentes ao movimento espermático, (GARNER, 1997), também pode determinar a
27 presença e a cinética das subpopulações das células espermáticas, a exemplo da
28 avaliação da integridade celular pelas sondas fluorescentes (QUINTERO MORENO et
29 al., 2003). Conforme Moses et al. (1994) o conjunto dos parâmetros concedem detalhes
30 que viabilizam acurácia na avaliação espermática.

31 **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

32 Apesar do consagrado sucesso das pesquisas na criopreservação de sêmen
33 caprino, aliado a outros componentes como meios diluentes e crioprotetores que
34 participam de forma significativa na manutenção da viabilidade espermática no pós-

1 descongelção, ainda são necessárias mais pesquisas visando otimizar esta biotécnica
2 reprodutiva.

3 **9. AGRADECIMENTOS**

4 Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo CNPq e CAPES - Brasil.

5 **10. DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES**

6 Os autores deste trabalho não possuem qualquer relação financeira ou pessoal
7 com outras pessoas ou organização que possam influenciar indevidamente o viés do
8 artigo de revisão intitulado “Avanços das biotécnicas reprodutivas na criopreservação
9 do sêmen caprino”.

10 **11. REFERÊNCIAS**

11 ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Effects of egg youlk during the freezing step of
12 cryopreservation on the viability of goat spermezoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-
13 1172, 2004. Available from: <10.1016/j.theriogenology.2004.01.013>. Accessed: Jan.
14 12, 2018.

15 AHMAD, M. Z. A. A. et al. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated
16 from egg youlk to improve buck sêmen freezing. **Reproduction in Domestic Animal**,
17 v. 43, p. 429-436, 2008. Available from: <10.1111/j.1439-0531.2007.00930.x>.
18 Accessed: dez. 14, 2017.

19 AISEN, E. G. et al. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in
20 different trehalose concetrations. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801–1808, 2002.
21 Available from: <https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2>. Accessed: Jan. 22,
22 2018.

23 AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of**
24 **Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1939-
25 4640.2004.tb02793.x>. Accessed: Jan. 16, 2018.

26 AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA):
27 capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p. 1:5-17, 2014.
28 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>. Accessed: 05
29 jan. 2018.

30 ANUALPEC 2012. **Anuário da Pecuária Brasileira. Informa Economics/FNP**, 2012.

31 AKHTER, S. et al. Soya-lecithin in extenders improves the freezability and fertility of
32 buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.
33 47, p. 815-819, 2012. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1439-
34 0531.2011.01973.x>. Accessed: Jan. 18, 2018.

1 ARRUDA, R. P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do
2 sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 8-16, 2007. Available
3 from: <[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB108%20Arruda%20](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB108%20Arruda%20pag%208-16.pdf)
4 [pag%208-16.pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB108%20Arruda%20pag%208-16.pdf)>. Accessed 27 mai. 2018.

5 BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do
6 sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 125-132, 2010.
7 Available from: <[https://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB219%20pag125-](https://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB219%20pag125-132.pdf)
8 [132.pdf](https://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB219%20pag125-132.pdf)>. Accessed: 10 fev. 2018.

9 BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Ca²⁺ Regulation by Cryopreserved Bull Spermatozoa in
10 Response to A23187. **Cryobiology**, v. 30, p. 470–481, 1993. Available from:
11 <<https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1048>>. Accessed: 13 dez. 2017.

12 BECKER-SILVA, S. C. **Limites de tolerância do espermatozoide caprino a soluções**
13 **hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em**
14 **diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de**
15 **crioprotetores permeantes**. 2004, 121f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina
16 Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

17 BEZERRA F. S. B. Inseminação artificial em caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.
18 4, S26-S29, 2010. Available from:
19 <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/1843/4638>>. Accessed: 15
20 mar. 2018.

21 BEZERRA, F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação.
22 **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 4, p. 20-25, 2010. Available from:
23 <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/1842/4636>>. Accessed: 07
24 abr. 2018.

25 BITTENCOURT, A. L. R. et al., Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da
26 lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Brazilian**
27 **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 305-312, 2008.
28 Available from: <<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2008.26690>>.
29 Accessed: 11 abr. 2018.

30 CASAS, I. et al. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm
31 parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, v. 72, p. 930-948, 2009. Available
32 from: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.001>>. Accessed: 19 dez. 2018.

33 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico**.
34 2013.

1 CHACUR, M. G. M. et al. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado
2 bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 346-355, 2012. Available from:
3 <<http://hdl.handle.net/11449/141256>>. Accessed: 12 fev. 2018.

4 CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as**
5 **membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos**
6 **espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005, 186f. Doutorado em
7 Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo.

8 CHAKRABARTY, J. et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell
9 membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 54, p. 27-35, 2007. Available
10 from: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.10.191>> Accessed. 15 jan. 2018.

11 CORCUERA, B. et al. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical
12 ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa.
13 **Theriogenology**, v. 67, p. 1150-7, 2007. Available
14 from:<<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.002>>. Accessed: 12 dez. 2017.

15 CORREIA, R. C. et al. **Importância social e econômica da caprinovinocultura no**
16 **vale do Rio Gavião – BA: elementos para tomada de decisão**. - Petrolina: PE, 2000.
17 Available from:
18 <http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB428.pdf>. Accessed:
19 20 jan. 2018.

20 CRESPILO, A. M. et al. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration:
21 Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state.
22 **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 126-133, 2014. Available from:
23 <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.020>>. Accessed: 04 fev. 2018.

24 DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using
25 acetamide in combination with threulose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48,
26 p. 831-841, 1997. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00305-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00305-1)>.
27 Accessed: 08 mar. 2018.

28 DALMAZZO, A. **Utilização da lecitina de soja para refrigeração e criopreservação**
29 **do sêmen de cães**. 2012, 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de
30 São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de
31 Reprodução Animal. São Paulo.

32 DEL VALLE, I. et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-
33 thawed ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 717-725, 2012. Available
34 from: <<https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014944>>. Accessed: 28 mar. 2018.

1 DEL VALLE, I. et al. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented
2 with casein and vegetable oils. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 213-219,
3 2013. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.022>>. Accessed: 23
4 jun. 2018.

5 ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and
6 cooledrewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 165-171, 1996. Available from:
7 <[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00151-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00151-3)>. Accessed: 12 jan. 2018.

8 EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salomon's artificial insemination of sheep and**
9 **goats, butter worths**, Wellington, New Zeland, 1987.

10 FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2016. Disponível
11 em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 19/03/2018.

12 FOROUZANFAR, M. et al. *In vitro* comparison of egg-yolk based and soybean
13 lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, p.
14 480-487, 2010. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>>.
15 Accessed: 20 dez. 2017.

16 GARNER, D. L. Ancillary tests of bull sêmen quality. **Veterinary Clinico of North**
17 **America. Food Animal Praticce**. v. 13, p. 313-321, 1997. Available from:
18 <[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30344-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30344-3)>. Accessed: 09 mar. 2018.

19 GIBB, Z.; AITEKEN, R. J. The impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage:
20 The Stallion as a Model. **BioMed Reserch International**, p. 1-8, 2016. Available from:
21 <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/9380609>>. Accessed: 12 jun. 2018.

22 GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M. et al. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell
23 and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, p. 1157-1170,
24 2003. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01178-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01178-0)>. Accessed: 02
25 fev. 2018.

26 GONÇALVES, P. B. D. et al. **Biotécnica aplicada à reprodução animal**. São Paulo:
27 Varela, 2001, 15-23; 57-65; 111-23 p.

28 GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of**
29 **North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1995. Available from:
30 <[https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30300-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30300-0)>. Accessed: 03 jun. 2018.

31 GRANADOS, L. B. C. et al. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos, 1ª**
32 **edição**. 2006. 11 p.

1 HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª edição. Barueri-SP, editora:
2 Manole, 2004.

3 HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species
4 and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000. Available from:
5 <[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)>. Accessed: 16 jul. 2018.

6 JIMÉNEZ-RABADÁN, P. et al. Improved cryopreservation protocol for Blanca-
7 Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. **Cryobiology**, v. 67, p. 251–257,
8 2013. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.08.002>>. Accessed: 15
9 mai. 2018.

10 LEBOEUF B. et al. Production and storage of goat semen for artificial insemination.
11 **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000. Available from:
12 <[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00156-1)>. Accessed: 01 fev. 2018.

13 MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil:
14 estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19 (1-2), p. 61-72, 1995.
15 Available from: <[https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41797/1/AAC-](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41797/1/AAC-Inseminacao-artificial.pdf)
16 [Inseminacao-artificial.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41797/1/AAC-Inseminacao-artificial.pdf)>. Accessed: 16 dez. 2018.

17 MAIA, M. S. et al. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na 28
18 viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**.
19 Botucatu, v. 15, p. 521-530, 2008. Available
20 from:<<http://www.tkreproducao.com.br/enviados/2009122112930.pdf>>. Accessed: 07
21 jan. 2018.

22 MARCHESI D. M.; FENG, H. L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of**
23 **Andrology**. v. 28, p. 481–489, 2007. Available from:
24 <<https://doi.org/10.2164/jandrol.106.002105>>. Accessed: 11 mai. 2018.

25 MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain
26 JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram
27 semen. **Animal Reproduction Science**, 84:121-133, 2004. Available from:
28 <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.006>>. Accessed: 04 jul. 2018.

29 MORAES, E A. et al. Cholestanol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion
30 espermatozoa after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 158, p. 19-24,
31 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.004>>. Accessed: 21
32 mai. 2018.

1 MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. M. C. Kinematic definition of ram sperm
2 hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, p. 25-30, 1999.
3 Available from: <<https://doi.org/10.1071/RD99019>>. Accessed 01 set. 2018.

4 MOSES, D. F. et al. Use of computerized motility analyser for the evaluation of frozen-
5 thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v. 27, p. 25-29, 1994. Available from:
6 <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1995.tb02091.x>>. Accessed: 06 jun. 2018.

7 NEVES, M. M. et al. Padronização de uma técnica de congelamento de sêmen em cães.
8 **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37 (3), p. 259-263. Available from:
9 <<https://doi.org/10.22456/1679-9216.16343>>. Accessed: 28 mai. 2018.

10 NUNES, J. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoides
11 de bouc. 1982. **These de Doctorat**, Université Pierre et Marie Curie. Paris.

12 OLIVEIRA, G. C. et al. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista**
13 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p. 23-28, 2013. Available from:
14 <[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n1/p23-28%20\(RB300\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n1/p23-28%20(RB300).pdf)>.
15 Accessed: 13 mar. 2018.

16 OLIVEIRA, R.V. et al. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à
17 base de água de coco em pó (ACP-101[®]) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
18 **Veterinária e Zootecnia**. v. 6, p. 1295-1302, 2011. Available from:
19 <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v63n6/03.pdf>>. Accessed: 14 jun. 2018.

20 PAPA, F. O. et al. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of
21 stallion semen. **Animal Reproduction Science**, 129:73-77. Available from:
22 <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.006>>. Accessed: 24 ago. 2018.

