



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AMANDA PRISCILA MAIA SOUZA

**EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO DO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*) AO
DILUIDOR TRIS-GEMA SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN
CAPRINO**

**TERESINA
2022**

AMANDA PRISCILA MAIA SOUZA

**EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO DO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*) AO
DILUIDOR TRIS-GEMA SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN
CAPRINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade e Reprodução animal.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento.

**TERESINA
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processos Técnicos

S729e Souza, Amanda Priscila Maia.
Efeito da adição do extrato do jambolão (*syzygium cumini*)
ao diluidor TRIS-GEMA sobre a viabilidade espermática de
sêmen caprino. / Amanda Priscila Maia Souza. – 2022.
48 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-
Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2022.

“Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza.”

1. Sêmen. 2. Criopreservação. 3. Antioxidantes. 4. Jambolão.
5. Viabilidade Espermática. I. Souza, Amanda Priscila Maia.
II. Título.

CDD 636. 082 4

Bibliotecário: Géσιο dos Santos Barros – CRB-3/1469

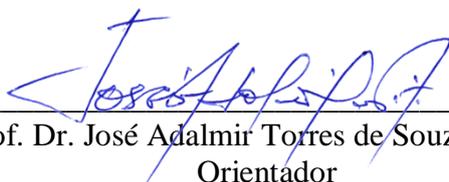
**EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO DO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*) AO
DILUIDOR TRIS-GEMA SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE SÊMEN
CAPRINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução animal.

Aprovado(a) em: 25/02/2022

Banca Examinadora:



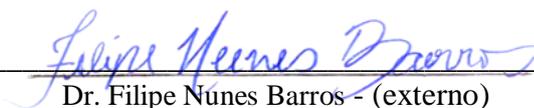
Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza – UFPI
Orientador
Presidente da banca



Profa. Dra. Isôlda Márcia Rocha do Nascimento – UFPI
Coorientadora



Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco – UFMA (externa)



Dr. Filipe Nunes Barros - (externo)

Dedico esta pesquisa a Deus, à minha família e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Toda grande realização depende de certa renúncia e de uma diligente entrega para aquilo que se almeja. Agora, quando chegamos ao final de uma etapa marcante tanto de nossa vida, como também para o desenvolvimento da ciência, podemos perceber que mais do que a sensação de dever cumprido, é momento de expressarmos a gratidão por todos aqueles que de alguma maneira viveram e contribuíram para que aqui chegássemos. Assim, não posso deixar de expressar minha gratidão aos mencionados a seguir:

À minha mãe Maria do Socorro, à minha irmã Ariane, Jackson Arthur, João Anthony, à minha avó Raimunda Maia, aos tios Djalma Maia e Edmilson Maia, por me ajudarem quando mais precisei.

À CAPES e à UFPI, sem essas Instituições não mergulharíamos no marcante mundo científico.

Aos amigos do curso, com quem compartilhei os dias alegres, difíceis e experiências.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza pela orientação.

À Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco, da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, por me auxiliar nas análises.

À minha coorientadora Profa. Dra. Isôlda Márcia Rocha do Nascimento, por sua solicitude em ajudar-me.

Ao Prof. Dr. Francisco Cardoso Figueiredo, por contribuir na extração do extrato de jambolão.

Ao Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior por sempre ajudar-me.

Ao Dr. José Wilson e aos tratadores da Fazenda Sucupira, em especial o Sr. Marisvaldo por seu auxílio com o manejo dos animais.

Ao Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL).

Ao Laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará, em especial ao Doutorando Leonardo Cabral, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Daniel Arcanjo e à Doutoranda Ana Karolinne Brito, por contribuírem na análise do TBARS.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal/UFPI, junto aos quais pude fazer amizade, conviver, aprender e adquirir experiências profissionais. São eles: Felipe Ferreira, Anna Monallysa, Ingrid de Moraes, Letícia Soares, Maria Michele, Marcos Celestino e Muriel Carvalho e Sra. Noêmia pela amizade e carinho, meus sinceros agradecimentos. Em especial, agradeço aos amigos Bruno Pacheco, Felipe Nunes, Jefferson Lustosa, Leonardo Furtado, Misael Santana, Sérgio Costa, Silas Lima e Sr. Inaldo Fortes, que muito colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos, pelo apoio prestado ao trabalho, Ariel Cristine, Emanuel Sérvio, José Pires e Solange Lago.

Até aqui o SENHOR nos ajudou.
(1 Samuel 7:12)

RESUMO

O processo de criopreservação pode causar danos aos espermatozoides, dessa forma, buscou-se um antioxidante de origem vegetal (o extrato de jambolão) que amenizasse os efeitos oxidativos que acontecem nos espermatozoides. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da adição do extrato de jambolão (*Syzygium cumini*) ao diluidor TRIS-GEMA sobre a viabilidade espermática pós-descongelação em sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana, visto que as espécies reativas ao oxigênio (ROS) podem ser desencadeadas pelo processo de criopreservação (biotécnica reprodutiva). Nos procedimentos deste estudo, os ejaculados foram coletados uma vez por semana, durante 6 semanas, totalizando 48 ejaculados que foram avaliados, diluídos e submetidos ao processo de criopreservação. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25mL, congelado em máquina TK 3000® e armazenado em nitrogênio líquido. Em cada coleta, utilizou-se o *pool* das amostras, resultado da junção do sêmen de 8 animais da raça Anglo-Nubiana, com idade entre 1,5 e 4 anos (idade reprodutiva), com motilidade total $\geq 80\%$ e vigor ≥ 3 . O extrato do jambolão foi adicionado ao diluidor TRIS-GEMA nas concentrações 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M, tendo o controle recebido apenas o diluidor citado. Posteriormente, as amostras foram descongeladas para as avaliações de motilidade total e vigor espermático, seguido das demais análises. A microscopia de epifluorescência foi usada para avaliar a integridade acrossomal, a integridade da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial. Utilizou-se a microscopia de contraste de fase para avaliar a motilidade total e o vigor espermático no teste de termorresistência (TTR), nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos. A cinética espermática foi analisada por meio do sistema visual óptico integrado (CASA). As patologias espermáticas e a integridade da membrana espermática foram apreciadas pelo teste hiposmótico (HOST) e estimou-se as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Com base nos métodos anteriormente citados, realizou-se as análises estatísticas através do SAS, com as médias sendo obtidas por meio do teste de Duncan a 5% de probabilidade. Por fim, foram obtidos os seguintes resultados: para integridade acrossomal, a concentração de 0,01 μ M com 93,00% sobressaiu-se como melhor resultado; para membrana mitocondrial, a concentração de 0,1 μ M com 85,83% apresentou-se como a mais relevante; quanto à integridade de membrana plasmática, a concentração de 0,001 μ M com 51,00% teve a melhor expressão. Diante dos dados expostos, observou-se não haver diferença estatística significativa, o que leva a concluir que o extrato do jambolão pode ser adicionado ao diluidor TRIS-GEMA.

Palavras-chave: sêmen, criopreservação, antioxidantes, jambolão, viabilidade espermática.

ABSTRACT

The cryopreservation process can cause damage to sperm, thus sought an antioxidant of plant origin (jambolão extract) that mitigates the oxidative effects that happen on spermatozoa. The present research aimed to evaluate the effect of the addition of jambolão extract (*Syzygium cumini*) to the TRIS-GEMA thinner on the post-defrosting perichromism in Anglo-Nubian goat semen, as that oxygen-reactive species (ROS) can be triggered by the cryopreservation process (reproductive biotechnology). In the procedures of this study, the ejaculates were collected once a week for 6 weeks, totaling 48 ejaculates that were evaluated, diluted and submitted to the cryopreservation process. The diluted semen was packaged in 0.25mL straws, frozen in a TK 3000® machine and stored in liquid nitrogen. In each collection, the pool of samples was used, resulting from the junction of the semen of 8 Anglo-Nubian animals, aged between 1.5 and 4 years (reproductive age), with total motility $\geq 80\%$ and vigor ≥ 3 . The jambolan extract was added to the TRIS-GEMA extender at concentrations 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M, the control received only the TRIS-GEMA diluter. Subsequently, the samples were thawed for the evaluation of total motility and sperm vigor, followed by the other analyses. Epifluorescence microscopy was used to assess acrosomal integrity, plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential. Phase contrast microscopy was used to assess total motility and spermatic vigor in the heat resistance test (TTR), at 0, 60, 120 and 180 minutes. Sperm kinetics were analyzed using the integrated visual optical system (CASA). Sperm pathologies and sperm membrane integrity were assessed by the hypoosmotic test (HOST) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were estimated. Based on the previously mentioned methods, statistical analyzes were performed using the SAS, with the averages being obtained using Duncan's test at 5% probability. as for the integrity of the plasma membrane, the concentration of 0.001 μ M with 51.00% had the best expression. In view of the exposed data, it was observed that there was no significant statistical difference that leads to the conclusion that the jambolan extract can be added to the TRIS-GEMA extender.

Key words: sêmen, cryopreservation, antioxidants, jambul, sperm viability.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Motilidade total (%) e vigor espermático (0 – 5), pós-descongelação de sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas do extrato no diluidor TRIS-GEMA.....	33
Tabela 2 - Integridade acrossomal (AC), membrana mitocondrial (MIT) e integridade de membrana plasmática (MP), os valores foram obtidos em porcentagem (%) do sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA pós-descongelação.....	34
Tabela 3 - Teste de termorresistência lento (TTR) na avaliação da motilidade total (%) e vigor espermático (0 – 5), pós-descongelação de sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA.....	35
Tabela 4 - Parâmetros da cinética espermática por meio do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) pós-descongelação de sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA.....	37
Tabela 5 - Valores médios (%) e desvio padrão de sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana pós-descongelados, reativo ao teste hiposmótico (HOST).....	37
Tabela 6 - Parâmetros das patologias espermáticas de sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana. Os valores foram obtidos em porcentagem (%) dos espermatozoides de caprinos com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA pós-descongelação.....	38
Tabela 7 - Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Malondialdeído – MDA) em sêmen caprino com adição do extrato de jambolão em concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA pós-descongelação.....	39

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALH – Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm)

BCF – Frequência de batimentos de cauda (Hz)

CAT – Catalase

CASA – Computer assisted sperm analysis

DCF – Diacetato de carboxifluoresceína

g – Grama

GSH – Glutathiona reduzida

GSH – Px – Glutathiona peroxidase

HOST - Teste hiposmótico

Hz – Hertz

IP – Iodeto de propídio

JC-1 – Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina

Kg – Quilos

LIN – Linearidade (%)

mL – Mililitro

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

μM – Micromol

mg – Miligrama

mOsm/L – Miliosmol/litro

MOP – Motilidade progressiva

MT – Motilidade total

PS – Plasma seminal

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

Sptz – Espermatozóides

STR – Retilinearidade (%)

TTR – Teste de termo resistência

VAP – Velocidade média do percurso ($\mu\text{m/s}$)

VCL – Velocidade curvilínea linear ($\mu\text{m/s}$)

VSL – Velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$)

WOB – Oscilação wobble

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Caprinocultura e biotécnicas reprodutivas.....	12
2.2 Caracterização do sistema genital dos caprinos	13
2.2.1 Composição espermática e espermatogênese.....	14
2.2.2 Coleta e avaliação do sêmen	16
2.3 Criopreservação.....	16
2.4 Estresse oxidativo e antioxidantes.....	17
2.5 Jambolão (<i>Syzygium cumini</i>).....	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO I.....	23
INTRODUÇÃO	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO.....	46

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade difundida em todo território brasileiro, registrando maior concentração do rebanho caprino na região Nordeste do Brasil. Os caprinos são animais de fácil adaptabilidade aos diversos tipos de sistemas de exploração, têm elevada produção de carne, de fácil manejo, sendo uma alternativa viável para os pequenos produtores e da agricultura familiar (MAGALHÃES *et al.*, 2018).

