



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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN CAPRINO**  
**CRIOPRESERVADO EM DILUENTE TRIS CONTENDO**  
**EXTRATO BRUTO DE *MAURITIA FLEXUOSA***

**DAYANA MARIA DO NASCIMENTO**

Bom Jesus – PI

2016

**DAYANA MARIA DO NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN CAPRINO  
CRIOPRESERVADO EM DILUENTE TRIS CONTENDO  
EXTRATO BRUTO DE *MAURITIA FLEXUOSA***

**Orientador:** Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

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

Bom Jesus – PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**N244a** Nascimento, Dayana Maria

Avaliação *in vitro* de sêmen caprino criopreservado em diluente tris contendo extrato bruto de *mauritia flexuosa* / Dayana Maria Nascimento - 2016.

51 f. : il.

Dissertação ( Mestrado em Zootecnia I) – Universidade Federal do Piauí, Campus Profª Cinobelina Elvas, Bom Jesus, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

1. Variabilidade espermática 2. *Mauritia flexuosa* 3. Bodes I. Título

**CDD 636.390 824**

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**Título: Avaliação *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em diluente Tris contendo extrato bruto de *Mauritia flexuosa***

Autora: M.V. Dayana Maria do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

Avaliada em: 19/02/2016

Banca Examinadora:



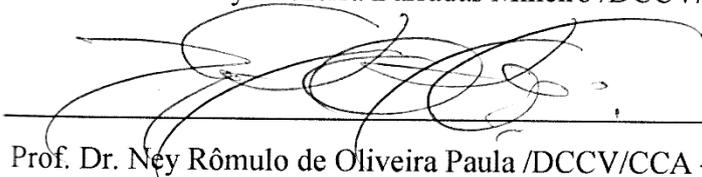
---

Prof. Dr. Flávio Ribeiro Alves /DMV/CCA – UFPI – Membro



---

Profa. Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro /DCCV/CCA – UFPI – Membro



---

Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula /DCCV/CCA – UFPI – Orientador

Bom Jesus – PI

2016

## AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por me conceder a dádiva em andar nos trilhos do bem, me conceber saúde e determinação para seguir em frente, mesmo diante das adversidades. Obrigado pela proteção por não ter me deixado desistir nas inúmeras vezes em que este pensamento veio à minha cabeça.

À minha mãe Maria Deuzenira Gomes Pereira, mulher dedicada, que está ao meu lado em todos os momentos. Tenha a certeza que cada sacrifício será sempre lembrado e recompensado, nunca deixou faltar carinho e amor, meus eternos agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, pela oportunidade concedida e orientação. Agradeço por me confiar e acreditar em meus esforços.

Agradecimento especial à Profa. Dra. Janaína de Fátima Saraiva Cardoso, por sua dedicação e horas compartilhadas, paciência em seus ensinamentos, carinho e orientação. Empenhou-se desde o princípio na realização deste trabalho, e esteve presente em todas as etapas, sempre tendo uma solução para todos os empecilhos.

À todo o grupo de pesquisa Sanidade e Reprodução, especialmente a Médica Veterinária Layanne de Macêdo Praça e ao futuro médico veterinário Jheyson Douglas, que esteve comigo, me ajudando do início ao fim do experimento. Sem vocês, as coletas e análises jamais teriam sido concluídas. Muito obrigado.

À doutoranda Yndira Enayan e ao mestrando Jeferson do laboratório de Biotecnologia da Reprodução da Universidade Federal do Piauí, pela ajuda nas análises das sondas fluorescentes, por terem tirado um pouco do seu precioso tempo para me passar novos conhecimentos.

À minha família no geral, Kélvia, Tia Valmira, Tia Valdira, Vanessa, Ranna e Renno, que sempre acreditaram em mim, me transmitiram que todos os sonhos e desejos podem tornar-se realidade, vocês são meus verdadeiros amigos.

À minha amiga de todas as horas Luma Natasha, por estar ao meu lado, sempre me incentivando a não desistir, me apoiando em todas as situações.

Ao meu grande amigo e padrinho Francisco Lima Silva (Lima vet), pessoa pelo qual terei eterna gratidão. Sem o senhor, nada disso teria acontecido. Muito obrigado, grande amigo!