23 PARKS, J. E; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation on sperm membranes.
24 **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992. Available from: <[https://doi.org/10.1016/0093-](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)
25 [691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)>. Accessed: 19 jan. 2018.

26 PEÑA, F. J. et al. new and simple method to evaluate early membrane changes in
27 frozen–thawed boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*. v. 28, p. 107-114,
28 2005. Available from:<<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00512.x>>. Accessed: 27
29 mai. 2018.

30 PETERSON, K. et al. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch
31 Albucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility.
32 **Theriogenology**, v. 67, p. 863-871, 2007. Available from:
33 <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.003>>. Accessed: 01 ago. 2018.

1 PICKETT B. W.; AMANN, R. P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a
2 review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 289-302, 1987. Available from:
3 <[https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80049-7](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80049-7)>. Accessed: 25 jan. 2018.

4 PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**,
5 v. 63, p. 215-225, 2006. Available from:
6 <<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>>. Accessed: 14 jun. 2018. doi:
7 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>.

8 QUINTERO-MORENO, A. et al. Identification of sperm subpopulations with specific
9 motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v.59, p. 1973-1990,
10 2003. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01297-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01297-9)>. Accessed: 22
11 fev. 2018.

12 ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat.
13 **Nature**, v. 179, p. 318-319, 1957. Available from: <10.1038/179318b0>. 11 jan. 2018.

14 RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-
15 traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.
16 Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>>. Accessed: 25 mai.
17 2018.

18 SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction**
19 **Science**, v. 62, p. 77-111, 2000. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)>. Accessed: 08 jun. 2018.

21 SALLES, M. G. F. **Água de coco (*Cocos nucifera*) in natura e sob a forma de gel e**
22 **estabilizada como diluidor de sêmen caprino**. 1989, 176f. Porto Alegre, RS,
23 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências
24 Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

25 SALMANI, H. et al. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents
26 for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology**, v. 68, p. 276-280, 2014. Available
27 from: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008>>. Accessed: 12 jun. 2018.

28 SANTOS, B. M. B. Criopreservação de sêmen caprino e ovino em diluente de origem
29 vegetal à base de água de coco em pó sem adição de gema de ovo. **Dissertação**
30 **(Mestrado em Ciências Veterinárias)**, Faculdade de Veterinária da Universidade
31 Estadual do Ceará, Ceará, p. 66, 2013.

32 SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells.
33 **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006. Available from:
34 <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>>. Accessed: 15 fev. 2018.

1 SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células
2 espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de**
3 **Reprodução Animal**, v. 35, p. 370-384, 2011. Available from:
4 <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n4/pag370-384.pdf>>. Accessed: 18
5 jan. 2018.

6 SIQUEIRA, J. B. et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e
7 testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 387-
8 395, 2007. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007000200016>>.
9 Accessed: 21 fev. 2018.

10 SIQUEIRA, A. P. et al. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino
11 resfriado a 5° C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. **Arquivo**
12 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, p. 66-71, 2009. Available from:
13 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000100010>>. Accessed: 27 fev. 2018.

14 TEIXEIRA, I. A. M. et al. Inovações tecnológicas na caprinocultura. **Revista Brasileira**
15 **de Saúde e Produção Animal**. v. 14, p. 104-120, 2013. Available from:
16 <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402013000100012>>. Accessed: 10 jul. 2018.

17 TRALDI, A. S. Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – Manual técnico. Texto
18 apostilado, 1994.

19 VALENTE, S. S. et al. *In vitro* and *in vivo* fertility of ram sêmen cryopreserved in
20 different extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 74-77, 2010. Available
21 from: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.007>>. Accessed: 16 dez. 2018.

22 VIDAL, A. H. et al. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat semen
23 cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 47-51, 2013. Available from:
24 <<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022>>. Accessed: 09 jul. 2018.

25 WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
26 **Reproduction Science**, 60-61:481-492, 2000. Available from:
27 <[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)>. Accessed: 07 mai. 2018.

28 YÁNIZ, J. L. et al. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently
29 than TRIS during storage at 15°C. **Small Ruminant Research**, 95:54-60, 2011. Available
30 from: <<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.08.006>>. Accessed: 14 fev. 2018.

31 YESTE, M. et al. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of
32 nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**, v.
33 79, p. 929-939, 2013. Available from: <[10.1016/j.theriogenology.2013.01.008](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.008)>.
34 Accessed: 11 abr. 2018.

1 YESTE, M. et al. E. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm
2 cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. **Cryobiology**, v. 68, p.
3 251–261, 2014b. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.004>>.
4 Accessed: 04 mai. 2018.

5 YESTE, M. et al. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production
6 and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus.
7 **Andrology**, v. 2, p. 1-13, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.1111/andr.291>>.
8 Accessed: 16 abr. 2017.

9 YOSHIDA, M. Conservation of sperms: *current status* and new trends. **Animal**
10 **Reproduction Science**. 60-61:349-355, 2000. Available from:
11 <[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00125-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00125-1)>. Accessed: 13 mai. 2018.

12 ZHANG, S. S. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa
13 quality. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, p. 6476-6480, 2009. Available from:
14 <<http://dx.doi.org/10.5897/AJB09.1070>>. Accessed: 18 fev. 2018.

CAPÍTULO 2 – Uso da Polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* como suplemento ao diluente de congelação do sêmen caprino

Elaborada de acordo com as normas da Revista *Small Ruminant Research*
(elsevier.com/journals/small-ruminant-research/0921-4488/guide-for-authors)

1 **Uso da Polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* como suplemento ao**
2 **diluyente de congelação do sêmen caprino**

3 H. B. Rocha^a; N. R. O. Paula^{b*}

4 ^aPrograma de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Bairro
5 Planalto Horizonte s/n, Bom Jesus-PI, CEP: 64900-000, Brasil

6 ^bDepartamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Bairro
7 Ininga s/n, Teresina – PI, CEP: 64049-550, Brasil

8 Autor para correspondência. E-mail: neyromulo@ufpi.edu.br*

9 **RESUMO**

10 Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade *in vitro* do sêmen caprino
11 descongelado utilizando diluyente suplementado com a polpa desidratada do fruto de
12 *Mauritia flexuosa*. Foram utilizados três machos caprinos (dois das raças Parda Alpina e
13 um da raça Gurgueia) com idade média de 6 anos. As coletas de sêmen foram pelo
14 método da vagina artificial apropriada para pequenos ruminantes e uma fêmea como
15 manequim. O experimento foi dividido em duas etapas, na primeira foram utilizados 15
16 *pools* sendo fracionado em 13 tratamentos com diferentes concentrações do extrato
17 bruto (0,25%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1,0%; 2,0%; 3,0%; 4,0%; 5,0%; 10%)
18 diluídos em TRIS, como grupo controle foi utilizado TRIS isento do extrato. O *pool* foi
19 diluído e avaliado os parâmetros espermáticos (motilidade, vigor e morfologia) sob
20 TTR lento (T05 - T120 minutos). As melhores concentrações do extrato bruto (0,25%;
21 0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1,0%) obtidas na primeira foram utilizadas na segunda
22 para criopreservação. Nesta etapa foram utilizados 15 *pools* e formou-se dois grupos de
23 tratamento, sendo um diluyente constituído TRIS + 7% Glicerol + Melhores
24 concentrações do extrato bruto e outro pelo diluyente TRIS + 2,5% gema + Glicerol 7%
25 + Melhores concentrações do extrato bruto. O sêmen foi criopreservado em sistema
26 automatizado (TK 3000[®]). Após a descongelação das amostras foi realizada a avaliação
27 da cinética espermática pelo CASA, morfologia espermática pelo método de panótico
28 rápido e análise estrutural dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. A
29 análise estatística dos dados foi realizada pelo PROC GLM do *software* SAS[®] e quando
30 verificada significância (p<0,05) procedeu-se o teste de Tukey. Na primeira etapa os
31 grupos contendo baixa quantidade do extrato não diferiram do grupo controle (p>0,05).
32 Já na segunda etapa, após descongelação os grupos TRIS contendo 2,5% gema ou 0%
33 gema, foi observado diferença estatística entre os grupos testados nos parâmetros de
34 VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, WOB (p<0,05), sendo que o grupo
35 TRISGLGEMF06 foi significativamente superior ao grupo controle nos parâmetros de
36 VCL, VAP e ALH. Em conclusão, A polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa*
37 nas concentrações de 0,25% à 1% em solução tampão TRIS adicionados ao *pool* de
38 sêmen caprino permitiu uma boa manutenção da viabilidade dos espermatozoides após
39 o processo de criopreservação/dcongelação. A polpa desidratada do fruto de *Mauritia*
40 *flexuosa* nas concentrações 0,25% à 1% adicionado no diluyente TRIS contendo 2,5% de
41 gema de ovo atuou de forma benéfica nos parâmetros espermáticos do sêmen caprino
42 após a criopreservação/dcongelação, podendo ser uma alternativa viável para
43 aplicação a campo em tecnologias reprodutivas como a inseminação artificial.

44 **Palavras-chaves:** Caprinos; Criopreservação seminal; *Mauritia flexuosa*

46 1. INTRODUÇÃO

47 O sêmen dos animais domésticos em sua maioria possui quantidade de
48 espermatozoides além do necessário para a fecundação. Desse modo, a diluição seminal
49 pode auxiliar no aproveitamento de um ejaculado para utilização em um maior número
50 de fêmeas (Bicudo et al., 2003) e este processo associado a biotécnica reprodutiva de
51 criopreservação espermática possibilita o armazenamento dos espermatozoides por
52 longos períodos (Silva; Guerra, 2011), também permite diminuir riscos e custos com
53 aquisição e transporte de reprodutores, ainda possibilita acelerada difusão de material
54 genético entre locais distantes (Castelo et al., 2008).

55 No entanto, a capacidade de sobrevivência das células espermáticas ao longo do
56 processo de criopreservação pode variar entre reprodutores da mesma espécie e também
57 de diferentes espécies. Geralmente os espermatozoides de pequenos ruminantes são
58 mais frágeis ao processo de criopreservação em comparação a espécie bovina (Küçük,
59 2014). Diante disso, é imprescindível a utilização de um diluente capaz de proteger e
60 conservar a integridade e a função do espermatozoide durante as mudanças de
61 temperatura e osmolaridade no processo de criopreservação. Nas últimas décadas, foram
62 realizados vários estudos objetivando desenvolver um meio diluente seminal adequado
63 para diversas espécies de animais, sendo os a base de gema de ovo o mais utilizado
64 (Dell Valle et al., 2012).