A utilização das biotecnologias reprodutivas auxilia na reprodução desses animais e possibilita o aumento do nível produtivo no rebanho, selecionando as células germinativas com melhor capacidade reprodutiva. Desse modo, existe a importância de se conservar o sêmen com capacidade fecundante por períodos prolongados, para isso adota-se a diluição do esperma e a criopreservação que aparecem como técnicas de suma importância, auxiliando de forma significativa nos programas de melhoramento genético (BOUSSEAU *et al.*, 1998).

Segundo Silva *et al.* (2016), o processo de criopreservação de sêmen induz a aparição de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e o excesso delas causa estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo no sêmen pode afetar o metabolismo, a motilidade, a viabilidade, a integridade do DNA e a integridade da membrana plasmática (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). Nesse sentido, durante o processo de armazenamento do sêmen por longos períodos, torna-se necessário a utilização de diluentes eficazes que forneçam nutrição e proteção às células espermáticas e que evite a perda de enzimas intracelulares que interferem na capacidade fertilizante do espermatozoide (ANDRADE *et al.*, 2010).

No intuito de diminuir as ROS e seus efeitos negativos nas células espermáticas, tem sido utilizado, no processo de armazenamento, substâncias com ações antioxidantes aos diluidores de sêmen. Nesse processo, os antioxidantes naturais têm ganhado amplo espaço. Isso porque o estudo com antioxidantes naturais vem crescendo muito, devido ao grande número de plantas brasileiras com poderes de inibir as reações de oxidação removendo radicais livres das células espermáticas. Dentre essas plantas, temos o jambolão (*Syzygium cumini*), planta originada na Índia, porém adaptada ao Brasil e distribuída por todo o litoral brasileiro e conhecida popularmente como: jamelão, jambolão, jamborão, baguaçu, jalão, João-bolão, manjelão, azeitona-preta, ameixa roxa, baga-de-freira, oliveira, azeitona-roxa, brinco-de-viúva ou guapê (DAS; SARMA, 2009; SILVA *et al.*, 2012; SWAMI *et al.*, 2012).

Este estudo apresenta como problemática a seguinte questão: qual é o efeito da adição do extrato do jambolão ao diluidor de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento em sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana? O jambolão possui componentes físico-químicos

que atuam como antioxidantes, pois retardam a oxidação dos lipídeos, proteínas, DNA e protegem os compostos ou os tecidos de danos provocados por radicais livres (JAGETIA; SHETTY; VIDYASAGAR, 2012). Por isso, é válido avaliar seus efeitos sobre células espermáticas de caprinos, já que possui elementos propícios à proteção das células.

Sendo assim, como objetivo geral, em cima da hipótese de que o extrato do jambolão apresente efeito antioxidante, avaliou-se nesta pesquisa o efeito dessa adição do extrato ao diluidor de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento em sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana. Como objetivos específicos, buscou-se verificar e identificar os efeitos da adição do extrato de jambolão ao diluente de sêmen sobre a viabilidade de sêmen caprino por meio de: análise da integridade da membrana plasmática; análise da integridade acrossomal; análise do potencial de membrana mitocondrial; avaliação da cinética espermática usando um sistema visual óptico integrado (CASA); teste de termorresistência (TTR); teste hiposmótico (HOST), análise das patologias espermáticas e teste de TBARS.

Este trabalho tem como justificativo poder contribuir de forma significativa para os estudos da caprinocultura brasileira, principalmente na área de reprodução animal, avaliando os efeitos da adição de antioxidantes oriundos de espécies vegetais. Além disso, este estudo visa comercializar um diluidor com adição de antioxidantes extraídos do jambolão (*Syzygium cumini*) ao sêmen caprino com custo-benefício mais acessível aos pequenos produtores rurais, pois busca meios de prevenir o aparecimento de espécies reativas ao oxigênio e danos causados aos espermatozoides.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura e biotécnicas reprodutivas

A caprinocultura é uma atividade de grande interesse econômico, sendo essa um objeto de estudos em todo o mundo (RESENDE *et al.*, 2010). Outrossim, essa atividade tem um grande potencial de desenvolvimento no território brasileiro, em razão da sua adaptação às características ambientais do país, em especial nas regiões Sul e Nordeste (MONTEIRO; BRISOLA; VIEIRA FILHO, 2021).

No ano de 2019, o rebanho caprino atingiu 11,3 milhões de cabeças, tendo um crescimento de 5,3%, se comparado ao ano de 2018. A região Nordeste foi responsável por 94,6% do total de caprinos, sendo o estado da Bahia o principal produtor de caprinos, com 31% do rebanho (CNA, 2020).

Com relação à caprinocultura, precisa-se de testes para avaliar a capacidade reprodutiva de caprinos em geral, particularmente àqueles que possuem uma genética excelente e uma boa capacidade reprodutiva (CASTELO *et al.*, 2008).

A respeito das biotécnicas reprodutivas, segundo comenta Nunes (2010, p. 17), pode-se considerar “qualquer técnica que utilize organismos vivos ou suas partes, para fazer ou modificar produtos, melhorar plantas ou animais ou desenvolver microrganismos para usos específicos”.

A inseminação artificial (IA) é a biotécnica mais utilizada no mundo para fins reprodutivos, sendo a mais antiga. A IA é um ótimo método para seleção de sêmen com bom valor zootécnico e genético. Essa técnica proporciona a seleção de boa qualidade genética, além de evitar doenças transmissíveis, como ocorre durante a monta natural, pois permite selecionar animais com boa qualidade de carne (animais de corte) e com boa produção leiteira (NUNES, 2010).

Essa técnica, porém, apresenta desvantagens, como a diminuição da variabilidade genética, que pode levar à ocorrência da seleção artificial de genes defeituosos que se propagam durante a utilização da IA. Esses genes defeituosos possuem susceptibilidade para desencadear o aparecimento de doenças infecciosas no rebanho. Contudo, ainda é uma das técnicas mais viáveis de reprodução (NUNES, 2010). Além da inseminação artificial, outras biotécnicas reprodutivas aplicadas à reprodução animal podem ser citadas, como a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIV).

2.2 Caracterização do sistema genital dos caprinos

Conforme o CBRA (2013), o sistema genital dos machos é composto por escroto, testículos, epidídimos, glândulas anexas e pênis. O escroto dos caprinos é revestido por pelos, podendo ser bipartido ou não. O escroto está relacionado à regulação térmica, pois possui grande quantidade de glândulas sudoríparas na sua superfície e na região da bipartição, ambos atuam na vascularização escrotal, facilitando a termorregulação testicular.

Os testículos dos caprinos apresentam posição vertical, são situados paralelamente entre si e possuem o formato globoso. Os epidídimos são compostos por cabeça, corpo e cauda; as cabeças situam-se na extremidade superior do testículo; o corpo situa-se na região pósteromedial; as caudas localizam-se na extremidade inferior (CBRA, 2013).

Os testículos possuem a função de produzir os espermatozoides, que são as células sexuais que carregam as características hereditárias, repassando essas características à prole dos

caprinos, enquanto os epidídimos possuem a função de armazenamento e transporte das células sexuais (CBRA, 2013). Já as glândulas acessórias, possuem a função de produzir nutrientes para os espermatozoides e disponibilizar líquido para permitir a fluidez dessas células. O pênis, por sua vez, é responsável pelo ato da reprodução, o acasalamento de um macho e de uma fêmea. É através dele que os espermatozoides são transferidos para o órgão genital da fêmea (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os caprinos apresentam o pênis do tipo sigmoide fibroelástico que se exterioriza no momento do acasalamento, a fim de que o macho possa penetrar a fêmea com mais facilidade. O pênis dos caprinos apresenta glândula com apêndice vermiforme que serve para aumentar a superfície de contato do ejaculado com interior do órgão genital feminino para que ocorra a fecundação (CBRA, 2013).

Segundo Hafez e Hafez (2004) a puberdade nos caprinos ocorre quando esses animais estão aptos a se reproduzirem, ou seja, quando eles iniciam a gametogênese, eles começam a produzir as células sexuais e posteriormente hábitos sexuais. As gônadas sexuais iniciam o seu desenvolvimento e assumem as suas funções de gametogênese.

O início da puberdade, conforme Hafez e Hafez (2004), se dá a partir de fatores externos, como estações do ano, raça e alimentação, e fatores internos, diretamente ligados à produção de hormônios, por exemplo, a testosterona que induz a espermatogênese e conseqüentemente o comportamento sexual masculino. Os machos entram na puberdade aproximadamente entre 4 e 6 meses de idade. Esse período indica que eles já estão aptos a se reproduzirem praticando a monta natural, já nas fêmeas a puberdade ocorre entre 5 e 7 meses de idade.

2.2.1 Composição espermática e espermatogênese

Com relação ao plasma seminal (PS), este consiste na mistura de secreções das glândulas do trato reprodutivo masculino, próstata, vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e epidídimo. As principais funções do PS são a fluidez da motilidade e a maturação final das células espermáticas (NUNES, 2010). O plasma seminal caprino possui a seguinte composição bioquímica: frutose (20-40mg/dL), sorbitol (26-120mg/dL), ácido cítrico (36-325mg/dL), inositol (380-610mg/dL), ergotionina (6-30mg/dL), glicerofosfatidilcolina (110-240mg/dL), sódio (122nmol/L), potássio (16nmol/L) e cloretos (96nmol/L) (MORANI; RODRIGUES; RONCOLETTA, 2018).

Em relação à fisiologia da membrana plasmática, o pH dos espermatozoides é regulado por tampões e bombas iônicas. Os tampões intracelulares suprem grande aptidão de

tamponamento. Quando o hidrogênio (H^+) está presente no interior do espermatozoide, ele é tamponado por fosfatos orgânicos, proteínas, peptídeos e aminoácidos. As bombas iônicas são $Na^+ - H^+$ e $Cl^- - HCO_3^-$ (KLEIN, 2014).

Já com relação à espermatogênese, consiste em um processo de diferenciação celular prolongado, em que ocorre a formação dos gametas masculinos, que acontece nos tubos seminíferos, a partir das espermatogônias, que são células indiferenciadas. Isso ocorre por meio das células troncos que sofrem diversas divisões mitóticas, uma divisão meiótica e várias mudanças citológicas, dando origem aos espermatozoides (MORANI; RODRIGUES; RONCOLETTA, 2018).