65 Diversas pesquisas relatam que a diluição do sêmen caprino em diluente a base
66 de gema de ovo pode induzir danos aos espermatozoides. Além disso, por ser um
67 diluente de origem animal, a gema de ovo apresenta outras desvantagens como à falta
68 de padronização e risco de contaminação (Papa et al., 2011) o que resulta em embargo
69 no comercial por outros países pela possibilidade de introdução de doenças. Sendo
70 assim, torna-se necessário a utilização de diluentes alternativos que possam substituir os
71 de origem animal. Vários estudos estão sendo realizados utilizando diluentes compostos
72 de origem vegetal, apresentando resultados satisfatórios na conservação espermática de
73 caprinos utilizando a lecitina de soja (Salmani et al., 2014) e em ovinos utilizando a
74 água de côco em pó (ACP-102c[®]) (Cavalcante et al., 2014).

75 No entanto, mesmo com resultados favoráveis alcançados utilizando meios de
76 origem vegetal na conservação do sêmen de pequenos ruminantes, ainda há necessidade
77 mais estudos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade *in*
78 *vitro* do sêmen caprino descongelado suplementado com a polpa desidratada do fruto de
79 *Mauritia flexuosa*.

80 **2. METODOLOGIA**

81 **2.1 Locais experimentais**

82 O presente estudo foi realizado em conformidade com o projeto aprovado pela
83 Comissão de Ética para uso de animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI) com o
84 número de protocolo 484/18. O experimento foi realizado em dois locais, sendo a
85 primeira etapa no setor de Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí,
86 *Campus* Petrônio Portela, cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil, situado às
87 coordenadas geográficas 5° 03' 23.1'' de Latitude Sul e 42° 47' 27.9'' de Longitude
88 Oeste, com altitude média de 72,7 metros com precipitação média anual em torno de
89 1.349 mm. A região apresenta temperatura anual em torno dos 27,6 °C e clima tropical,
90 segundo a classificação de Köppen-Geiger (1928). As análises seminais pelo sistema
91 CASA da segunda etapa foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do Sêmen
92 Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB)
93 localizado na cidade de Fortaleza, Estado do Ceará, Brasil.

94 **2.1 Animais Experimentais**

95 Foram utilizados três machos caprinos (*Capra aegagrus hircus*) (dois das raças
96 Parda Alpina e um da raça Gurgueia) com idade média de 6 anos, clinicamente
97 saudáveis e com escore de condição corporal 3,5 numa escala de 0 - 5, foi realizado
98 exame andrológico e todos apresentaram-se aptos à reprodução, conforme estabelecido
99 pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

100 Os animais foram mantidos em confinamento com área de acesso a iluminação
101 natural e área coberta. Mantidos isolados das fêmeas alimentados diariamente com
102 volumoso capim elefante (*Penisetum purpureum*) picado, concentrado (Ração Nativa[®],
103 300g/animal/dia) fornecidos duas vezes ao dia, água e sal mineral específico para
104 caprinos *ad libitum*.

105 **2.3 Processamento do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa***

106 A raspa foi triturada com auxílio de um liquidificador previamente higienizado e
107 em seguida peneirada para obtenção do extrato bruto, este foi armazenado em tubos do
108 tipo *falcon* de 50 mL estéreis. Para obtenção do diluente a raspa foi pesada em balança
109 analítica (Analyser[®]) nas concentrações desejadas e logo após adicionadas em meio
110 diluente TRIS (primeira etapa) e em TRIS contendo 2,5% gema de ovo e 0% gema
111 (segunda etapa).

112 2.4 Coleta e análises seminais

113 Foram realizadas coletas de 30 ejaculados de cada reprodutor caprino
114 (totalizando 90 ejaculados), utilizando vagina artificial apropriada para pequenos
115 ruminantes previamente aquecida a 39 °C na presença de uma cabra como manequim
116 (Salviano; Souza, 2008). As coletas de sêmen foram realizadas três vezes por semana e,
117 o experimento foi dividido em duas etapas. Após cada coleta, o ejaculado foi
118 transportado ao laboratório e mantido em banho-maria à temperatura de 37 °C.

119 Imediatamente avaliou-se quanto a alterações macroscópicas e os parâmetros
120 espermáticos retirando-se uma alíquota de 20 µL de sêmen para avaliação do
121 turbilhonamento (0 a 5), e sobre lâmina e lamínula aquecidas a 37 °C para avaliação
122 motilidade progressiva (0 a 100%), vigor de 0 (imóvel) a 5 (movimento progressivo
123 rápido) em microscopia de luz com aumento de 100x a 400x. A morfologia espermática
124 foi avaliada utilizando o corante Panótico rápido® (Hidalgo et al., 2006). Preparou-se o
125 esfregaço para avaliação do percentual de espermatozoides morfologicamente normais e
126 anormais, foram avaliadas 200 células por amostra em microscopia de luz com aumento
127 de 100x a 400x. Foram utilizados apenas os ejaculados que atendiam as exigências do
128 CBRA (CBRA, 2013).

129 Após a realização das análises individuais dos parâmetros espermáticos, foi
130 realizado um *pool* dos ejaculados nas duas fases do experimento objetivando anular
131 uma possível variação individual. Cada *pool* foi centrifugado a 700 g, por 10 minutos e
132 em seguida removido o plasma seminal e substituído por igual volume de solução de
133 lavagem TRIS (3,786g TRIS; 1g frutose; 2,11g ácido cítrico + 100 mL de água
134 destilada), conforme SOARES et al., 2011 adaptado. Posteriormente, fez-se a avaliação
135 dos parâmetros espermáticos (CBRA, 2013).

136 2.5 Etapa 1

137 Nesta etapa utilizou-se 15 *pools* que foram divididos em treze alíquotas iguais
138 em tubos do tipo *falcon* (15 mL) e diluído em meio diluente TRIS. Foram definidos os
139 seguintes tratamentos experimentais:

140 **Quadro 1.** Grupo controle e tratamentos à base da polpa desidratada do fruto de
141 *Mauritia flexuosa*.

Grupo controle	Tratamentos (TRIS + % <i>Mauritia flexuosa</i>)
TRIS	0,25% (TRISMF025); 0,5% (TRISMF05); 0,6% (TRISMF06); 0,7% (TRISMF07); 0,8% (TRISMF08); 0,9% (TRISMF09); 1% (TRISMF1); 2% (TRISMF2); 3% (TRISMF3); 4% (TRISMF4); 5% (TRISMF5); 10% (TRISMF10)

142 A concentração final utilizada foi determinada pela contagem em câmara de
 143 *Neubauer* (100×10^6 spz/mL), e alocados em banho maria a 37 °C. Após a distribuição
 144 dos tratamentos foram avaliados os parâmetros espermáticos sob teste de
 145 termorresistência nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação, com
 146 auxílio de um microscópio óptico (400x), lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37
 147 °C. Nesta fase a morfologia foi avaliada utilizando o corante Panótico rápido® e
 148 avaliados o percentual de espermatozoides normais (Hidalgo et al., 2006).

149 **2.6 Etapa 2**

150 As melhores concentrações de *Mauritia flexuosa* encontradas na primeira fase
 151 foram utilizadas nesta fase: TRISMF025; TRISMF05; TRISMF06; TRISMF07;
 152 TRISMF08; TRISMF09; TRISMF1. Para isso foram utilizados 15 *pools* de sêmen.
 153 Definiu-se os seguintes tratamentos experimentais:

154 **Quadro 2.** Grupo controle e tratamentos à base da polpa desidratada do fruto de
 155 *Mauritia flexuosa* adicionado 7% de glicerol.

Grupo controle	Tratamentos (TRISMF% + 7% glicerol)
TRIS + 7% glicerol + gema 2,5% (TRIS- GEMA)	TRISMF025 = TRISGLMF025; TRISMF05 = TRISGLMF05; TRISMF06 = TRISGLMF06; TRISMF07 = TRISGLMF07; TRISMF08 = TRISGLMF05; TRISMF09 = TRISGLMF09; TRISMF1 = TRISGLMF1

156

157 **Quadro 3.** Grupo controle e tratamentos à base de Tris-gema 2,5% contendo diferentes
 158 concentrações da polpa desidratada de *Mauritia flexuosa*.

Grupo controle	Tratamentos (TRISMF% + 7% glicerol + gema 2,5%)
TRIS + 7% glicerol + gema 2,5% (TRIS- GEMA)	TRISMF025 = TRISGLGEMF025; TRISMF05 = TRISGLGEMF05; TRISMF06 = TRISGLGEMF06; TRISMF07 = TRISGLGEMF07; TRISMF08 = TRISGLGEMF05; TRISMF09 = TRISGLGEMF09; TRISMF1 = TRISGLGEMF1

159 **2.7 Criopreservação seminal**

160 Na segunda etapa as amostras foram envasadas em palhetas de polietileno de
 161 0,25 mL e logo após submetidas a criopreservação com auxílio do aparelho de
 162 congelação automatizado TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba,
 163 Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante, com curva de resfriamento de 0,25
 164 °C/min, duração em torno de 1 hora e 20 minutos, permanecendo a 5°C por mais 2
 165 horas. Com curva de criopreservação de -20°C/min até alcançar -120°C,

166 posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e
167 armazenadas em botijões criogênicos.

168 **2.8 Análises do sêmen pós-descongelamento**

169 Após o período mínimo de sete dias as amostras foram descongeladas em banho-
170 maria a 37°C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos tipo *ependorf* e
171 homogeneizadas para a análise imediata de motilidade e vigor (Cabrera et al., 2013).

172 A motilidade espermática foi avaliada em Sistema de Análise de Sêmen
173 Auxiliado por Computador (CASA), com uso do programa Sperm Class Analyzer®
174 (2013) SCA®, Microptic S. L., Barcelona, Espanha) que processa imagens obtidas em
175 microscópio de contraste de fase acoplado a uma câmara digital. Foram utilizadas as
176 seguintes variáveis do programa: 25 quadros/s, sendo 25 quadros/campo; velocidade
177 limite para espermatozoides lentos de 30µm/s; limite para velocidade média de 60 µm/s;
178 retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos de 80%. Para a avaliação,
179 diluiu-se o sêmen descongelado no diluente (TRIS) a 37 °C, até a concentração de 40 x
180 10⁶ spz/ml uma alíquota de 10 µL desta diluição foi colocada em câmara de Makler
181 (Sefi Medical Instruments Ltda., Haifa, Israel), pré-aquecida a 37 °C, para avaliação dos
182 seguintes parâmetros: percentual de espermatozoides móveis, velocidade curvilinear
183 (VCL - µm/s), velocidade linear (VSL - µm/s), e velocidade média do percurso (VAP -
184 µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral de cabeça
185 (ALH - µm/s), frequência de batimento cruzado (BCF – Hz) e Índice de oscilação
186 (WOB - %).

187 **2.9 Análise da morfologia espermática após descongelamento**

188 A análise dos defeitos espermáticos maiores e menores foram realizados
189 utilizando o corante panótico rápido® segundo o método de Hidalgo et al. (2006)
190 adaptado, onde 10 µL de sêmen de cada amostra foi depositado em uma lâmina
191 previamente identificada e realizado o esfregaço sendo e logo após submergiu-se as
192 lâminas nas soluções 1 (fixador), 2 (corante) e 3 (corante) (Renylab®) mantendo-se em
193 movimento contínuo de cima para baixo durante 5 segundos e deixou-se escorrer na
194 posição vertical. A avaliação morfológica foi realizada com auxílio de um microscópio
195 óptico com aumento de 1000x, sendo contadas 200 células (CBRA, 2013).

196 **2.10 Análise da integridade da membrana e potencial mitocondrial**

197 Imediatamente após a descongelamento, cada amostra foi acondicionada em
198 microtubos em banho maria a 37°C. A integridade da membrana plasmática foi avaliada
199 com o uso de sondas fluorescentes, conforme descrito por Harrison e Vickers (1990),

200 alíquotas de 50 µL de sêmen, descongeladas a 37° C por 30 segundos e acondicionados
201 em microtubos, foram diluídas em 150 µL de TRIS (3,786g de Tris hidroximetil
202 aminometano; 2,0g de ácido cítrico; 1,0g de frutose; 100 mL de água destilada)
203 contendo 5 µL de Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis,
204 MO, USA) (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de Iodeto de Propídio (IP; Sigma-
205 Aldrich®, St. Louis, MO, USA) (0,5 mg/mL em PBS), e incubadas por 10 minutos a
206 37°C para posterior avaliação. A análise se deu pela contagem de 100 espermatozoides
207 em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) em
208 aumento de 1000 vezes, sob óleo de imersão usando filtro de emissão DBP 580- 630nm
209 e excitação DBP 485/20nm. As células que apresentaram fluorescência verde foram
210 consideradas íntegras, enquanto aquelas apresentando fluorescência vermelha foram
211 consideradas danificadas.

212 A atividade mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
213 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie; Welch, 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de
214 sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de TRIS contendo 5µL de JC-1
215 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200
216 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical
217 Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se
218 filtro de emissão LP 515nm e BP 450 - 490nm para excitação. As células coradas em
219 laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto
220 aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

221 **3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

222 Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram obtidas as
223 médias e desvio-padrão e procedida à análise de variância (ANOVA) dos parâmetros
224 espermáticos avaliados (motilidade, vigor e morfologia) e a cinética espermática
225 (CASA). Para a comparação das médias foi realizado o teste de Tukey, de acordo com o
226 coeficiente de variação obtido, considerando um nível de significância de 5%. Foi
227 utilizado o PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis
228 System) for Windows versão 9.0.

229 **4. RESULTADOS**

230 *Viabilidade in vitro do sêmen caprino em meio diluente de origem vegetal pelo teste de*
231 *termorresistência*

232 Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros de viabilidade espermática
233 após a diluição e submetidos ao teste de termorresistência (120 minutos) estão

234 sumariados nas tabelas 1 e 2. Verificou-se que os grupos TRISMF025, TRISMF05,
235 TRISMF06, TRISMF07, TRISMF08, TRISMF09, TRISMF1 apresentaram resultados
236 semelhantes ao grupo controle para motilidade e vigor em todos os tempos de avaliação
237 (Tabela 1).

238 Os grupos TRISMF025, TRISMF05, TRISMF06, TRISMF07, TRISMF08,
239 TRISMF09, TRISMF1 apresentaram resultados promissores sobre os parâmetros
240 espermáticos estudados ao final do TTR, sendo semelhante ao grupo controle TRIS e
241 superior aos grupos TRISMF2, TRISMF3, TRISMF4, TRISMF5 e TRISMF10 (Tabela
242 1).

243

244 **Tabela 1.** Média (\pm d. p.) dos parâmetros motilidade (%) e do vigor (0-5) *pool* do sêmen caprino submetido ao teste de termorresistência (TTR)

245 lento, pós-diluição em TRIS contendo ou não diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa*.

Tratamentos	TTR (minutos)											
	05 min.		10 min.		15 min.		30 min.		60 min.		120 min.	
	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.
TRIS	78,66 \pm 9,15 ^{Aa}	4,53 \pm 0,51 ^{Aa}	73,66 \pm 9,90 ^{Aa}	3,53 \pm 0,74 ^{Aa}	61,66 \pm 11,75 ^{Aa}	3,46 \pm 0,91 ^{Aa}	52,33 \pm 8,63 ^{Ab}	3,20 \pm 0,86 ^{Ab}	49,00 \pm 18,63 ^{Ab}	2,60 \pm 0,98 ^{Ab}	29,66 \pm 15,97 ^{Ab}	2,06 \pm 0,96 ^{Ab}
TRISMF025	76,33 \pm 9,15 ^{Aa}	4,13 \pm 0,833 ^{Aa}	70,66 \pm 6,77 ^{Aa}	3,93 \pm 0,70 ^{Aa}	67,00 \pm 9,59 ^{Aa}	3,60 \pm 0,63 ^{Aa}	58,33 \pm 7,94 ^{Ab}	3,26 \pm 0,45 ^{Aa}	46,66 \pm 9,38 ^{Ab}	2,46 \pm 0,516 ^{Ab}	29,00 \pm 7,60 ^{Ac}	2,00 \pm 0,53 ^{Ab}
TRISMF05	75,00 \pm 13,22 ^A	4,13 \pm 0,74 ^{Aa}	72,33 \pm 11,62 ^{Aa}	3,73 \pm 0,59 ^{Aa}	70,00 \pm 12,53 ^{Aa}	3,73 \pm 0,70 ^{Aa}	58,33 \pm 11,90 ^{Aa}	3,20 \pm 0,41 ^{Aa}	50,00 \pm 13,09 ^{Aa}	2,73 \pm 0,45 ^{Ab}	40,33 \pm 16,08 ^{Ab}	2,46 \pm 0,51 ^{Ab}
TRISMF06	77,33 \pm 10,66 ^A	4,00 \pm 0,84 ^{Aa}	74,66 \pm 6,93 ^{Aa}	3,86 \pm 0,83 ^{Aa}	69,33 \pm 9,61 ^{Aa}	3,40 \pm 0,50 ^{Aa}	61,00 \pm 11,68 ^{Aa}	2,73 \pm 0,45 ^{Ab}	48,66 \pm 4,32 ^{Ab}	2,26 \pm 0,45 ^{Ab}	31,00 \pm 11,52 ^{Ab}	2,00 \pm 0,84 ^{Ab}
TRISMF07	79,00 \pm 10,2 ^A	4,06 \pm 0,79 ^{Aa}	75,33 \pm 8,95 ^{Aa}	3,60 \pm 0,82 ^{Aab}	68,66 \pm 9,15 ^{Aa}	3,06 \pm 1,03 ^{Aab}	64,33 \pm 8,63 ^{Aa}	3,13 \pm 0,63 ^{Aab}	54,33 \pm 10,99 ^{Aa}	2,53 \pm 0,83 ^{Ab}	39,00 \pm 10,72 ^{Ab}	2,26 \pm 0,79 ^{Ab}
TRISMF08	84,00 \pm 7,60 ^A	4,13 \pm 0,83 ^{Aa}	80,00 \pm 8,23 ^{Aa}	3,86 \pm 0,74 ^{Aa}	73,00 \pm 6,76 ^{Aa}	3,73 \pm 0,59 ^{Aa}	67,33 \pm 8,20 ^{Aa}	3,20 \pm 0,41 ^{Aa}	49,33 \pm 7,03 ^{Ab}	2,33 \pm 0,48 ^{Ab}	28,66 \pm 14,32 ^{Ac}	1,80 \pm 0,41 ^{Bb}
TRISMF09	77,00 \pm 11,14 ^{Aa}	4,13 \pm 0,83 ^{Az}	75,66 \pm 8,20 ^{Aa}	4,06 \pm 0,88 ^{Az}	67,00 \pm 11,14 ^{Aa}	3,60 \pm 0,73 ^{Az}	60,00 \pm 14,63 ^{Aa}	3,40 \pm 0,63 ^{Az}	42,00 \pm 20,94 ^{Ab}	2,86 \pm 0,83 ^{Aab}	27,33 \pm 17,59 ^{Ab}	1,86 \pm 0,91 ^{Bb}
TRISMF1	82,66 \pm 7,76 ^{Aa}	4,266 \pm 0,70 ^{Aa}	78,00 \pm 5,60 ^{Aa}	4,13 \pm 0,74 ^{Aa}	71,33 \pm 9,34 ^{Aa}	3,80 \pm 0,86 ^{Aa}	59,33 \pm 13,21 ^{Ab}	3,60 \pm 0,73 ^{Aa}	50,00 \pm 15,46 ^{Ab}	2,66 \pm 0,72 ^{Aab}	30,33 \pm 9,53 ^{Ab}	1,93 \pm 0,67 ^{Bb}
TRISMF2	62,00 \pm 11,15 ^{Ba}	3,40 \pm 0,50 ^{Aa}	65,33 \pm 8,54 ^{Aa}	3,33 \pm 0,48 ^{Aa}	54,00 \pm 12,84 ^{Aa}	3,00 \pm 0,65 ^{Aa}	36,33 \pm 7,89 ^{Bb}	2,53 \pm 0,51 ^{Aab}	28,66 \pm 13,15 ^{Bb}	2,13 \pm 0,74 ^{Aab}	9,66 \pm 3,99 ^{Bc}	1,33 \pm 0,48 ^{Bb}
TRISMF3	55,66 \pm 11,15 ^{Ba}	3,20 \pm 0,67 ^{Aa}	40,00 \pm 9,81 ^{Ba}	2,66 \pm 0,48 ^{Ba}	31,00 \pm 12,42 ^{Ba}	2,33 \pm 0,72 ^{Bba}	19,66 \pm 8,75 ^{Bb}	1,73 \pm 0,59 ^{Bb}	11,33 \pm 7,66 ^{Bbc}	1,26 \pm 0,79 ^{Bb}	5,00 \pm 4,62 ^{Bc}	0,466 \pm 0,51 ^{Cc}
TRISMF4	40,66 \pm 15,22 ^{Ba}	1,93 \pm 0,79 ^{Ba}	26,06 \pm 15,13 ^{Ba}	1,73 \pm 0,70 ^{Ba}	16,66 \pm 15,99 ^{Ba}	1,20 \pm 0,86 ^{Ba}	9,20 \pm 9,43 ^{Bb}	1,00 \pm 0,65 ^{Ba}	2,20 \pm 2,07 ^{Cc}	0,66 \pm 0,48 ^{Cb}	00,00 \pm 00,00 ^{Cc}	0,00 \pm 0,00 ^{Cc}
TRISMF5	44,00 \pm 11,05 ^{Ba}	1,86 \pm 0,79 ^{Ba}	29,33 \pm 14,86 ^{Ba}	1,66 \pm 0,70 ^{Ba}	17,00 \pm 10,66 ^{Bab}	1,20 \pm 0,86 ^{Ba}	5,06 \pm 4,44 ^{Cb}	1,00 \pm 0,65 ^{Ba}	00,00 \pm 00,00 ^{Cc}	0,64 \pm 0,48 ^{Cb}	00,00 \pm 00,00 ^{Cc}	0,00 \pm 0,00 ^{Cc}
TRISMF10	00,00 \pm 0,00 ^{Ca}	0,00 \pm 0,00 ^{Ca}	00,00 \pm 0,00 ^{Ca}	0,00 \pm 0,00 ^{Ca}	00,00 \pm 00,00 ^{Ca}	0,00 \pm 0,00 ^{Ca}	00,00 \pm 00,00 ^C	0,00 \pm 0,00 ^{Ca}	00,00 \pm 00,00 ^{Ca}	0,00 \pm 0,00 ^{Ca}	00,00 \pm 00,00 ^{Ca}	0,00 \pm 0,00 ^{Ca}

246 **Mot.: Motilidade; Vig.: Vigor Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e minúscula na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

247 O percentual de espermatozoides morfolologicamente normais submetidos ao TTR
 248 lento utilizando o diluente a base do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia*
 249 *flexuosa* estão apresentados na tabela 2. Observa-se que não houve diferença estatística
 250 em todos os grupos testados quando comparados ao grupo controle.