A espermatogênese pode ser subdividida em três etapas a seguir: espermatocitogênese, espermiogênese e espermição. A começar pela espermatocitogênese, que compreende a primeira etapa, em que ocorrem os estágios de espermatogônias e espermatócitos incluindo o desenvolvimento das espermátides alongadas. A segunda etapa, nomeada de espermiogênese, compreende alterações celulares morfológicas sucessivas, como a condensação da cromatina do núcleo e da estruturação do acrossomo e do flagelo. A espermiogênese começa a partir da espermátide alongada e conclui-se com o princípio da etapa da espermição. Essa, por sua vez, compreende a soltura dos espermatozoides que vão em direção a luz dos túbulos seminíferos (MORANI; RODRIGUES; RONCOLETTA, 2018).

A espermiogênese concerne as seguintes alterações morfológicas: o desenvolvimento do acrossoma, a partir das vesículas de Golgi, e o flagelo que é constituído a partir de um axonema do centríolo distal e envolto por periaxonemal. Na peça intermediária, ocorre a expansão e disposição da mitocôndria circundando o axonema numa bainha helicoidal, que gera um espermatozoide com um núcleo compactado e a desapareição do citoplasma (NUNES, 2010).

A análise dos caracteres do sêmen é um parâmetro complementar do exame andrológico e, quando associado aos resultados do exame pertinente ao sistema genital, trata-se de um parâmetro de grande significado na avaliação da capacidade reprodutiva de um animal (HILL *et al.*, 1959; GROVE, 1977).

Com relação as características do sêmen, deve-se seguir alguns critérios de volume, cor, aspecto, turbilhonamento ou movimento em massa, motilidade, vigor espermático, concentração e defeitos maiores e menores que estão relacionados à morfologia espermática (CBRA, 2013).

2.2.2 Coleta e avaliação do sêmen

Segundo o CBRA (2013), para a colheita do sêmen existem técnicas apropriadas. Dentre as metodologias existentes, há o método de coleta através da vagina artificial, que é um procedimento utilizado para a obtenção de sêmen de machos aptos a se reproduzirem. A vagina artificial é utilizada com água aquecida em seu interior para aparentar ser uma vagina verdadeira, podendo usar uma cabra no cio para simular ao bode uma monta natural, mas sem que haja a penetração do pênis no aparelho reprodutor da fêmea.

Para o reprodutor estar apto ao fornecimento de sêmen, é necessária uma avaliação sanitária geral e reprodutiva do indivíduo, analisando a saúde geral do caprino e observando problemas animal externamente, como os aprumos, a sua elegância, o seu andar, entre outros fatores externos. Além disso, fazer a avaliação da saúde genética do animal para analisar se esse indivíduo possui uma boa genética e fatores que a comprometam, com atenção para a saúde do sistema reprodutivo do caprino e investigação de possíveis doenças reprodutivas que comprometam o animal (CBRA, 2013).

Em relação às características do sêmen, deve-se seguir alguns critérios, como: volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e os defeitos maiores e menores que estão relacionados à morfologia espermática. Com a utilização do recurso da vagina artificial, o ejaculado dos caprinos tem entre 0,5 e 1,5mL de volume; a cor pode ser branca ou amarelo-marfim; o movimento de massa precisa ser maior ou igual a 4, e a motilidade espermática precisa ser de aproximadamente 80% (CBRA, 2013).

2.3 Criopreservação

Segundo Castelo *et al.* (2008), na caprinocultura precisa-se de testes para avaliar a capacidade reprodutiva de caprinos em geral, ainda mais aqueles que possuem uma genética excelente e uma boa capacidade reprodutiva. A criopreservação de sêmen é uma das biotecnologias reprodutivas que tem como finalidade conservar células biológicas em botijões criogênicos contendo nitrogênio líquido a -196°C com duração indeterminada.

A criopreservação é uma excelente forma de evitar gastos com caprinos reprodutores, pois para a criação do reprodutor é necessário gastos com sua alimentação, manutenção de forma geral, entre outros pontos negativos. Essa biotecnologia reprodutiva evita a transmissão de possíveis patógenos transferidos de um animal a outro por monta natural (CASTELO *et al.*, 2008).

A técnica de criopreservação seminal exige conhecimento que abrange as características morfológicas, fisiológicas e da própria técnica em si. Por esse motivo, é necessário cuidado com o processo de descongelação, pois ele pode ocasionar danos à célula espermática (PURDY, 2006).

Segundo Gibbons (2002), os diluidores são substâncias utilizadas para aumentar a conservação das células espermáticas, fornecendo a essas células crioprotetores externos, como a gema de ovo, fontes de energia, como a frutose e a glicose, entre outros.

O processo de criopreservação facilita ainda a aparição de ROS, que são espécies reativas ao oxigênio (ROS), causadoras do desequilíbrio eletrolítico, ocasionando o estresse oxidativo dos espermatozoides, que são injúrias causadas por meio de radicais livres nas células espermáticas (BARROS, 2007).

Com relação à integridade das membranas dos espermatozoides, estas podem ser analisadas a partir das avaliações das funções espermáticas e da morfologia espermática por meio de métodos de “coloração”, como citometria de fluxo ou corantes fluorescentes (sondas fluorescentes) que são métodos mais rigorosos quanto à integridade estrutural espermática (ARRUDA *et al.*, 2011).

Na fisiologia da membrana plasmática, enfatiza-se que o pH dos espermatozoides é regulado por tampões e bombas iônicas, em que os tampões intracelulares suprem a condição de manter o tamponamento do meio celular. Quando o hidrogênio (H^+) está presente no interior do espermatozoide, ele é tamponado por fosfatos orgânicos, proteínas, peptídeos e aminoácidos, já as bombas iônicas são $Na^+ - H^+$ e $Cl^- - HCO_3^-$ (KLEIN, 2014). Porém, mediante o processo de criopreservação, é necessário que os diluidores sejam acrescidos de substâncias de tamponamento, por exemplo, o TRIS, que é uma substância que ajuda a estabilizar a membrana plasmática, atuando na homeostase da célula espermática (GIBBONS, 2002).

2.4 Estresse oxidativo e antioxidantes

Conforme Andrade *et al.* (2010), em situações fisiológicas celulares normais, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os antioxidantes enzimáticos acham-se em condição de equilíbrio. Todavia, quando esse equilíbrio é enfraquecido e ocorre uma produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasiona o estresse oxidativo.

Segundo Andrade *et al.* (2010, p.79), “o estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são também comumente denominadas radicais livres”.

O mecanismo do estresse oxidativo acontece da seguinte forma: ocorre um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante composto pelo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C), que são os eliminadores dos radicais livres, em relação aos geradores das ROS. Assim, enfatiza-se a criopreservação, a qual, durante a técnica, pode resultar em estresse oxidativo, provocando peroxidação lipídica, danos às proteínas, danos às membranas e danos ao DNA nuclear e mitocondrial, o que ocasiona injúrias à célula espermática e resulta em infertilidade (SIKKA, 2004).

Dentre as espécies reativas de oxigênio (ROS), destacam-se o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) (SILVA; GUERRA, 2012). Segundo Menegassi e Barcellos (2015, p.144), o ânion superóxido (O_2^-) pode ser sintetizado a partir da atividade mitocondrial (ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) desempenha o papel biológico de combater agentes que podem provocar doenças e atua também na sinalização celular, através da oxidação de resíduos de cisteína nas proteínas.

Ainda conforme Menegassi e Barcellos (2015, p.146), “a reação de Fenton é o principal mecanismo de decomposição do H_2O_2 , que também pode reagir com o superóxido pela reação de Haber-Weiss, também catalisada por metais de transição (Fe^{3+})”. O radical hidroxil ($\bullet OH$) interage com as moléculas biológicas, destacando-se: aminoácidos, lipídios, carboidratos, DNA e ácidos orgânicos. O radical hidroxil ($\bullet OH$) é o radical livre mais deletério a níveis celulares.

Diante da possibilidade de estresse oxidativo, os antioxidantes possuem um importante papel, pois podem ser classificados em enzimáticos, não enzimáticos sintéticos e naturais. De acordo com Andrade *et al.* (2010), na reprodução animal, merecem ênfase os seguintes antioxidantes: o tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C), pois atuam exatamente na reprodução.

Conforme Menon *et al.* (2012), na criopreservação do sêmen caprino com adição de ácido ascórbico (vitamina C) sucede-se melhora na qualidade seminal com relação à integridade das membranas, motilidade e vigor espermático. Já neste trabalho, buscou-se avaliar o efeito da adição do extrato de jambolão ao diluidor de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento, compreendendo-se o jambolão como um significativo antioxidante.

O metabolismo oxidativo da célula espermática desenvolve a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e como consequência pode ocasionar a perda na qualidade da célula espermática durante a criopreservação (NUNES, 2010).

O sistema antioxidante, que pode ser entendido pela baixa glutatona (GSH), glutatona peroxidase (GSH - Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), é descrito como um sistema de defesa contra a lipoperoxidação do sêmen. A falta de compostos antioxidantes, que são essenciais para combater a ação das espécies reativas de oxigênio (ROS), expõe as células espermáticas aos danos causados no processo de congelamento (NUNES, 2010).

2.5 Jambolão (*Syzygium cumini*)

O jambolão, objeto de estudo nesta pesquisa, é classificado cientificamente como (*Syzygium cumini*), no entanto é conhecido popularmente como: azeitona roxa, azeitona-doce, azeitona preta, cereja, jalão, jambolão baguaçu, joão-bolão, manjelão, baga-de-freira, oliveira, azeitona-roxa, brinco-de-viúva e jamelão (RUFINO, 2008). Tem suas origens na Índia, porém adaptado ao Brasil e distribuído por todo território do litoral brasileiro. É uma planta que se adapta bem a qualquer tipo de solo, inclusive alguns impróprios para o cultivo de outras plantas frutíferas e comerciais (DONADIO, 2007).

Seu fruto é pequeno, possui uma forma elipsoide, possuindo coloração roxa escura quando está maduro, e tem a pele fina, brilhante e aderente. A polpa do jambolão também possui coloração roxa, carnosa, e tem uma semente unida e grande; a planta geralmente fica carregada de frutos nas épocas de safra. O jambolão possui ainda vários componentes importantes, como vitaminas, minerais, água e pigmentos antociânicos, que são pigmentos que possuem compostos polifenólicos, estão relacionados aos flavonoides e possuem propriedades biológicas com ações antioxidantes que combatem as espécies reativas ao oxigênio (SÁ, 2008).

Dentre as características físico-químicas que estão presentes no mesocarpo do jambolão, podem ser citadas, por exemplo, as petunidinas, antocianinas, flavonoides e carotenoides, que são considerados polifenóis, malvidina-diglicosídeos, delfinidinas (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011).

Esses componentes físico-químicos que estão presentes no mesocarpo do jambolão podem atuar com ação antioxidante, combatendo o estresse oxidativo, retardando a oxidação das proteínas, dos lipídeos, do DNA e protegendo as células germinativas dos danos causados pela ação dos radicais livres (JAGETIA; SHETTY; VIDYASAGAR, 2012).