251 **Tabela 2.** Média (\pm d.p.) do percentual de espermatozoides morfolologicamente normais
 252 do *pool* do sêmen caprino, submetido ao TTR lento, pós-diluição em TRIS contendo ou
 253 não diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa*.

Tratamentos	TTR (minutos)				
	05 min.	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.
TRIS	79,06 \pm 7,87 ^{Aa}	80,53 \pm 5,60 ^{Aa}	82,00 \pm 6,38 ^{Aa}	79,00 \pm 8,45 ^{Aa}	81,86 \pm 6,11 ^{Aa}
TRISMF025	84,13 \pm 6,56 ^{Aa}	81,93 \pm 7,05 ^{Aa}	85,33 \pm 7,05 ^{Aa}	79,26 \pm 6,81 ^{Aa}	80,20 \pm 8,48 ^{Aa}
TRISMF05	81,13 \pm 6,93 ^{Aa}	82,00 \pm 5,50 ^{Aa}	85,26 \pm 7,84 ^{Aa}	83,60 \pm 7,80 ^{Aa}	84,40 \pm 6,38 ^{Aa}
TRISMF06	83,93 \pm 5,82 ^{Aa}	84,06 \pm 7,11 ^{Aa}	85,60 \pm 3,94 ^{Aa}	84,13 \pm 5,65 ^{Aa}	82,66 \pm 8,34 ^{Aa}
TRISMF07	86,86 \pm 4,98 ^{Aa}	85,86 \pm 5,64 ^{Aa}	83,80 \pm 4,31 ^{Aa}	84,33 \pm 5,43 ^{Aa}	85,93 \pm 5,34 ^{Aa}
TRISMF08	87,26 \pm 5,44 ^{Aa}	84,66 \pm 5,56 ^{Aa}	83,80 \pm 4,31 ^{Aa}	85,66 \pm 5,66 ^{Aa}	82,53 \pm 4,59 ^{Aa}
TRISMF09	81,46 \pm 7,61 ^{Aa}	82,80 \pm 8,93 ^{Aa}	81,66 \pm 7,53 ^{Aa}	82,00 \pm 6,99 ^{Aa}	79,06 \pm 6,89 ^{Aa}
TRISMF1	79,80 \pm 8,44 ^{Aa}	81,60 \pm 8,75 ^{Aa}	79,46 \pm 10,07 ^{Aa}	82,73 \pm 5,96 ^{Aa}	83,26 \pm 5,75 ^{Aa}
TRISMF2	82,00 \pm 9,57 ^{Aa}	83,80 \pm 7,56 ^{Aa}	84,06 \pm 8,77 ^{Aa}	78,06 \pm 8,63 ^{Aa}	81,00 \pm 9,19 ^{Aa}
TRISMF3	83,86 \pm 9,01 ^{Aa}	85,66 \pm 8,05 ^{Aa}	82,80 \pm 9,00 ^{Aa}	81,06 \pm 5,70 ^{Aa}	84,33 \pm 6,91 ^{Aa}
TRISMF4	80,33 \pm 9,77 ^{Aa}	82,20 \pm 7,87 ^{Aa}	81,00 \pm 9,44 ^{Aa}	78,46 \pm 8,24 ^{Aa}	79,80 \pm 6,71 ^{Aa}
TRISMF5	79,93 \pm 7,36 ^{Aa}	81,60 \pm 8,02 ^{Aa}	82,66 \pm 8,65 ^{Aa}	84,00 \pm 5,68 ^{Aa}	78,80 \pm 8,52 ^{Aa}
TRISMF10	80,66 \pm 8,94 ^{Aa}	79,40 \pm 10,05 ^{Aa}	80,86 \pm 7,58 ^{Aa}	82,00 \pm 5,89 ^{Aa}	81,40 \pm 6,24 ^{Aa}

254 Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e minúscula na mesma linha diferem entre si pelo
 255 teste de Tukey (P<0,05).

256
 257 *Efeito do diluente de origem vegetal sobre os parâmetros espermáticos após*
 258 *criopreservação*

259 Na tabela 3 estão sumariados os parâmetros espermáticos avaliados pelo CASA
 260 (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, WOB) após
 261 criopreservação/descongelação. Foi constatado diferença estatística em todos os
 262 parâmetros avaliados, tanto para os grupos Tris contendo 2,5% de gema de ovo como
 263 aqueles compostos por Tris, ambos adicionados de diferentes concentrações da polpa do
 264 fruto de *Mauritia flexuosa* (p>0,05), conforme apresentado na tabela 3.

265 Para os parâmetros de motilidade (MT) e motilidade progressiva (MP) verificou-
 266 se diferença significativa entre o grupo contendo TRIS contendo 2,5% gema de ovo e os
 267 demais grupos testados contendo diferentes concentrações do extrato bruto de origem
 268 vegetal isento ou não de gema de ovo (p>0,05). Ao analisar os resultados obtidos para a
 269 velocidade curvilínea (VCL) verificou-se que o grupo TRISGLGEMF06 apresentou

270 resultados superiores ($p < 0,05$) e diferiu estatisticamente dos grupos TRIS contendo
271 2,5% gema de ovo, TRISMF025, TRISMF05, TRISMF06, TRISGLGEMF07 e
272 TRISMF07 (tabela 3).

273 Os resultados para o parâmetro velocidade linear (VSL) possibilitam inferir que
274 os grupos TRISGLGEMF025, TRISMF06 apresentaram-se superiores ($p < 0,05$) quando
275 comparado aos grupos TRISMF025, TRISMF05 TRISGLGEMF06, TRISMF07,
276 TRISMF09, TRISMF1. O grupo TRISGLGEMF06 apresentou maior velocidade média
277 de percurso (VAP) ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos TRIS contendo 2,5% gema,
278 TRISMF025, TRISMF05, TRISMF06, TRISMF07, TRISMF09, TRISMF1 (tabela 3).

279 A linearidade (LIN) foi significativamente superior para o grupo
280 TRISGLGEMF07 ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos TRISGLGEMF025,
281 TRISMF07, TRISMF09, TRISMF1. Para o parâmetro retilinearidade (STR) verificou-
282 se que os grupos TRISGLGEMF06, TRISMF06 e TRISMF08 apresentaram maior
283 percentual ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo TRISGLGEMF07 (tabela 3).

284 O deslocamento lateral de cabeça (ALH) foi estatisticamente maior no grupo
285 TRISGLGEMF06, comparado aos grupos TRIS contendo 2,5% gema, TRISMF05 e
286 TRISMF06 ($p < 0,05$). Para o parâmetro de frequência de batimento cruzado (BCF)
287 verificou-se que os grupos TRISMF05, TRISGLGEMF06, TRISGLGEMF07,
288 TRISMF08, TRISGLGEMF09 e TRISGLGEMF1 diferiram do grupo TRISMF06 com
289 resultados superiores ($p < 0,05$). O índice de oscilação (WOB) foi significativamente
290 superior para o grupo TRISGLGEMF025 quando comparado ao grupo TRISMF06
291 ($P < 0,05$) (tabela 3).

292

293

294

295 **Tabela 3.** Média (\pm d. p.) dos parâmetros espermáticos (MT, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF, WOB) do sêmen caprino criopreservado
 296 em meio TRIS-2,5% gema de ovo acrescido ou não de diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia Flexuosa*
 297 avaliados pelo CASA.

Tratamentos	Parâmetros									
	MT (%)	MP (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH ($\mu\text{m/s}$)	BCF (Hz)	WOB (%)
TRIS – GEMA	1,45 \pm 0,67 ^a	0,26 \pm 0,28 ^a	48,10 \pm 29,60 ^{bc}	23,60 \pm 20,20 ^{abc}	29,50 \pm 18,80 ^{bcde}	42,30 \pm 12,90 ^{abc}	70,20 \pm 19,30 ^{ab}	1,11 \pm 1,44 ^{bc}	3,35 \pm 5,38 ^{ab}	57,30 \pm 11,98 ^{abc}
TRISGLGEMF025	5,21 \pm 6,56 ^a	2,80 \pm 4,98 ^a	52,20 \pm 40,30 ^{abc}	25,50 \pm 18,30 ^a	34,20 \pm 24,50 ^{abcde}	58,50 \pm 19,00 ^c	78,10 \pm 12,20 ^{ab}	1,51 \pm 1,38 ^{abc}	3,81 \pm 4,87 ^{ab}	73,86 \pm 17,38 ^{ab}
TRISMF025	4,06 \pm 4,88 ^a	0,46 \pm 0,76 ^a	45,66 \pm 20,35 ^{bc}	19,78 \pm 17,51 ^c	26,91 \pm 17,04 ^{cde}	37,53 \pm 21,17 ^{abc}	63,10 \pm 22,15 ^{ab}	1,51 \pm 1,32 ^{abc}	5,13 \pm 5,70 ^{ab}	56,83 \pm 13,55 ^{abc}
TRISGLGEMF05	8,60 \pm 7,96 ^a	1,91 \pm 2,15 ^a	59,60 \pm 18,50 ^{abc}	32,00 \pm 16,80 ^{abc}	40,30 \pm 15,50 ^{abcde}	50,30 \pm 17,30 ^{abc}	74,30 \pm 16,50 ^{ab}	2,51 \pm 1,26 ^{ab}	7,45 \pm 3,93 ^{ab}	66,18 \pm 9,94 ^{abc}
TRISMF05	2,03 \pm 1,41 ^a	0,36 \pm 0,34 ^a	42,75 \pm 15,15 ^{bc}	19,38 \pm 5,910 ^c	25,68 \pm 9,12 ^{de}	45,85 \pm 8,32 ^{abc}	75,06 \pm 9,37 ^{ab}	1,11 \pm 1,01 ^{bc}	4,93 \pm 4,42 ^a	59,75 \pm 5,17 ^{ab}
TRISGLGEMF06	6,40 \pm 5,35 ^a	2,91 \pm 2,49 ^a	78,60 \pm 14,40 ^a	43,40 \pm 12,60 ^c	53,80 \pm 12,80 ^a	55,00 \pm 13,80 ^{abc}	79,70 \pm 7,20 ^a	2,98 \pm 0,81 ^a	8,88 \pm 1,59 ^a	68,21 \pm 11,53 ^{abc}
TRISMF06	1,40 \pm 1,50 ^a	0,06 \pm 0,16 ^a	24,95 \pm 22,81 ^c	13,43 \pm 12,68 ^a	16,45 \pm 14,81 ^e	36,21 \pm 29,13 ^{abc}	53,76 \pm 42,38 ^a	0,16 \pm 0,40 ^c	0,55 \pm 1,34 ^b	46,83 \pm 37,11 ^c
TRISGLGEMF07	5,15 \pm 4,63 ^a	1,35 \pm 1,06 ^a	49,00 \pm 22,70 ^{bc}	28,00 \pm 12,60 ^{abc}	34,90 \pm 15,40 ^{abcde}	64,40 \pm 21,80 ^a	82,50 \pm 10,60 ^b	2,23 \pm 1,38 ^{ab}	6,78 \pm 4,44 ^a	76,38 \pm 16,21 ^a
TRISMF07	3,26 \pm 2,81 ^a	1,05 \pm 1,25 ^a	37,38 \pm 25,55 ^{bc}	15,76 \pm 14,97 ^c	23,25 \pm 16,63 ^{cde}	31,61 \pm 20,47 ^c	50,28 \pm 30,29 ^{ab}	1,33 \pm 1,74 ^{abc}	4,25 \pm 5,59 ^{ab}	53,70 \pm 27,28 ^{bc}
TRISGLGEMF08	9,05 \pm 10,48 ^a	2,80 \pm 3,64 ^a	68,70 \pm 17,20 ^{abc}	39,50 \pm 18,40 ^{abc}	48,00 \pm 17,00 ^{abc}	54,10 \pm 18,10 ^{abc}	77,70 \pm 16,40 ^{ab}	2,15 \pm 1,54 ^{ab}	5,96 \pm 3,72 ^{ab}	66,21 \pm 10,44 ^{abc}
TRISMF08	4,86 \pm 3,24 ^a	3,88 \pm 3,46 ^a	62,20 \pm 11,40 ^{abc}	30,70 \pm 13,00 ^{abc}	38,58 \pm 9,41 ^{abcde}	48,93 \pm 17,43 ^{abc}	76,20 \pm 19,03 ^a	2,50 \pm 2,21 ^{ab}	7,98 \pm 3,80 ^a	59,73 \pm 11,11 ^{abc}
TRISGLGEMF09	4,41 \pm 3,40 ^a	1,35 \pm 1,37 ^a	67,50 \pm 18,10 ^{abc}	42,10 \pm 16,50 ^{ab}	50,30 \pm 16,90 ^{ab}	60,00 \pm 10,70 ^{ab}	81,60 \pm 7,30 ^{ab}	2,61 \pm 0,45 ^{ab}	8,73 \pm 2,39 ^a	72,45 \pm 7,26 ^{abc}
TRISMF09	4,26 \pm 2,39 ^a	1,05 \pm 1,19 ^a	92,96 \pm 86,97 ^{abc}	22,40 \pm 13,00 ^{bc}	31,01 \pm 14,30 ^{bcde}	40,41 \pm 12,36 ^{bc}	68,88 \pm 10,59 ^{ab}	1,83 \pm 1,31 ^{ab}	6,21 \pm 4,53 ^{ab}	57,68 \pm 9,03 ^{abc}
TRISGLGEMF1	5,71 \pm 2,54 ^a	2,01 \pm 1,32 ^a	67,60 \pm 20,10 ^{ab}	37,70 \pm 15,90 ^{abc}	47,20 \pm 17,90 ^{abcde}	54,60 \pm 11,10 ^{abc}	79,10 \pm 6,40 ^{ab}	2,61 \pm 0,78 ^{ab}	8,05 \pm 2,47 ^a	68,53 \pm 10,25 ^{abc}
TRISMF1	4,75 \pm 1,67 ^a	0,48 \pm 0,41 ^a	51,05 \pm 6,50 ^{abc}	20,46 \pm 6,12 ^c	28,11 \pm 5,60 ^{cde}	39,28 \pm 7,90 ^{bc}	71,38 \pm 9,31 ^{ab}	1,38 \pm 0,97 ^{abc}	6,15 \pm 4,41 ^{ab}	54,81 \pm 6,54 ^{abc}

298 a, b, c, d, e Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna significa que houve diferença estatística entre os diluentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

299 MT = motilidade, MP = motilidade progressiva, VCL = velocidade curvilínea, VSL = velocidade linear, VAP = velocidade média do percurso, LIN = Linearidade, STR =
 300 Retilinearidade, ALH = Deslocamento lateral de cabeça, BCF = Frequência de batimento cruzado, WOB = Índice de oscilação.

301

302 Os dados referentes às análises da viabilidade espermática utilizando sondas
 303 fluorescentes estão dispostos na tabela 4. O grupo controle apresentou estatisticamente
 304 maior percentual de espermatozoides com membrana íntegra ($p < 0,05$) quando comparado
 305 aos grupos testados. Em contrapartida, os resultados para atividade mitocondrial revelaram
 306 que os grupos TRISGLGEMF025, TRISMF025, TRISGLGEMF05, TRISMF05,
 307 TRISMF06, TRISGLGEMF08, TRISMF08, TRISGLGEMF09, TRISMF09, TRISMF1
 308 não demonstram diferença estatística em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$).

309 **Tabela 4.** Média (\pm d. p.) dos parâmetros espermáticos para integridade de membrana
 310 plasmática (MP) e potencial de membrana mitocondrial (MM), pós-descongelamento de
 311 espermatozoides caprinos em meio TRIS-2,5% gema acrescido ou não de diferentes
 312 concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia Flexuosa*.

Tratamentos	Parâmetros	
	Integridade de MP*	Potencial MM**
TRISGLGE	34,26 \pm 10,40 ^a	21,60 \pm 7,89 ^a
TRISGLGEMF025	16,80 \pm 8,12 ^b	20,26 \pm 6,09 ^a
TRISMF025	17,80 \pm 5,43 ^b	14,80 \pm 10,63 ^a
TRISGLGEMF05	21,80 \pm 13,17 ^b	15,86 \pm 6,56 ^a
TRISMF05	21,53 \pm 7,47 ^b	16,53 \pm 9,52 ^a
TRISGLGEMF06	16,00 \pm 5,07 ^b	12,53 \pm 2,57 ^b
TRISMF06	17,56 \pm 6,89 ^b	14,00 \pm 7,62 ^{ab}
TRISGLGEMF07	13,50 \pm 8,12 ^b	13,46 \pm 2,82 ^b
TRISMF07	14,13 \pm 6,33 ^b	11,26 \pm 4,66 ^b
TRISGLGEMF08	16,06 \pm 6,79 ^b	14,66 \pm 6,25 ^{ab}
TRISMF08	17,01 \pm 8,86 ^b	16,33 \pm 12,21 ^a
TRISGLGEMF09	20,00 \pm 6,04 ^b	16,26 \pm 9,60 ^a
TRISMF09	19,50 \pm 5,32 ^b	15,86 \pm 10,76 ^a
TRISGLGEMF1	18,50 \pm 5,96 ^b	19,33 \pm 7,06 ^a
TRISMF1	17,60 \pm 4,30 ^b	14,60 \pm 6,42 ^{ab}

313 Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

314 *Membrana plasmática/**Membrana mitocondrial.

315 5. DISCUSSÃO

316 Nesta pesquisa, foi observado a viabilidade espermática do *pool* do sêmen caprino
 317 utilizando diluente a base da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa* em baixas concentrações
 318 através das duas etapas de avaliação dos parâmetros espermáticos em relação aos grupos
 319 controles a base de Tris (Etapa 1) e Tris contendo 2,5% gema (Etapa 2).

320 Ao final do TTR (Etapa 1) foi observado a interação entre o diluente e o tempo de
 321 análise, onde a motilidade aos cinco minutos de incubação apresentou a média de 64% e

322 aos 120 minutos com média de 20%, o vigor aos cinco minutos de incubação apresentou a
323 média 3,0 e aos 120 minutos apresentou 1,33. Isso pode ser devido à baixa absorção de
324 açúcares, lipídeos, minerais e proteínas pelos espermatozoides ou mesmo pela baixa
325 disponibilidade destes no diluente. Machado et al. (2018) criopreservando o sêmen caprino
326 utilizando o óleo de peixe associado ao ácido ascórbico no diluente, observaram
327 diminuição nos parâmetros de vigor e motilidade pós descongelação ao longo do TTR (180
328 minutos). Dias et al. (2015) fizeram a adição das soluções ringer lactato, citrato de sódio
329 2,92% e solução TRIS na criopreservação do sêmen caprino e verificaram que estes não
330 permitiram persistência da motilidade e vigor dos espermatozoides após a descongelação
331 durante o tempo preconizado pelo teste de termorresistência.

332 Os valores descritos para o parâmetro de espermatozoides morfolologicamente
333 normais em todos os tratamentos estão de acordo com o exigido pelo CBRA (2013) que
334 preconiza o máximo de 20% de espermatozoides anormais para pequenos ruminantes, em
335 particular quando para serem destinados a inseminação artificial. Segundo Peixoto et al.
336 (2017), as patologias espermáticas podem ter como causa as substâncias tóxicas que
337 podem ser liberadas pelo próprio metabolismo das células espermáticas, como por exemplo
338 os compostos dos espermatozoides imóveis ou anormais podem reagir com o oxigênio
339 provocando degeneração.

340 O sistema CASA contribui de forma significativa na determinação da qualidade do
341 ejaculado, pelas repetidas análises de várias características da motilidade dos
342 espermatozoides (Oliveira et al., 2013). Os parâmetros do CASA neste estudo para os
343 parâmetros de motilidade (MT) e motilidade progressiva estão abaixo do mínimo exigido,
344 quando se almeja empregar o sêmen nas biotecnologias reprodutivas, tais como a
345 inseminação artificial. Farrell et al. (1998) avaliando o sêmen de touros pelo sistema
346 CASA observou pouca correlação da MT com a fertilidade, entretanto verificaram
347 correlação para motilidade progressiva (MP), deslocamento lateral de cabeça (ALH),
348 frequência de batimento cruzado (BCF) e (parâmetro velocidade linear) VSL.

349 A velocidade curvilínea (VCL) em todos os grupos não ultrapassou os 100 $\mu\text{m/s}$,
350 apesar de haver diferença estatística. Segundo Mortimer e Maxwell (1999) os valores para
351 estes parâmetros não devem ultrapassar 100 $\mu\text{m/s}$, em casos onde esses valores
352 ultrapassam os 250 $\mu\text{m/s}$ pode-se inferir que houve hiperativação dos espermatozoides. A
353 hiperativação é uma característica limitante, pois trata-se da ativação espermática que deve
354 acontecer nas proximidades do local de fertilização, ou seja no trato genital da fêmea.