Ainda sobre o assunto, por fim, é válido acrescentar que o jambolão tem suas sementes usadas para a produção de substâncias medicinais tradicionais, que têm ótimas propriedades usadas no tratamento da diabetes (RAUF *et al.*, 2021). As sementes do jambolão têm atividade antioxidante superior até mesmo à da polpa e à casca da fruta, podendo esta ser aproveitada na

formulação de extratos antioxidantes (VIZZOTTO; FETTER, 2009), como o que foi utilizado nesta pesquisa.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, E. R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, n.2, p.79-85, 2010.

ARRUDA, R. P. *et al.* Métodos de avaliação da morfologia espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, p. 145-151, 2011.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BOUSSEAU, S. *et al.* Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.l.], v. 2, p. 67-75, 2008.

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

CNA. **Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) 2019**: crescimento de todas as atividades englobadas na pesquisa em relação a 2018. Comunicado Técnico. Edição 30/2020, 20 de outubro, Brasil. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/boletins/pesquisa-pecuaria-municipal-ppm-2019-crescimento-de-todas-as-atividades-englobadas-na-pesquisa-em-relacao-a-2018>. Acesso em: dez. 2021.

DAS, S.; SARMA, G. Study Of The Hepatoprotective Activity Of The Ethanolic Extract Of The Pulp Of Eugenia Jambolana (Jamun) In Albino Rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 3, p.1466-1474, 2009.

DONADIO, L. C. **Dicionário das frutas**. Jaboticabal, 2007. 300 p.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v.126, p.1571-1578, 2011.

GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, [S.l.], v.4, n.16, p.24-32, 2002.

- GROVE, D. **Diagnóstico andrológico ambulante em bovinos em países cálidos**. Eschborn, s. ed. 1977. 286 p.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7.ed., Barueri-SP: Manole, p. 513, 2004.
- HILL, H. J. *et al.* Theory of evaluating bulls as to breeding Soundness. **Journal of the American Veterinary Association**. Chicago, v. 135, n. 61, p. 318-20, 1959.
- JAGETIA, G.C.; SHETTY, P.C.; VIDYASAGAR, M. S. Inhibition of Radiation-Induced DNA Damage by Jamun, *Syzygium cumini*, in the Cultured Splenocytes of Mice Exposed to Different Doses of γ -Radiation. **Integrative Cancer Therapies**, v.11, p. 141 –153, 2012.
- KLEIN, B.G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, 1599 p.
- MAGALHÃES, K. A.; MARTINS, E. C.; HOLANDA FILHO, Z. F.; LUCENA, C. C. Pesquisa Pecuária Municipal 2017: efetivo dos rebanhos caprinos e ovinos. Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E). **Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**, n. 5, p. 5-12, out. 2018.
- MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J. **Aspectos reprodutivos do touro: teoria e prática**. Guaíba: Agrolivros, 2015, 280 p.
- MENON, A. *et al.* Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on Boer goat semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1-6, 2012.
- MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; RONCOLETTA, M. **Manual de reprodução nas espécies domésticas**. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2018, 232 p.
- MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M. V.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, Brasília, Rio de Janeiro, 2021.
- NUNES, J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes. **Tecnograf**, Fortaleza, CE. 208p, 2010.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RAUF, A. *et al.* Phytochemical composition, *in vitro* urease, α -glucosidase and phosphodiesterase inhibitory potency of *Syzygium cumini* (Jamun) fruits. **South African Journal of Botany**, v. 143, n. 00, p.1-4, 2021.
- RESENDE, K. T. *et al.* Progresso científico em pequenos ruminantes na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 369-375, 2010.
- RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. 2008. 263 f. Tese (Doutorado) – Agronomia Tropical - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2008.

SÁ, A. P. C. S. **Potencial Antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (*Syzygium cumini*, L. Skeels).** 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia. Seropédica-RJ, 2008.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproduction technology. **Journal Andrology**, v.25, p.5-18, 2004.

SILVA, S. N. *et al.* The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 102-108, 2012.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.111, p.143-149, 2012.

SILVA, E. C. B. *et al.* High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat sêmen. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.5, p.1237-1243, 2016.

SWAMI, S. B. *et al.* Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1100-1117, 2012.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. Jambolão: o poderoso antioxidante. **Revista cultivar**, Pelotas-RS, 2009. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/noticias/artigo-jambolao-o-poderoso-antioxidante>. Acesso em: 27 dez. 2021.

CAPÍTULO I

Efeito da adição do extrato do jambolão (*Syzygium cumini*) ao diluidor TRIS-GEMA sobre a viabilidade espermática de sêmen caprino

Effect of the addition of jambolon extract (*Syzygium cumini*) to the TRIS-GEMA thinner on the perpetuity viability of goat semen

Amanda Priscila Maia Souza¹ José Adalmir Torres de Souza²

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição do extrato de jambolão (*Syzygium cumini*) ao diluidor de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento em sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana. Os ejaculados foram coletados uma vez por semana, durante 6 semanas, totalizando 48 ejaculados que foram avaliados, diluídos e submetidos ao processo de criopreservação. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25mL e congelado em máquina TK 3000® e armazenado em nitrogênio líquido. Em cada coleta, utilizou-se o *pool*, resultado da junção do sêmen de 8 animais, com idade entre 1,5 e 4 anos de idade, com motilidade total $\geq 80\%$ e vigor espermático ≥ 3 . O extrato do jambolão foi adicionado ao diluidor TRIS-GEMA nas concentrações 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M, tendo o controle recebido apenas o diluidor citado. Após 2 dias, as amostras foram descongeladas para avaliação da motilidade total e vigor espermático, seguido das demais análises. Expressou-se os resultados a seguir: para a integridade acrossomal, a concentração de 0,01 μ M (93,00%) sobressaiu-se como melhor resultado; para a membrana mitocondrial, a concentração de 0,1 μ M (85,83%) apresentou-se como a mais relevante; quanto à integridade de membrana plasmática, a concentração de 0,001 μ M (51,00%) teve a melhor expressão. Concluiu-se que não houve diferença estatística significativa.

Palavras-chave: sêmen, criopreservação, antioxidantes, jambolão, viabilidade espermática.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of jambolão extract (*Syzygium cumini*) semen thinner on post-defrosting perchronism in Anglo-Nubiana goat semen. Ejaculates were collected once a week for 6 weeks, totaling 48 ejaculates evaluated, diluted and submitted to the cryopreservation process. The diluted semen was filled in 0.25mL vanes and frozen in a TK 3000 machine® and stored in liquid nitrogen. In each collection, the pool was used, resulting from the semen junction of 8 animals, aged between 1.5 and 4 years, with total motility $\geq 80\%$ and spermatic vigor ≥ 3 . Jambolon extract was added to the TRIS-GEMA thinner at the concentrations of 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M, the control received only the TRIS-GEMA thinner. After 2 days, the samples were thawed to evaluate total motility and spermatic vigor, followed by other analyses. The following results were expressed: for acrosome integrity, the concentration of 0,01 μ M (93,00%) emerged as a better result; for the mitochondrial membrane, the concentration of 0,1 μ M (85,83%) as the most relevant; plasma membrane integrity, the concentration of plasma membranes 0,001 μ M (51,00%) had the best expression. It was concluded that there was no statistically significant difference.

Key words: semen, cryopreservation, antioxidants, jambul, sperm viability.

¹ - Mestranda do curso de Ciência Animal; Universidade Federal do Piauí; *Campus* Ministro Petrônio Portella; Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária; Teresina; Piauí e Brasil. E-mail: amandamaia@ufpi.edu.br.

² - Orientador e Dr. em Reprodução Animal; Universidade Federal do Piauí; *Campus* Ministro Petrônio Portella; Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária; Teresina; Piauí e Brasil. E-mail: adalmir@ufpi.edu.br.

INTRODUÇÃO

Este trabalho é direcionado para os problemas oriundos do processo de criopreservação de sêmen caprino, embasado na condição de que a caprinocultura é uma atividade difundida em todo território brasileiro, mas com maior concentração do rebanho caprino na região Nordeste do Brasil. Os caprinos são animais de fácil adaptabilidade aos diversos tipos de sistemas de exploração, têm elevada produção de carne, de fácil manejo, sendo uma alternativa viável para aqueles que compõem o perfil fundiário que são os pequenos produtores e da agricultura familiar (MAGALHÃES *et al.*, 2018).

A evolução das técnicas e necessidades de melhorias das raças de caprinos levou à utilização de biotecnologias reprodutivas que auxiliem na reprodução desses animais, porque possibilita o aumento do nível produtivo no rebanho, selecionando as células germinativas com melhor capacidade reprodutiva. Desse modo, existe a importância de se conservar o sêmen caprino com capacidade fecundante por períodos prolongados, para isso adota-se a diluição do sêmen e a criopreservação que aparecem como técnicas de suma importância, auxiliando de forma significativa nos programas de melhoramento genético dos animais em foco (BOUSSEAU *et al.*, 1998).

Segundo Silva *et al.* (2016), o processo de criopreservação de sêmen facilita a aparição de espécies reativas ao oxigênio (ROS), e o excesso delas causa o estresse oxidativo dos espermatozoides. O estresse oxidativo no sêmen pode afetar o metabolismo de energia, motilidade, viabilidade, integridade do DNA e a integridade da membrana plasmática (MENEGASSI; BARCELLOS, 2015). No processo de armazenamento do sêmen por longos períodos, torna-se necessário a utilização de diluentes eficazes que forneçam nutrição e proteção às células espermáticas e que evite a perda, quantitativa ou qualitativa, de enzimas intracelulares, que interferem na capacidade fertilizante do espermatozoide (ANDRADE *et al.*, 2010).

No intuito de diminuir as ROS e seus efeitos negativos nas células espermáticas, tem sido utilizado, no processo de armazenamento, substâncias com poderes antioxidantes aos diluidores de sêmen. Nesse processo, os antioxidantes naturais têm ganhado amplo espaço. Isso porque o estudo com antioxidantes naturais vem crescendo muito, devido ao grande número de plantas brasileiras com poderes de inibir as reações de oxidação removendo radicais livres das células espermáticas. Dentre essas plantas, temos a (*Syzygium cumini*), planta originada na Índia, porém adaptada ao Brasil e distribuída por todo o litoral brasileiro e conhecida popularmente como: jamelão, jambolão, jamborão, baguaçu, jalão, joão-bolão, manjelão,

azeitona-preta, ameixa roxa, baga-de-freira, oliveira, azeitona-roxa, brinco-de-viúva ou guapê (DAS; SARMA, 2009; SILVA et al., 2012; SWAMI et al., 2012).

Neste estudo, como objetivo geral, avaliou-se o efeito da adição do extrato de jambolão ao diluidor de sêmen sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento em sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana. Como objetivos específicos, buscou-se verificar e identificar os efeitos da adição do extrato de jambolão ao diluente de sêmen sobre a viabilidade de sêmen caprino por meio de: análise da integridade da membrana plasmática; análise da integridade acrossomal; análise do potencial de membrana mitocondrial; avaliação da cinética espermática usando um sistema visual óptico integrado (CASA); teste de termorresistência (TTR); teste hiposmótico (HOST), análise das patologias espermáticas e teste de TBARS.

Ressalta-se que sobre a caprinocultura precisa-se de exames para avaliar a capacidade reprodutiva de caprinos em geral, sobretudo aqueles que possuem uma genética excelente e uma boa capacidade reprodutiva, conforme reporta Castelo *et al.* (2008).

MATERIAIS E MÉTODOS

Ética em experimentação animal

Os procedimentos descritos na presente pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o protocolo de N° 645/2020 e está de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008.

Local do experimento

O experimento teve duas fases, uma na fazenda Sucupira, município de David Caldas, situado nas coordenadas geográficas de latitude 4° 44' 32'' S e longitude 42° 55' 04'' W, no estado do Piauí (Google Maps), e a outra no Setor de Reprodução Animal do Hospital Veterinário Universitário do *Campus* Ministro Petrônio Portella, no município de Teresina, Piauí, Brasil.

Animais e coleta de sêmen

Foram utilizados oito caprinos (*Capra hircus*) machos da raça Anglo-Nubiana, de 1,5 a 4 anos de idade, escore de condição corporal 3 a 4, na escala 1 a 5, e com um histórico de fertilidade satisfatório. Foi realizada a avaliação quanto à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e à qualidade espermática. Durante o experimento, os caprinos tiveram acesso a piquetes de capim, leguminosa, sal mineral e água à vontade.

As coletas de sêmen foram realizadas uma vez por semana durante seis semanas nos meses de março a maio, totalizando 48 ejaculados. Foram feitas as coletas com o auxílio de uma fêmea em estro, uma vagina artificial e a utilização de um tubo de ensaio graduado de 50mL, estéril e devidamente protegido com uma folha de papel alumínio para evitar a exposição do sêmen à luz. Os oito ejaculados foram colocados em banho-maria a 37°C e avaliados imediatamente, logo após a coleta e separadamente quanto a cor, aspecto, volume (mL), turbilhonamento (0-5), motilidade total (%) e vigor espermático (0-5) em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), de acordo com as normas exigidas pelo CBRA (2013).

A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de 1:400, em formol salino para obter a concentração espermática por mL. Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 , motilidade total $\geq 80\%$, vigor ≥ 3 , concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$ foram utilizados neste estudo. Quando aprovadas, as amostras dos oito ejaculados foram misturadas para formação de um *pool*, objetivando aumentar o volume do sêmen e eliminar a variabilidade individual entre as amostras estudadas. Após a formação do *pool*, este foi mantido a 37°C em banho-maria antes dos procedimentos experimentais. Em seguida, o *pool* foi diluído em TRIS-GEMA e dividido entre os cinco tratamentos. Em seguida, para posterior análise de patologias espermáticas, uma alíquota de 5 μ L do *pool* foi retirada e colocada no eppendorf de 2mL, contendo 200 μ L de formol salino.

Substância teste (jambolão)

A substância teste utilizada para esta pesquisa foi o extrato do jambolão (*Syzygium cumini*) que foi dissolvido em água destilada e metanol na proporção de 1:1, depois foi agitado com agitador magnético, para separar o mesocarpo do caroço. Logo em seguida, a substância foi filtrada e passou pelo processo de rotoevaporação a 60°C, a fim de que não ocorresse decomposição do material orgânico. Por conseguinte, as concentrações definidas no teste de viabilidade celular foram: 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M e 0,001 μ M, com respectivos volumes: 280 μ L, 28 μ L, 2,8 μ L e 0,28 μ L.

O diluidor TRIS-MÃE (solução mãe) foi constituído a partir de: 12,11g de TRIS; 6,8g de ácido cítrico; 2,5g de frutose; 2,5g de lactose; 0,7mL de gentamicina (44mg/mL); 68mL de água destilada; 32mL de glicerol. A partir da solução mãe, foi preparado o TRIS de uso imediato

(TRIS-GEMA), o qual é composto por 60% de água destilada, 20% de gema de ovo e 20% da solução mãe (osmolaridade de ~350 mOsm/kg e pH 7,0).

O TRIS de uso imediato (TRIS-GEMA) foi utilizado para diluição dos tratamentos e criopreservação do sêmen, ao passo que o diluidor TRIS-GEMA, sem adição da substância teste, foi considerado como o tratamento controle. A substância teste jambolão (*Syzygium cumini*) foi diluída em água destilada para a obtenção das seguintes concentrações: 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M e 0,001 μ M, acrescentadas ao diluidor TRIS-GEMA para dar origem aos tratamentos testes: tratamento 1, tratamento 2, tratamento 3, tratamento 4 e tratamento C, de modo respectivo. Como tratamento controle, foi utilizado TRIS-GEMA conforme metodologia aplicada por Dell Valle (2013) e adaptada para esta pesquisa.

Criopreservação do sêmen

O sêmen depois de diluído foi envasado em palheta de 0,25mL (50 X 106 espermatozoides viáveis por palheta). Em seguida, procedeu-se a congelação em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda, Uberaba, Brasil), na curva lenta de congelação para caprinos (-0,25°C/min, de 25°C a 5°C e -10°C/min, de 5°C a -120°C) e, ao atingir -120°C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijão com nitrogênio líquido.

A duração do tempo de equilíbrio na temperatura de 5°C foi de 1 hora no mínimo. Passado o prazo mínimo de uma semana (7 dias) de armazenamento, as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 60 segundos e avaliadas quanto à viabilidade celular (motilidade e vigor espermático), integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática, função mitocondrial, teste de termorresistência (TTR), cinética espermática (CASA), patologias espermáticas e teste hiposmótico (HOST). Realizou-se também a reação de peroxidação lipídica utilizando o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Análise da integridade da membrana plasmática

A análise da integridade da membrana plasmática ocorreu no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA). Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), em que alíquotas de 50 μ L de sêmen foram expelidas em microtubo aquecido

e, após descongeladas a 37°C durante 60 minutos, diluídas em 150µL de TRIS (7,210g de TRIS, 4,048g de ácido cítrico, 2,976g de frutose e 200mL de água destilada) contendo 5µL de DCF (0,46mg/mL em DMSO) e 20µL de IP (0,5mg/mL em PBS). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a 37°C na ausência da luz para que ocorresse a interação das sondas com as estruturas das células espermáticas. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão). Em seguida, retirou-se uma alíquota de 10µL de cada amostra e colocou-se sobre lâmina limpa, cobriu-se com lamínula, depois utilizou-se óleo de imersão e objetiva com aumento de 400x, com o uso do filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando apresentaram-se corados em verde e com membrana danificada quando corados em vermelho.

Análise da integridade acrossomal

A análise da integridade acrossomal ocorreu no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA). Para a avaliação da integridade acrossomal, foi utilizado o corante isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (aglutinina de amendoim) (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), em que uma alíquota de 20µL da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e adicionada a 480µL de solução de fosfato tamponada (PBS Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) para obter a concentração final de 100µg/mL. Alíquotas de 20µL dessa solução foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz.

Logo após à incubação, as lâminas foram banhadas duas vezes em PBS refrigerado a 4°C e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente, antes da avaliação, 5µL de meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg de azida sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com lamínula.

Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossoma intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou como acrossoma reagido, quando apresentaram uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentaram fluorescência verde em toda região da cabeça.

Análise do potencial de membrana mitocondrial

Realizou-se análise do potencial de membrana mitocondrial no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA). A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1. Para isso, alíquotas de 50 μ L de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150 μ L de TRIS contendo 20 μ L de JC-1 (0,15mM em DMSO), homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a 37°C na ausência de luz. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão). Retirou-se 10 μ L de cada amostra, colocou-se sobre a lâmina e cobriu-se com lamínula, com auxílio de objetiva com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, utilizando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, e as coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Avaliação da cinética espermática usando sistema visual óptico integrado

A cinética espermática foi avaliada por meio de um sistema analisador de espermatozoide auxiliado por computador (Computer-Assisted Sperm Analysis-CASA). Essa análise ocorreu no Laboratório de Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará (UECE). O CASA consiste em um sistema de microscopia óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação estroboscópica, uma fase quente a 37°C e uma câmera de vídeo (Basler Visão Technologie TM A312FC, Ahrensburg, Alemanha). É um computador com um analisador de esperma Classe TM software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha).

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 60 segundos e expelidas em microtubos contendo 800 μ L de TRIS. Logo depois, as amostras foram homogeneizadas e uma alíquota de 10 μ L referente a cada tratamento foi pipetada sobre a câmara de Makler e coberta com um tipo de lamínula especial, aquecida em placa aquecedora acoplada ao microscópio de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), que é ligado a uma câmera de vídeo (Basler Visão Technologie TM A312FC, Ahrensburg, Alemanha).

Para as análises, foram usadas as objetivas de 1000x. As variáveis cinéticas dos espermatozoides foram avaliadas após a diluição das amostras em meio TRIS (v/v), posteriormente incubadas em banho-maria a 37°C durante 5 minutos. As variáveis avaliadas foram: motilidade progressiva (MP- μ m/s), velocidade curvilínea (VCL - μ m/s), velocidade em

linha reta (VSL – $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH – μm), índice de oscilação Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide analisado.

Teste de Termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência lento ocorreu no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA). Esse teste foi realizado de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013), o qual consiste em avaliar a longevidade dos espermatozoides das amostras de sêmen descongeladas e incubados em banho-maria a 37°C por um período de 3 horas. As amostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 2mL e incubadas a 37°C. Em seguida, foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e ao vigor espermático (0-5) por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelação.

Avaliação da funcionalidade da membrana espermática pós-descongelação (HOST)

A avaliação da funcionalidade da membrana espermática pós-descongelação ocorreu no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA). A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST) com água destilada na diluição de 1:2 (sêmen pós-criopreservado:água destilada).

Uma alíquota de 100 μL de sêmen pós-criopreservado referente a cada tratamento foi adicionada a 200 μL da solução (água destilada), ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C, por 5 (cinco minutos) (LAGARES; PETZOLDT; SIEME, 2000).

Após esse período, as amostras foram analisadas em microscopia de contraste de fase, sob aumento de 400 vezes e contagem de 200 células. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada, segundo descrito pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Análise de patologias espermáticas

Para a avaliação das patologias espermáticas (alterações de cabeça e cauda), foram retiradas alíquotas de 10 μL de sêmen de cada um dos cinco tratamentos após a descongelação e colocadas em eppendorfs de 2mL, sendo posteriormente avaliadas mediante preparação úmida entre lâmina e lamínula e, por último, óleo de imersão, utilizando-se microscopia de

contraste de fase em aumento de 100 vezes. Para tanto, foram contadas 200 células espermáticas, computando e classificando individualmente as alterações encontradas levando em consideração os defeitos maiores e menores (BLOM, 1972).

Níveis de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A análise dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ocorreu no Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia (LAFMOL).