355 Deste modo, essa ativação antecipada reduz o tempo de vida útil da célula espermática,
356 diminuindo as chances de fecundação (Vertegen et al., 2002).

357 Os valores encontrados para a velocidade linear (VSL) em todos os grupos testados
358 estão abaixo do que condiz com a hiperativação das células espermáticas que é $\leq 100 \mu\text{m/s}$
359 (Mortimer; Maxwell, 1999). Para a velocidade média de percurso (VAP), verificou-se
360 pelos resultados apresentados que a ausência de gema de ovo pode ter afetado de forma
361 negativa a viabilidade dos espermatozoides de reprodutores caprinos após a
362 criopreservação neste parâmetro. Os valores encontrados neste trabalho não ultrapassaram
363 $50,80 \mu\text{m/s}$ diferindo das médias encontradas por Maia (2006) e Azevedo (2006) utilizando
364 diluente aditivado de Lauril sulfato de sódio, Trolox, catalase e a incorporação de
365 colesterol, demosterol, ácido oleico-linoleico e α -lactoalbumina onde verificaram a VAP
366 $93,9 \mu\text{m/s}$ e $93,0 \mu\text{m/s}$.

367 Estudos anteriores apontam correlação positiva do parâmetro de linearidade (LIN)
368 com a taxa de prenhez, entretanto negativa em outros (Verstegem et al., 2002). Os
369 resultados obtidos para o parâmetro retilinearidade (STR) em todos os grupos estão
370 relativamente baixos, segundo Leite (2008) que altos valores de STR demonstram que o
371 trajeto realizado pela célula espermática é mais uniforme e com menor amplitude.

372 Casos onde há aumento do deslocamento lateral de cabeça (ALH) relacionado à
373 diminuição do VSL e STR podem estar associados com a capacitação do espermatozoide, e
374 também com modificação em nível de membrana, intracelulares, metabólicas ou
375 anormalidades mitocondriais (Vidament et al., 2012). Parâmetro de frequência de
376 batimento cruzado (BCF), informações sobre a influência deste parâmetro na fertilidade
377 ainda são escassas, devido à pouca quantidade de dados disponíveis na literatura
378 (Hoogeswijs et al., 2010).

379 Segundo Mortimer (1997) a WOB pode apresentar-se baixa em percursos em que a
380 célula espermática percorre uma área ampla em seu trajeto em casos onde o ALH é
381 elevado, porém alto em percursos circulares ou retilíneos visto que a VAP e a VCL
382 apresentam-se de forma semelhante.

383 A gema de ovo é um crioprotetor de origem animal que pode apresentar riscos
384 sanitários (Layek et al., 2016). Todavia, mesmo com este entrave, tem sido
385 corriqueiramente utilizada na criopreservação de sêmen caprino (Oliveira et al., 2011).
386 Neste contexto, é imprescindível que a mesma seja substituída por meios isentos de
387 produtos de origem animal, como por exemplo os de origem vegetal ou sintéticos como a
388 lecitina de soja e os sintéticos a exemplo o BTS[®] (*Beltsville Thawing Solution*),

389 respectivamente. Yodmingkwan et al. (2016) ao compararem a lecitina de soja com a gema
390 de ovo na criopreservação do sêmen de caprinos da raça Boer, concluíram que a inclusão
391 de 1,5% de lecitina de soja pode ser uma alternativa viável. O BTS[®] é um diluente
392 comumente utilizado na conservação do sêmen de suíno. Porém, Paulenz et al. (2005) tem
393 utilizado este diluente na criopreservação do sêmen caprino com resultados promissores.

394 Os grupos testados com as menores concentrações de *Mauritia flexuosa* (0,25 a
395 0,5), com ou sem adição de gema de ovo, apresentaram resultados semelhantes ao grupo
396 controle para o parâmetro de potencial de membrana mitocondrial. Esses mesmos grupos
397 diferiram estatisticamente ao grupo controle para o parâmetro integridade de membrana
398 plasmática, todavia por apresentarem semelhanças no parâmetro anterior, tenderam a
399 serem os melhores avaliados nos grupos testados. Vários estudos testando diluentes de
400 origem vegetal têm apresentando bons resultados na criopreservação seminal de pequenos
401 ruminantes. A exemplo de Nascimento (2016), que ao avaliar o efeito do extrato aquoso
402 de noni (*Morinda cintrifolia*) adicionado ao meio diluente a base de TRIS-Gema-Glicerol
403 para criopreservação seminal de ovinos, observou que este é capaz de manter a integridade
404 da membrana plasmática do espermatozoide.

405 Por outro lado, segundo Silva (2015), a adição de até 0,45g/100mL do óleo de
406 linhaça (*Linum usitatissum*) no meio diluente citrato-gema como fonte de ácidos graxos
407 poli-insaturados para criopreservação do sêmen caprino não melhorou a viabilidade
408 espermática para os parâmetros avaliados, inclusive integridade da membrana plasmática,
409 pois menos de 50% dos espermatozoides não possuíam membrana íntegra. Já Peterson et
410 al. (2007), combinaram diferentes sondas fluorescentes SYBR[®]14/IP para a avaliação de
411 espermatozoides caprinos e encontraram correlação entre número de células intactas e a
412 quantidade de espermatozoides móveis, o que provavelmente possa explicar a diminuição
413 nos parâmetros motilidade espermática e integridade de membrana plasmática após a
414 descongelação.

415 **6. CONCLUSÕES**

416 A polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* nas concentrações de 0,25% à
417 1% em solução tampão TRIS adicionados ao *pool* de sêmen caprino permitiu uma boa
418 manutenção da viabilidade dos espermatozoides após o processo de
419 criopreservação/descongelação.

420 A polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* nas concentrações 0,25% à 1%
421 adicionado no diluente TRIS contendo 2,5% de gema de ovo atuou de forma benéfica nos
422 parâmetros espermáticos do sêmen caprino após a criopreservação/descongelação,

423 podendo ser uma alternativa viável para aplicação a campo em tecnologias reprodutivas
424 como a inseminação artificial.

425 **7. CONFLITO DE INTERESSES**

426 Os autores deste trabalho não possuem qualquer relação financeira ou pessoal com
427 outras pessoas ou organização que possam influenciar indevidamente o viés do artigo
428 intitulado “Uso da Polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* como suplemento ao
429 diluente de congelamento do sêmen caprino”.

430 **8. AGRADECIMENTOS**

431 Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo CNPq e CAPES - Brasil.

432 **9. REFERÊNCIAS**

433 Anghel, A., Zamfirescu, S., Dragomir, C., Nadolu, D., Elena, S., Florica, B. 2010. The
434 effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. Roman
435 Biotechnol Lett. 15, 26-32. <http://www.rombio.eu/.../4.Andreea.pdf>

436 Azevedo, H. C. 2006. Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos
437 submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, demosterol, ácido oléico-
438 linoléico e α -Lactoalbumina. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e
439 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 195.
440 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36690/1/TS746.pdf>

441 Cabrera, F., González, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A., Gracia, A. 2005. The effect
442 of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary
443 Buck (*Capra hircus*). Reproduction in Domestic Animals. 40, 191-195.
444 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00544.x>

445 Carneiro, B.T., Carneiro, J. G. M. 2011. Frutos e polpa desidratada do Buriti (*M. flexuosa*
446 L.): aspectos físicos, químicos e tecnológicos. Revista Verde, 6, 105-11.
447 <https://gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/viewFile/483/600>

448 Castelo, T. S., Frota, T. R., Silva, A. R. 2008. Considerações sobre a criopreservação do
449 sêmen de caprinos. Acta Veterinária Brasilica. 2, 67-75.
450 <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.3.885>

451 Cavalcante, J. M. M., Brasil, O. O., Salgueiro, C. C. M., Salmito-Vanderley, C. S. B.,
452 Nunes, J. F. 2014. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de
453 coco em pó (ACP-102c). Ciência Animal Brasileira. 3, 344-353.
454 <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v15i327834>

455 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013. Manual para exame andrológico
456 e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA.

457 Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., Naitana, S.,
458 Berlinguer, F. 2015. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane
459 integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 83,
460 1064-1074. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.012>

461 Cortell, J. M. 1981. Colletion, processing and artificial insemination of goat semen.
462 Nouzilly – Fance: INRA, 28.

463 Cox, J. F., Alfaro, V., Montenegro, V., Rodriguez-Martinez, H. (2006). Computer-assisted
464 analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical
465 mucus. *Theriogenology*, 66 (4), 860–867.
466 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.062>

467 Del Valle, I., Gómez-Durán, A., Holt, W. V., Muiño-Blanco, T., Cebrán-Pérez, J. A. 2012.
468 Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa.
469 *Journal of Andrology*. 33, 717-725. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014944>

470 Dias, J. C. O., Santos, M. C. R., Penitente Filho, J. M., Oliveira, G. D., Mendes, V. R. A.;
471 Mancio, A. B. 2015. Características do sêmen caprino descongelado após a adição de
472 Ringer Lactato, Citrato de Sódio e solução Tris. *Ciência Animal Brasileira*. 16, 243-
473 250. <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v16i224240>

474 Emerick, L. L., Dias, J. C., Vale Filho, V. R., Silva, M. A., Andrade, V. J., Leite, T. G.,
475 Martins, J. A. M. 2011. Avaliação da Integridade de Membrana em Espermatozoide
476 Bovino Criopreservado para Prever o Índice de Prenhez. *Ciência Animal Brasileira*. 12,
477 536-546. <https://doi.org/10.5216/cab.v12i3.9739>

478 Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., Foote, R. H. 1998. Quantification of bull
479 sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the
480 relationship to fertility. *Theriogenology*. 49, 871-879. [https://doi.org/10.1016/S0093-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00036-3)
481 [691X\(98\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00036-3)

482 Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H.
483 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial
484 insemination. *Theriogenology*. 59, 1157-1170. [https://doi.org/10.1016/S0093-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01178-0)
485 [691X\(02\)01178-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01178-0)

486 Gravance, C. G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D. L., Casey P. J. 1998. Effects of
487 cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology*. 19, 704-709.
488 <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02079.x>

489 Harrison, R. A. P., Vickers, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane
490 integrity in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility*. 88, 343-352.
491 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880343>

492 He, L.; Bailey, J. L., Buhr, M. M. 2001. Incorporating lipids into boar sperm decreases
493 chilling sensitivity but not capacitation potencial. *Biology of Reproduction*. 64, 69-70.
494 <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.69>

495 Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J. M. 2006. Influence of staining and sampli
496 procdedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer.
497 *Theriogenology*. 66, 996-1003. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.039>

498 Iritani, A. J., Nishikawa, Y. 1964. Studies on the egg yolk coagulating enzyme in goat
499 sêmen. *Japanese Journal of Zootecnical Science*, 10, 57-64.
500 <https://doi.org/10.1262/jrd1955.10.44>