A reação de peroxidação lipídica foi verificada. Os teores de Malondialdeído (MDA) foram avaliados pela produção de TBARS. Utilizou-se 200µL de sêmen mais 350µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600µL de ácido tiobarbitúrico diluído em ácido acético. Realizou-se duplicata de cada amostra e colocou-se em banho-maria (banho quente) durante 1 hora a 85°C para acelerar o processo das reações. Em seguida, as amostras de sêmen foram expostas ao banho de gelo durante 15 minutos para retardar o processo das reações. Posteriormente, adicionou-se 50µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1% e agitou-se durante 30 segundos. Diante disso, as amostras de sêmen foram centrifugadas no decorrer de 15 minutos a 25°C a 12.000 rpm, e, por fim, extraiu-se o sobrenadante, passou-se as alíquotas no filtro de seringa e imediatamente colocou-se nas cubetas.

A leitura do sobrenadante foi realizada no comprimento de onda de 532nm no espectrofotômetro. Uma curva analítica de calibração foi preparada utilizando MDA como padrão, em concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30nmol/mL. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mL de sêmen.

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, foram obtidos as médias e o desvio-padrão e procedida a análise de variância dos parâmetros avaliados. Para a comparação das médias, foi realizado o teste de Duncan, de acordo com o coeficiente obtido, considerando um nível de significância de 5%. Utilizou-se o PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis System) para Windows versão 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos do trabalho refletiram as análises desenvolvidas acerca da motilidade total (%) e vigor espermático (0-5), em condição de pós-descongelamento dos espermatozoides. Foram também obtidos os resultados para observação da integridade da estrutura de acrossoma, da membrana mitocondrial e da membrana plasmática. Além desses,

foram obtidos os resultados referentes ao teste de termorresistência, aos parâmetros da cinética espermática (CASA), à análise das patologias espermáticas e aos testes hiposmótico (HOST) e TBARS.

As análises referentes à pós-descongelção dos espermatozoides estão presentes na Tabela 1 e apresentaram valores com variações perceptíveis para o parâmetro motilidade total (%) e o vigor espermático (0-5). O parâmetro de motilidade total (%) refletiu média com valor superior para o tratamento C (55,00%) em relação aos tratamentos 1 (45,83%), 2 (47,50%), 3 (48,33%) e 4 (48,33%).

Em relação ao parâmetro vigor espermático, as médias apresentaram os consequentes valores: o tratamento C (3,17%) teve média semelhante ao tratamento 4 (3,17%), assim como o tratamento 1 e o tratamento 2 expressaram os mesmos valores (3,00%). Com relação ao tratamento 3 (2,83%), constatou-se média inferior.

Tabela 1. Motilidade total (%) e vigor espermático (0 – 5) pós-descongelção de sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas do extrato no diluidor TRIS-GEMA

Pós-descongelção		
Tratamentos	Motilidade total (%)	Vigor espermático
tratamento C	55,00 ± 10,49	3,17 ± 1,17
tratamento 1	45,83 ± 6,65	3,00 ± 0,63
tratamento 2	47,50 ± 7,58	3,00 ± 0,63
tratamento 3	48,33 ± 7,53	2,83 ± 0,41
tratamento 4	48,33 ± 8,17	3,17 ± 0,75

Fonte: Própria autora. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Teste de Duncan a 5%. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

As observações dos dados referentes aos parâmetros integridade acrossomal (AC), membrana mitocondrial (MIT) e integridade de membrana plasmática (MP) refletem valores expressos na Tabela 2, na qual a integridade acrossomal obteve média com valor para o tratamento C (87,33%). No contexto das médias para os tratamentos testes, o maior valor verificado foi o de tratamento 3 (93,00%), ficando o tratamento 2 (91,67%), enquanto o tratamento 1 (86,00%) e o tratamento 4 (85,20%) obtiveram valores inferiores ao tratamento C.

Com relação ao parâmetro de membrana mitocondrial, observou-se as seguintes médias: tratamento C (72,83%), que, em comparação com os tratamentos testes, apresentou valor inferior aos tratamentos 1 (83,83%) e 2 (85,83%). Os tratamentos 3 (67,33%) e 4 (70,00%) obtiveram médias inferiores ao tratamento C. Ressalta-se que o tratamento 2 se sobressaiu com relação as demais médias.

Na abordagem dos resultados para membrana plasmática, verificou-se que, para as médias, o tratamento C (42,00%) foi o menos representativo, ficando os maiores valores para os tratamentos 3 (50,33%) e 4 (51,00%), seguido de valores próximos pelos tratamentos 1 (49,66%) e 2 (49,83%).

Tabela 2. Integridade acrossomal (AC), membrana mitocondrial (MIT) e integridade de membrana plasmática (MP); os valores foram obtidos em porcentagem (%) de sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA pós-descongelamento

Pós-descongelamento			
Tratamentos	AC (%)	MIT (%)	MP (%)
tratamento C	87,33 ± 13,11	72,83 ± 35,81	42,00 ± 4,09
tratamento 1	86,00 ± 9,96	83,83 ± 4,96	49,66 ± 13,97
tratamento 2	91,67 ± 4,41	85,83 ± 4,45	49,83 ± 13,89
tratamento 3	93,00 ± 7,48	67,33 ± 33,14	50,33 ± 13,49
tratamento 4	85,20 ± 18,12	70,00 ± 34,42	51,00 ± 12,18

Fonte: Própria autora. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. AC: Integridade acrossomal; MIT: Membrana mitocondrial e MP: Integridade de membrana plasmática. Teste de Duncan a 5%. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

As observações dos dados referentes ao teste de termorresistência, conforme Tabela 3, expressam a avaliação da motilidade total (%) e o vigor espermático (0-5), ambos em relação à variável tempo no decorrer de: H0: 0 minuto; H1: 60 minutos; H2: 120 minutos; H3: 180 minutos.

No H0, foi observada a média relativa à motilidade total. Nisso, ressalta-se o tratamento 1, pois expressou a melhor média (57,50%). Ainda com relação ao H0, analisou-se o vigor espermático. Dentre os tratamentos averiguados, o tratamento 1 destacou-se em relação aos demais, pois apresentou a melhor média (3,50%).

Em H1, foi verificada a média relativa à motilidade total observando-se que o tratamento 1 exibiu maior média (43,33%). Quanto ao vigor espermático, foi registrado a média (2,50%) no tratamento 1. Em relação à motilidade total da variável H2, constatou-se uma média (16,66%) e, quanto ao parâmetro vigor espermático, constatou-se a média (1,16%) em tratamento 1.

No último componente H3 para a motilidade total, foi observado a média (3,33%). Com relação ao vigor espermático, registrou-se média (0,67%), sendo esses resultados referentes à motilidade total e ao vigor espermático, constatados no tratamento 1. Por meio dos resultados expressos e visualizados na Tabela 3, o tratamento 1 destacou-se com melhores desempenhos quanto aos parâmetros analisados.

Tabela 3. Teste de termorresistência lento (TTR) na avaliação da motilidade total (%) e do vigor espermático (0 – 5) pós-descongelação de sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA

Pós-descongelação								
Tratamentos	H0		H1		H2		H3	
	MT (%)	Vigor	MT (%)	Vigor	MT (%)	Vigor	MT (%)	Vigor
tratamento C	52,50±11,72	2,83±0,75	36,66±14,02	1,83±0,40	13,33±10,80	0,83±0,40	1,66±2,58	0,33±0,52
tratamento 1	57,50±7,58	3,50±0,55	43,33±7,53	2,50±0,55	16,66±11,69	1,16±0,40	3,33±2,58	0,67±0,52
tratamento 2	55,00±10,49	2,83±0,98	37,50±6,12	2,00±0	9,17±6,65	1,17±0,40	1,67±2,58	0,33±0,52
tratamento 3	51,67±10,80	3,00±0,63	31,66±16,93	1,83±0,75	8,33±5,16	1,00±0	0,83±2,04	0,16±0,41
tratamento 4	52,50±7,58	3,17±0,41	35,83±9,18	1,83±0,75	5,83±2,04	1,00±0	2,50±2,73	0,50±0,54

Fonte: Própria autora. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. A variável tempo em minutos foi cronometrada de acordo com as seguintes siglas: H0: 0 minuto; H1: 60 minutos; H2: 120 minutos e H3: 180 minutos. Teste de Duncan a 5%. Não houve diferença significativa ($P>0,05$).

Os resultados dos dados avaliados concernentes aos parâmetros da cinética espermática (CASA) possuem os valores indicados na Tabela 4. Foram analisadas as médias referentes ao parâmetro VCL, em que o tratamento C (66,83%) manifestou-se inferior ao tratamento 2 (71,80%), apresentando média superior a todos os outros tratamentos, e o tratamento 3 (67,92%) com valor próximo ao tratamento C. Entretanto, o tratamento C teve média superior aos tratamentos 4 (66,38%) e 1 (66,08%), ficando o tratamento 1 com menor média observada.

Em seguida, tem-se o parâmetro VSL seguido de suas médias examinadas, constatando-se que o tratamento C (26,02%) possui média superior aos tratamentos 1 (24,70%) e 3 (25,62%). Contudo, o tratamento C apresenta valor inferior aos tratamentos 2 (29,74%) e 4 (27,00%). Destaca-se que o tratamento 2 teve a maior média verificada dentre os tratamentos.

Com relação ao parâmetro VAP, observou-se as médias a seguir: o tratamento C (40,30%) teve média inferior aos tratamentos 2 (44,14%) e 4 (40,37%), mas obteve média superior aos tratamentos 1 (38,80%) e 3 (39,73%). Evidencia-se que o tratamento 2 manifestou a maior média entre os tratamentos.

Relativo ao parâmetro LIN, dispõe-se as seguintes médias: o tratamento C (38,95%) transpareceu média superior ao tratamento 1 (37,22%) e ao tratamento 3 (37,67%), ao passo que o tratamento C se apresentou inferior ao tratamento 2 (41,40%) e ao tratamento 4 (40,60%), o quais se sobressaíram em relação aos demais, pois possuíram as maiores médias.

As observações voltadas ao parâmetro STR apresentaram médias averiguadas, apontando o tratamento C (64,58%) com valor numérico inferior ao tratamento 2 (67,30%) e ao tratamento 4 (66,77%). Ressalta-se ainda que os tratamentos 1 (63,32%) e 3 (64,30%) tiveram valores inferiores, porém próximos ao tratamento C.

Sobre as observações referentes às médias do parâmetro WOB com o tratamento C (60,28%), os valores de maiores expressões foram obtidos pelo tratamento 2 (61,54%) e pelo tratamento 4 (60,80%). Ficaram com médias abaixo do desejado, o tratamento 1 (58,65%) e o tratamento 3 (58,53%).

Para o parâmetro ALH, tem-se em destaque o tratamento 4 (3,85%) e o tratamento 1 (3,98%) com as melhores médias verificadas, quando comparados ao tratamento C (3,85%). Os tratamentos 2 (4,08%) e 3 (4,20%) ficaram com médias menos desejadas. Contudo, ressalta-se que o tratamento 4 compreende valor com melhor desempenho em função da melhor média.

O parâmetro BCF apresentou resultados em que o tratamento C (8,21%) expressou média inferior aos tratamentos 1 (8,57%), 2 (8,48%), 3 (8,65%) e 4 (8,78%). Pende-se para as médias mais desejadas o tratamento 3 e o tratamento 4.

Para o parâmetro MOP, verificou-se que a média de tratamento C (23,28%) foi superior às médias de tratamento 1 (18,82%), 2 (22,76%), 3 (16,60%) e 4 (19,35%). Nesse contexto, o tratamento 2 compreende o mais desejado em função da melhor média.

Tabela 4. Parâmetros da cinética espermática por meio do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) pós-descongelamento de sêmen caprino com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA

Parâmetros da cinética dos espermatozoides de caprinos pós-descongelamento					
Parâmetros	Tratamento C	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
VCL	66,83±6,89	66,08±10,81	71,80±9,37	67,92±7,42	66,38±8,37
VSL	26,02±3,64	24,70±5,17	29,74±4,22	25,62±3,59	27,00±4,21
VAP	40,30±5,70	38,80±6,75	44,14±5,46	39,73±3,98	40,37±5,24
LIN	38,95±3,61	37,22±3,63	41,40±1,50	37,67±2,62	40,60±2,70
STR	64,58±1,75	63,32±3,66	67,30±1,39	64,30±3,68	66,77±2,73
WOB	60,28±5,22	58,65±2,27	61,54±2,52	58,53±1,35	60,80±2,64
ALH	3,85±0,53	3,98±0,20	4,08±0,48	4,20±0,34	3,85±0,18
BCF	8,21±1,38	8,57±0,60	8,48±1,13	8,65±0,78	8,78±0,73
MOP	23,28±15,35	18,82±12,75	22,76±14,00	16,60±10,73	19,35±12,95

Fonte: Própria autora. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. VCL - Velocidade curvilínea linear ($\mu\text{m/s}$); VSL - Velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$); VAP - Velocidade média do percurso ($\mu\text{m/s}$); LIN - Linearidade (%); STR - Retilinearidade (%); WOB - oscilação Wobble; ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm); BCF - Frequência de batimentos de cauda (Hz); MOP - motilidade progressiva. Teste de Duncan a 5%. Não houve diferença significativa ($P>0,05$).

As observações dos dados referentes ao teste hiposmótico refletem valores expressos na Tabela 5, na qual observou-se as seguintes médias: tratamento C (13,00%) que, em comparação com os tratamentos testes, apresentou valor superior aos tratamentos 1 (12,17%), 2 (9,42%), 3 (9,83%) e 4 (4,50%). Dentre esses, tem-se o tratamento 1 em destaque em relação aos demais.

Tabela 5. Valores médios (%) e desvio padrão (%) de sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana pós-descongelado reativo ao teste hiposmótico (HOST)

Tratamentos	Parâmetro teste hiposmótico HOST (%)
tratamento C	77,00 \pm 22,44
tratamento 1	77,16 \pm 25,44
tratamento 2	65,67 \pm 16,78
tratamento 3	66,33 \pm 25,18
tratamento 4	63,60 \pm 20,83

Fonte: Própria autora. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. Teste de Duncan a 5%. Não houve diferença significativa ($P>0,05$).

Naquilo que se refere às patologias espermáticas, pode-se observar na Tabela 6 a distinção entre os tipos de defeitos que se dividem em defeitos maiores (DM), defeitos menores (Dm) e defeitos totais (DT), em que os defeitos maiores são ocasionados durante a formação dos espermatozoides, enquanto os defeitos menores são ocasionados durante o trajeto percorrido pelas células espermáticas. Com relação aos defeitos totais, esse parâmetro envolve o somatório de DM + Dm.

Em relação ao parâmetro defeitos maiores, o tratamento 3 (0,90%) apresentou melhor resultado com uma média que indica a menor quantidade de defeitos maiores que possam comprometer significativamente a qualidade dos espermatozoides. Contexto de resultado expressivo é observado para o tratamento 3 no que tange aos defeitos totais (5,92%), ainda que o componente de defeitos menores tenha se apresentado com o melhor desempenho no tratamento 4 (5,10%), ressaltando-se que os defeitos menores não implicarão em grande comprometimento em relação aos defeitos maiores. É ainda de se considerar que o tratamento C, em relação a DM (1,60%), Dm (6,67%) e DT (8,00%), apresentou resultados menos expressivos.

Tabela 6. Parâmetros das patologias espermáticas de sêmen caprino da raça Anglo-Nubiana. Os valores foram obtidos em porcentagem (%) dos espermatozoides de caprinos com adição do extrato do jambolão com concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA pós-descongelamento

Pós-descongelamento			
Tratamentos	DM (%)	Dm (%)	DT (%)
tratamento C	1,60 ± 1,38	6,67 ± 3,67	8,00 ± 2,49
tratamento 1	1,38 ± 1,18	5,58 ± 2,16	6,50 ± 1,82
tratamento 2	1,67 ± 1,13	6,00 ± 2,97	7,67 ± 2,75
tratamento 3	0,90 ± 0,65	5,17 ± 2,42	5,92 ± 2,36
tratamento 4	1,40 ± 0,65	5,10 ± 1,52	6,50 ± 1,17

Fonte: Própria autora. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. DM: defeitos maiores; Dm: defeitos menores e DT: defeitos totais. Teste de Duncan a 5%. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

As observações dos dados referentes às distintas concentrações de jambolão aos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (malondialdeído – MDA) apresentaram resultados expressos na Tabela 7, tendo o tratamento C apresentado média de 26,82%. No contexto dos tratamentos testes, destacou-se o tratamento 3 (31,40%), mantendo-se mais próximo do valor de tratamento C. É de se considerar que as concentrações mais elevadas de jambolão expressaram desempenho de oxidação mais acentuados, como nos tratamentos 1 (36,47%) e 2 (36,96%).

Tabela 7. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Malondialdeído – MDA) em sêmen caprino com adição do extrato do jambolão em concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA pós-descongelção

Pós-descongelção	
Tratamentos	Concentração de MDA (nmol/mL)
Tratamento C	26,82 ± 10,57
Tratamento 1	36,47 ± 4,52
Tratamento 2	36,96 ± 9,91
Tratamento 3	31,40 ± 5,18
Tratamento 4	31,98 ± 4,73

Fonte: Própria autora. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Teste de Duncan a 5%. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

Os resultados obtidos para a análise do jambolão no diluidor TRIS-GEMA, aplicado para espermatozoides da raça Anglo-Nubiana, mostraram-se favoráveis, uma vez que condições comparativas com trabalhos de outros autores refletem pontos de vantagem para o uso do extrato do jambolão.

Bittencourt *et al.* (2006a) desenvolveu atividades para motilidade total e vigor espermático para a pós-descongelção. A partir do estudo do autor, percebe-se que seus resultados são confrontados com as análises expressas na Tabela 1, obtidas por procedimentos que envolvem composições semelhantes (glicerol e diluidor TRIS-GEMA). Assim, com relação ao parâmetro motilidade total, constatou-se que a adição do extrato do jambolão proporcionou resultado superior com valor de 48,33% quando comparado aos observados por Bittencourt *et al.* (2006b), com maior resultado após 4 horas na pós-descongelção (45,00%). Para o parâmetro vigor espermático, esta pesquisa apresentou melhor desempenho, de 3,17%, quando comparado com Bittencourt *et al.* (2006b) na primeira hora, o qual registrou 3,07%.

As observações dos dados referentes aos parâmetros da integridade acrossomal (AC), à membrana mitocondrial (MIT) e à integridade de membrana plasmática (MP) refletem valores expressos na Tabela 2, razão pela qual, em termos comparativos, os valores para AC (93,00%) observados neste estudo sobressaem-se quando comparados com os maiores valores obtidos por Silva (2017) nas raças azul (27,16%), canindé (25,83%) e moxotó (26,33%). Essas raças também são estudadas por Martins *et al.* (2011), que direcionou estudos para bovinos e observou valores inferiores (22,9%) aos apontados neste trabalho em relação ao parâmetro da integridade acrossomal (AC).

Panorama semelhante obteve-se para os comparativos de membrana mitocondrial, no qual observou-se MIT (85,83%), ao passo que os melhores resultados de Silva (2017) foram para as raças azul (23,00%), canindé (55,66%) e moxotó (45,50%). Embora Silva (2017) tenha obtido valores mais elevados nas raças por ele estudadas, para o parâmetro de membrana

plasmática, salienta-se que MP (51,00%), neste trabalho, mostrou-se inferior. Os estudos de Martins *et al.* (2011) refletem valores inferiores (22,9%) aos observados em relação parâmetro membrana plasmática (MP).

Resultados mais expressivos em favor do jambolão podem ser verificados em Soares *et al.* (2010), que desenvolveu pesquisa usando como diluidor o leite desnatado e como teste aplicou o Trolox. Sob esse prisma, este estudo constatou para integridade de acrossoma (AC) o valor de 93,00%, o que superou significativamente a AC obtida por Soares *et al.* (2010), seja para controle (38,76%), seja para Trolox 30 μ M/mL (41,19%). Panorama semelhante foi observado para os parâmetros membrana mitocondrial (MIT) e integridade de membrana plasmática (MP), no qual constatou-se MIT (85,83%) e MP (51,00%), enquanto Soares *et al.* (2010) obteve MIT (47,45%) para o controle, constando para Trolox 30 μ M/mL (42,46%). Já para o parâmetro de integridade de membrana plasmática (MP), Soares *et al.* (2010) registrou 39,55% para o controle e 44,81% para Trolox 60 μ M/mL.

Para o horizonte pesquisado por Soares *et al.* (2010), em um segundo momento, como foi mencionado anteriormente, aplicou-se Glutathiona reduzida (GSH) com relação a estes parâmetros: integridade de acrossoma (AC), potencial de membrana mitocondrial (MIT) e integridade de membrana plasmática (MP). Para integridade de acrossoma (AC), observou-se que o controle registrou 38,76%, e para os testes destacou-se GSH 7mM/mL (46,21%). Para o potencial de membrana mitocondrial (MIT), em que para o controle registrou-se 47,45%, no contexto dos testes, sobressaiu-se GSH 2 mM/mL (47,51%). Já para integridade de membrana plasmática (MP), o controle expressou 39,55%, destacando-se dentre os testes GSH 2mM/mL (43,31%). Salienta-se que a obtenção desses valores por Soares *et al.* (2010) ficou aquém aos valores obtidos para os mesmos parâmetros nesta pesquisa.

Ainda com relação ao parâmetro de integridade de acrossoma (AC), expressou-se como maior valor 93,00%. Nisso, apresenta valor superior quando confrontado com Bittencourt *et al.* (2006b), que registrou 91,58%, conforme expresso pelo parâmetro AC com defeitos (08,42%).

As observações dos dados referentes ao teste de termorresistência, conforme a Tabela 3, expressam a motilidade total (%) e vigor espermático (0-5), ambos em relação à variável tempo na pós-descongelção. Com relação à motilidade total (%) para H0, a expressão do melhor resultado obteve-se no tratamento 1 (57,50%) com extrato do jambolão; mostrou-se maior do que o apresentado por Silva (2017) para as raças de caprinos azul (35,83%), canindé (41,66%) e moxotó (35,83%), mesmo ambos os estudos tendo ocorrido na estação chuvosa. Silva (2017) reporta com relação ao vigor espermático, no tempo H0, valores para azul (3,16%),

canindé (3,33%) e moxotó (3,16%), refletindo valores abaixo do apresentado neste estudo com a aplicação do extrato do jambolão, em que o tratamento 1 (3,50%) foi o mais expressivo.