501 Köppen, W, Geiger R. 1928. *Klimate der Erde*. [map] Gotha: Verlag Justus Perthes. Wall-
502 map 150cm x 200 cm.

503 Küçük, N., Aksoy, M., Uçan, U. Ahmad, E., Naseer, Z., Ceylan, A. Serin, L. 2014.
504 Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen.
505 *Cryobiology*. 68, 3, 601 327-331. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.009>

506 Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., Parks, J. E. 2016. Cryopreservation of bull
507 semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction*
508 *Science*, 172, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>

509 Leite, T. G. de. 2008. Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre
510 características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros gir
511 leiteiro. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
512 122. [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/LGPD-](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/LGPD-7Q2P86/disserta__o_mestrado_ticiano_guimar_es_leite.pdf?sequence=1)
513 [7Q2P86/disserta__o_mestrado_ticiano_guimar_es_leite.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/LGPD-7Q2P86/disserta__o_mestrado_ticiano_guimar_es_leite.pdf?sequence=1)

514 Machado, R., Simplício, A. A. 1995. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio
515 atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 19, 61-72.
516 [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41797/1/AAC-Inseminacao-](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41797/1/AAC-Inseminacao-artificial.pdf)
517 [artificial.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41797/1/AAC-Inseminacao-artificial.pdf)

518 Machado, W. M., Barbosa, L. P., Souza, R. S., França, C. S., Pinheiro, E. E. E. G., Lents,
519 M. P., Araújo, R. C. S. A.; Santana, A. L. A. 2018. Óleo de peixe associado ao ácido
520 ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. *Arquivo Brasileiro de*
521 *Medicina Veterinária e Zootecnia*. 70, 131-138. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9506>

522 Maia, M. S. 2006. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio
523 (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio
524 (OEP), Trolox-C e Catalase. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de
525 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
526 Filho, Botucatu-SP. 149.
527 [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105979/maia_ms_dr_botfmvz.pdf;jsess](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105979/maia_ms_dr_botfmvz.pdf;jsessionid=AF65CC7737801E55EF7739EDB39C7B94?sequence=1)
528 [ionid=AF65CC7737801E55EF7739EDB39C7B94?sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105979/maia_ms_dr_botfmvz.pdf;jsessionid=AF65CC7737801E55EF7739EDB39C7B94?sequence=1)
529 Mortimer, S. T. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of
530 sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*. 3, 403-439, 1997.
531 Mortimer, S. T., Maxwell, W. M. C. 2004. Effect of medium on the kinematics of frozen-
532 thawed ram spermatozoa. *Reproduction*. 72, 285-291. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00075>
533 Oliveira, L. Z., Arruda, R. P., Andrade, A. F. C., Celeghini, E. C. C., Reeb, P. D., Martins,
534 J. P. N., Santos, R. M. S., Beletti, M. E., Peres, R. F. G.; Monteiro, F. M., Lima, V. F. M.
535 H. 2013. Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the
536 prediction of conception rate in a bovine tamed-AI program. *Animal Reproduction*
537 *Science*. 137, 145-155. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00235-1)
538 Oliveira, R. V., Nunes, J. F., Salgueiro, C. C. M., Cavalcante, J. M. M., Brasil, O. O.,
539 Moura, A. A. A. N. 2011. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio á
540 base de água de coco em pó (ACP-101[®]) ou Tris. *Arquivo Brasileiro de Medicina*
541 *Veterinária e Zootecnia*. 6, 1295-1302. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600003>
542 Nascimento, A. L. C., Santos, A. D. F., Azevedo, H. C., Andrade, C. L. Oliveira, V. S.
543 2016. Atividade antioxidante do extrato aquoso de noni em diluente para congelamento de
544 sêmen ovino. *Boletim de Indústria Animal*. 73, 68-74.
545 <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/159632/1/Atividade.pdf>
546 Papa, F. O., Felício, G. B., Melo-Oña, C. M., Alvarenga, M. A., De Vita, B., Trinque, C.,
547 Puoli-Filho, J. N., Dell'Aqua Jr, J. A. 2011. Replacing egg yolk with soybean lecithin in
548 the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 129, 73-77.
549 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.006>
550 Paulenz, H., Soltum, K., ADNOY, T., Andersen Berg, K., Soderquist, L. 2005. Effect of
551 different extenders on sperm viability of buck sêmen stored at room temperature. *Small*
552 *Ruminant Research*. 59, 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.11.010>
553 Peixoto, R. M., Andrioli, A., Santos, D. O., Pinheiro, R. R., Araújo, J. F., Sousa, Ana L.
554 M., Silva, D. F., Damasceno, E. M., Teixeira, M. F. S. 2017. Avaliação da toxicidade de

555 solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado. *Acta*
556 *Scientiae Veterinariae*. 45, 1487. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289053641025>

557 Peterson, K., Kappen, M. A. P. M., Ursem, P. J. F., Nöthling, J. O., Colenbrander, B.,
558 Gadella, B. M. 2007. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch
559 Albucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility.
560 *Theriogenology*. 67, 863-871. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.003>

561 Pickett, B. W., Faulkner, L. C., Seidel, G. E., Berndtson, W. E., Voss, J. L. 1976.
562 Reproductive physiology of stallion VI. Seminal and behavioral characteristics. *Journal of*
563 *Animal Science*. 43, 617-625. <https://doi.org/10.2527/jas1976.433617x>

564 Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*.
565 v.63, 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>

566 Roof, D. J., Bowley S.; Price, L. L., Matsas, D. J. 2012. Comparison of two comercial
567 extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, 77,
568 412-420. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.015>

569 Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction*
570 *Science*. 62, 77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)

571 Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., Sharafi, M. 2014. In vitro assessment
572 of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen.
573 *Cryobiology*, 68, 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008>

574 Salviano, M. B., Souza, J. A. T. 2008. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen
575 caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 12, 3, 159-167.
576 [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB167%20Salviano%20pag%20](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB167%20Salviano%20pag%20159-167.pdf)
577 [159-167.pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB167%20Salviano%20pag%20159-167.pdf)

578 Sariözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Taşdemir, U., Kinet, H., Ulutaş, P. A. 2010.
579 Effect of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-
580 oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*.
581 73, 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.015>

582 Silva, M. S. F. 2015. Criopreservação de sêmen caprino com inclusão de óleo de linhaça
583 dourada (*Linum usitatissimum L.*) no diluidor. Dissertação (Mestrado) – Centro de
584 Ciências Agrárias, Ambientais e biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
585 Cruz das Almas, BA. [https://www1.ufrb.edu.br/pgcienciaanimal/dissertacoes-](https://www1.ufrb.edu.br/pgcienciaanimal/dissertacoes-ppgca/category/27-2015?download=459:merole-souza-ferreira-da-silva)
586 [ppgca/category/27-2015?download=459:merole-souza-ferreira-da-silva](https://www1.ufrb.edu.br/pgcienciaanimal/dissertacoes-ppgca/category/27-2015?download=459:merole-souza-ferreira-da-silva)

587 Silva, S. V., Guerra, M. M. P. 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células
588 espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução*

589 Animal. 35, 370-384. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n4/pag370->
590 384.pdf

591 Souza, K. C., Andrioli, A., Teixeira, M. F. S. 2014. Vírus da artrite encefalite caprina em
592 sêmen: diagnóstico e transmissão. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 38, 92-97.
593 <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/998276/1/APVirus.pdf>

594 Souza, W. L., Moraes, E. A., Costa, J. M. S., Sousa, P. H. F., Lopes Junior, E. S., Oliveira,
595 R. P., Toniolli, R. 2016. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em
596 espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. Pesquisa
597 Veterinária Brasileira. 36, 657-664. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100->
598 736X2016000700017

599 Sperm Class Analyzer. 2013. User manual, Barcelona, España.

600 Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin K. 2002. Computer assisted sêmen analyzers in
601 andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 57, 149-79.
602 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)

603 Vidal, A. H., Batista, A. M., Silva, E. C. B., Gomes, W. A., Pelinca, A. P., Silva, S. V.,
604 Guerra, M. M. P. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat semen
605 cryopreservation. Small Ruminant Research. 109, 47-51.
606 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022>

607 Vidament, M., Magistrini, M., Le Foll, Y., Levillain, N., Yvon, J. M., Duchamp, G.,
608 Blesbois, E. 2012. Temperatures from 4 to 15°C are suitable for preserving the fertilizing
609 capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA 96 extender. Theriogenology.
610 78, 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.018>

611 Yodmingkwan, P., Guntaprom, S., Jaksamrit, J., Letchunhakiat, K. 2016. Effects of
612 Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. Agriculture and Agricultural
613 Science Procedia. 11, 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.021>

ANEXO - A



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



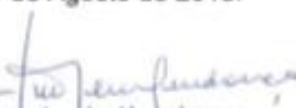
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64046-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Bioprospecção da Polpa do fruto de *Mauritia flexuosa* na conservação do sêmen caprino**", registrada nº **484/18**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. NEY RÔMULO DE OLIVEIRA PAULA** do **Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **31/08/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Setembro/ 2018 à Agosto/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Caprino (Bodes: 2 Parda Alpina, 1 Gurgueia/ Cabra: 1 SRD)
Nº de Animais	04
Peso/ Idade	50KG/ 6 Anos
Sexo	03 Machos e 01 Fêmea
Origem	Baias do Setor de Reprodução Animal/HVU/UFPI.

Teresina, 31 de Agosto de 2018.


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFPI
Coordenadora

ANEXO - B



AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Projeto: Bioprospecção da polpa do fruto de *mauritia flexuosa* na conservação do sêmen caprino

Mestrando: Homero Batista da Rocha

Nº da coleta _____

Data ___/___/___

ANÁLISE IMEDIATA

Análise imediata			
Parâmetros	Animal 123	Animal 124	Animal Gurgueia
Cor			
Aspecto			
Volume			
Turbilhonamento			
Motilidade			
Vigor			
Concentração			
Morfologia			
Análise do pool			
Vol. Recuperado			
Turbilhonamento			
Motilidade			
Vigor			
Morfologia			

GRUPO CONTROLE

➤ **TRIS GEMA 2,5%**

Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						

➤ **GRUPO DE TRATAMENTO: 0,25**

TRIS						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						

GEMA

Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						

➤ **GRUPO DE TRATAMENTO: BURITI 0,5%**

TRIS						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						

GEMA

Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						

Vigor						
> GRUPO DE TRATAMENTO: BURITI 0,6%						
TRIS						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						
GEMA						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
> GRUPO DE TRATAMENTO: BURITI 0,7%						
TRIS						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						
GEMA						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
> GRUPO DE TRATAMENTO: BURITI 0,8%						
TRIS						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						
GEMA						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
> GRUPO DE TRATAMENTO: BURITI 0,9%						
TRIS						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						
GEMA						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
> GRUPO DE TRATAMENTO: BURITI 1%						
TRIS						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						
GEMA						
Parâmetros	IMEDIATA			PÓS 7 DIAS		
Motilidade (%)						
Vigor						
Morfologia						