Nesta pesquisa, para H1 relativo à motilidade total (%), a expressão do melhor resultado foi no tratamento 1 (43,33%) que se sobressaiu em relação aos valores obtidos por Silva (2017), o qual obteve valores para as raças azul, canindé e moxotó, sendo a mais expressiva a raça canindé (37,50%).

Os resultados dos dados avaliados concernentes aos parâmetros da cinética espermática possuem valores indicados na Tabela 4. Assim, o parâmetro VCL registrou o valor mais expressivo, de 71,80%, superior ao obtido por Soares *et al.* (2010), no qual se destacou dentre os tratamentos testes Trolox 60 μ M/mL (71,51%). Para o parâmetro ALH, registrou-se o valor mais expressivo 4,20%, sendo também superior ao obtido por Soares *et al.* (2010); destacou-se dentre os tratamentos testes o de maior expressão Trolox 30 μ M/mL (3,08%). Ressalta-se que os desempenhos referentes a ALH apresentou favorabilidade que refletirá no deslocamento dos espermatozoides.

Para a motilidade progressiva (MP), observou-se o valor expressivo de 22,76%, que superou o obtido por Soares *et al.* (2010) quando pesquisou a adição de glutathiona reduzida (GSH) no diluidor à base de leite desnatado, em duas concentrações: GSH 5mM/mL (19,00%) e GSH 7mM/mL (21,15%). Para a retilinearidade (STR), obteve-se o valor mais expressivo de 67,30%, enquanto Soares *et al.* (2010) verificou resultado inferior na adição de glutathiona reduzida (GSH) no diluidor à base de leite desnatado na concentração de GSH 5mM/mL (64,61%).

Com relação ao WOB, obteve-se o valor mais expressivo de 61,54%, enquanto Soares *et al.* (2010) verificou resultado inferior na adição de glutathiona reduzida (GSH) no diluidor à base de leite desnatado na concentração de GSH 5mM/mL (60,01%). Soares *et al.* (2010) ainda levantou valores para os parâmetros: VCL (71,73%), na concentração de GSH 7mM/mL, o qual ficou inferior ao deste trabalho (71,80%); VAP (42,73%), na concentração de GSH 5mM/mL, também inferior ao deste estudo (44,14%); ALH (3,43%) na concentração de GSH 5mM/mL, cujo maior desempenho ficou inferior ao desta pesquisa (4,20%). Salienta-se que os valores observados nos resultados permeiam os encontrados em Soares *et al.* (2010), colocando-se como fator de vantagem para este estudo as mensurações em microlitros (μ L), ao passo que Soares *et al.* (2010) trabalhou com (mM/mL).

As observações dos dados referentes ao teste hiposmótico (HOST) refletem valores expressos na Tabela 5, em que se registrou resultados significativos no tratamento 1 (77,16%) e no tratamento C (77,00%). Quando comparado aos resultados obtidos por Silva (2017), se

sobressaiu em relação a raça azul (8,00%), bem como em valor aproximado para a média geral das três raças (13,12%).

Para as observações dos dados referentes às patologias espermáticas, conforme a Tabela 6, observou-se que o tratamento 3 (0,90%) apresentou melhor desempenho em relação ao parâmetro DM. Ao ser comparado com Bittencourt *et al.* (2006b), expressou número inferior de defeitos maiores, haja vista que o melhor desempenho de Bittencourt *et al.* (2006b) foi de 1,00%. Além disso, o autor trabalhou com sêmen fresco, no qual se espera menor ocorrência de danos aos espermatozoides.

Para o parâmetro de Dm, expressou-se melhor resultado no tratamento 4 (5,10%) que compreende valor mais expressivo que o mais significativo de Bittencourt *et al.* (2006b), de 6,50%. Esse valor obtido pelo autor também é menos significativo que o valor obtido para o tratamento 3 (5,17%), compreendendo o tratamento de maior relevância dentre os tratamentos testes com o extrato de jambolão.

Com relação ao parâmetro de DT, apresentou-se o tratamento 3 (5,92%) como o mais expressivo, ao passo que Bittencourt *et al.* (2006b) obteve 8,00% como o seu melhor resultado, o que ficou em condição aquém em relação aos defeitos totais dos espermatozoides.

Para as observações dos dados referentes aos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Malondialdeído – MDA) em sêmen de caprinos, conforme a Tabela 7, no teste com a adição do extrato de jambolão em concentrações distintas no diluidor TRIS-GEMA pós-descongelamento, obteve-se médias e desvios padrões dos respectivos tratamentos: tratamento C (26,82%), tratamento 1 (36,47%), tratamento 2 (36,96%) e tratamento 4 (31,98%). Destacou-se o tratamento 3 (31,40%) em relação aos outros tratamentos testes. Vale ressaltar que os resultados obtidos se sobressaíram quando comparados com Barros (2021), que desenvolveu testes com o ácido oleico no diluidor TRIS-GEMA, em que se destacou 0,5 μ M de ácido oleico (81,68%), valor mais próximo do controle (74,68%).

Por fim, as análises abordadas em contexto comparativo com os autores aqui enfocados refletem a possibilidade de usos diversos, seja para o jambolão, seja para outros extratos antioxidantes que venham a contribuir nas biotecnologias reprodutivas.

CONCLUSÃO

Ao longo desta pesquisa, as análises desenvolvidas revelaram pontos conclusivos marcantes para o uso do extrato de jambolão no diluidor TRIS-GEMA. Nesse sentido, a aplicação do extrato do jambolão manteve a motilidade em condição desejável na concentração

0,01 μ M, desempenho que favorece a condição para a fecundação. Já a aplicação do extrato na concentração de 0,001 μ M manteve o vigor espermático que é fator de importância. Para a retilinearidade, a concentração de 0,1 μ M apresentou-se mais eficiente.

Por meio dos resultados obtidos das análises estatísticas, foram constatados $p > 0,05$ (não houve diferença significativa), em condições que não refutam o seu uso. O teste de TBARS averiguou um indicativo da ação antioxidante do extrato do jambolão, no qual se constatou melhores usos para concentrações baixas do extrato, 0,01 μ M e 0,001 μ M. Assim, conclui-se que o extrato de jambolão pode ser um componente aplicável ao diluidor TRIS-GEMA.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.34, n.2, p.79-85, 2010.

BARROS, F.N. Efeito da adição ácido araquidônico e do ácido oleico ao diluidor tris-gema sobre a viabilidade espermática pós-congelação em sêmen caprino. 2021. 88 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2021.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.G.G.; VASCONSELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES, J.D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. *Ciência Animal Brasileira*, v. 6, n. 3, 2006a.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALVES, S.G.G.; BISCARDE, C.E.; VASCONCELOS, M.F.; OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. *Revista Brasileira Saúde e Produção Animal*, v. 7, n. 1, p. 27-37, 2006b.

BLOM, E. *A systematic search for abnormalities in testis-epididymis in pedigree bulls in Denmark*. Copenhagen: Royal Veterinary and Agricultural University, 1972, 1-36 p. (Yearbook).

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, v.50, p.699-706, 1998.

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, [S.l.], v. 2, p. 67-75, 2008.

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

- DAS, S.; SARMA, G. Study Of The Hepatoprotective Activity Of The Ethanolic Extract Of The Pulp Of Eugenia Jambolana (Jamun) In Albino Rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 3, p.1466-1474, 2009.
- DELL VALLE, L.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN PÉREZ, J.A. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*, v. 138, p. 213-219, 2013.
- GOOGLE MAPS. *Coordenadas do local do experimento: fazenda Sucupira, David Caldas-PI.* Disponível em:
<https://www.google.com.br/maps/place/4%C2%B044'32.0%22S+42%C2%B055'04.0%22W/@-4.7422302,-42.9177912,46m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0xee58b854d2de6e11!8m2!3d-4.7422222!4d-42.9177778>. Acesso em: 18 fev. 2022.
- LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; MUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. *First Internacional Journal Andrologia*, v.32, p.163-167, 2000.
- MAGALHÃES, K.A.; MARTINS, E.C.; HOLANDA FILHO, Z.F.; LUCENA, C.C. Pesquisa Pecuária Municipal 2017: efetivo dos rebanhos caprinos e ovinos. Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E). *Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos*, n. 5, p. 5-12, out. 2018.
- MARTINS, L.F.; PINHO, R.O.; PARAIZO, R.M.; OLIVEIRA, R.R.; CASTILHO, E.F.; GUIMARÃES, J.D. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 7, p. 1519-1525, 2011.
- MENEGASSI, S.R.O.; BARCELLOS, J.O.J. *Aspectos reprodutivos do touro: teoria e prática.* Guaíba: Agrolivros, 2015, 280 p.
- SILVA, S.N.; ABREU, I.C.; SILVA, G.F.C.; RIBEIRO, R.M.; LOPES, A.S.; CARTÁGENES, M.S.S.; FREIRE, S.M.F.; BORGES, C.R.; BORGES, M.O.R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, p. 102-108, 2012.
- SILVA, E.C.B.; ARRUDA, L.C.P.; SILVA, S.V.; SOUZA, H.M.; GUERRA, M.M.P. High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat sêmen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.5, p.1237-1243, 2016.
- SILVA, J.H.L. Efeito da época do ano sobre as características do sêmen criopreservado de caprinos azul, canindé e moxotó nas estações seca e chuvosa. 2017. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.
- SWAMI, S.B; THAKOR, N.S.J.; PATIL, M.M.; HALDANKAR, P.M. Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. *Food and Nutrition Sciences*, v. 3, p. 1100-1117, 2012.
- SOARES, A.T. Avaliação *in vitro* de espermatozoides caprinos criopreservados em diluente à base de leite desnatado acrescido de Glutathione reduzida e Trolox em diferentes

concentrações. 2010. 89 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALMEIDA, A.K.; PORTELA, A.P.M.; BITTENCOURT, R.F.; ALVES, S.G.G.; BITTENCOURT, T.C.C.; QUINTELA, A.T. Avaliação in vitro do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n. 1, 2006.

ANEXO

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: 64049-550
Telefone: (86) 3215-5734, e-mail: coeapi@ufpi.edu.br

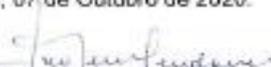


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Efeito da adição do extrato do jabolão (syzygium cumini) ao diluidor sobre a viabilidade espermática de sêmen caprino da Raça Anglo nubiana*", registrada nº 645/2020, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA 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 02/10/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/12/2020 a 01/05/2021
Espécie/Linhagem/raça	Caprino/ Anglonubiano
Nº de Animais	08
Peso/ Idade	70 a 80 kg/ 3 a 5
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Sucupira, David Caldas-PI
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Fazenda - Fazenda Sucupira, David Caldas-PI
Grau de Invasividade	1

Teresina, 07 de Outubro de 2020.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Coordenadora do Conselho de Experimentação Animal/UFPI
Coordenadora