A todos que participaram ou torceram pelo sucesso de minha caminhada, e que não foram citados nessas singelas linhas, obrigado por cada segundo compartilhado e vibrações positivas transmitidas. Todos foram fundamentais para a concretização dessa etapa, e levarei sempre dentro do peito. **Meu obrigado!**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTAS DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO GERAL	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	11
CAPITULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 <i>Biologia espermática</i>	15
2.2 <i>Membrana plasmática</i>	16
2.3 <i>Criopreservação de sêmen</i>	16
2.3.1 <i>Danos causados durante o processo de criopreservação</i>	17
2.4 <i>Diluidores para congelação seminal</i>	18
2.5 <i>Mauritia Flexuosa</i>	22
2.6 <i>Testes para avaliação da fertilidade</i>	24
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2 - Avaliação <i>in vitro</i> do sêmen caprino criopreservado em diluente Tris contendo extrato bruto de <i>Mauritia flexuosa</i>	34
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO 1	50
ANEXO 2	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição do meio diluente seminal Tris-gema	36
<b>Tabela 2.</b> Características físicas do sêmen fresco de caprinos das raças Gurguéia e Pardo Alpina	38
<b>Tabela 3.</b> Média $\pm$ desvio padrão do perfil morfológico do sêmen descongelado dos grupos controle, G5% e G10% <i>Mauritia flexuosa</i>	40
<b>Tabela 4.</b> Média $\pm$ desvio padrão do TTR pós-descongelamento do sêmen de bodes acrescidos ou não de extrato de <i>Mauritia flexuosa</i>	41
<b>Tabela 5.</b> Média $\pm$ desvio padrão dos testes de fluorescência para a integridade de membrana e potencial mitocondrial dos Grupos: Controle, G5 e G10	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Mauritia flexuosa</i> .....	23
<b>Figura 2.</b> Vagina artificial para coleta seminal de pequenos ruminantes.....	38
<b>Figura 3.</b> Extrato bruto desidratado de <i>Mauritia flexuosa</i> .....	40
<b>Figura 4.</b> Amostra do extrato diluído em citrato após centrifugação.....	40
<b>Figura 5.</b> Espermatozoide com membrana plasmática intacta, avaliado pelo teste de fluorescência com Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de propídio usando filtro com excitação de 492 nm e emissão de 517 nm (40x).....	43

## LISTAS DE ABREVIATURAS

<b>μL</b>	Micro litro
<b>ACP</b>	Água de coco em pó
<b>CFD</b>	Diacetato de carboxifluoresceína
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EC</b>	Etilenoglicol
<b>EYCE</b>	Enzima coaguladora da gema do ovo
<b>g</b>	Grama
<b>GLY</b>	Glicerol
<b>Host</b>	Teste hiposmótico
<b>IA</b>	Inseminação Artificial
<b>IMP</b>	Integridade de Membrana
<b>IP</b>	Iodeto de propideo
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mOsm</b>	Milliosmol
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeniônico
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SAS</b>	Software Statistical Analysis
<b>TTR</b>	Teste de termoresistência
<b>β</b>	Beta
<b>nm</b>	nanômetro
<b>Sptz</b>	espermatozoide

## RESUMO GERAL

**NASCIMENTO D. M. Avaliação in vitro do sêmen caprino criopreservado em solução Tris contendo extrato bruto de *Mauritia flexuosa*. 2016. 51p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2016.**

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato de *Mauritia flexuosa* em diluente Tris, sobre o sêmen caprino criopreservado. Foram utilizados dezenove ejaculados, oriundos de caprinos das raças Gurguéia e Pardo Alpina, inteiros e clinicamente saudáveis. Após coleta foi realizada a avaliação das características macro e microscópicas, seguido pela diluição com os seguintes tratamentos: G5 (solução TRIS+5% de extrato de *Mauritia flexuosa*), G10 (solução TRIS+ 10% de extrato de *Mauritia Flexuosa*) e GC (TRIS gema). Após diluição o sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL e criopreservado em aparelho automatizado TK 3000® em curva rápida, posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e, por fim, raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos. As partidas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos e homogeneizadas para a análise do TTR lento, e morfologia. A análise estatística dos dados foi realizada pelo PROC GLM (The General Linear Models Procedure) do software SAS e quando verificada significância ( $p < 0,05$ ) procedeu-se o teste de Tukey. No sêmen fresco, as características físicas mantiveram-se dentro dos parâmetros normais estabelecidos. Após descongelação, no TTR houve diferença significativa quanto ao grupo controle ( $16,05 \pm 9,06$ ) e G10 ( $1,73 \pm 0,56$ ) no parâmetro motilidade até o tempo de 60 minutos, membrana plasmática ( $7,42 \pm 6,86$ ) e membrana mitocondrial ( $11,05 \pm 11,07$ ). Como conclusão, observou-se que o grupo controle contendo como diluidor a gema de ovo obteve os melhores resultados comparado aos grupos contendo diferentes concentrações de *Mauritia flexuosa*, contudo a presença de motilidade e vigor nos grupos que contêm o citado extrato demonstra que ainda pode torna-se uma alternativa viável na criopreservação de sêmen.

**Palavras chaves:** Viabilidade espermática, *Mauritia flexuosa*, bodes.

## ABSTRACT

NASCIMENTO D.M. **In vitro evaluation of goat semen cryopreserved in TRIS extensor increased by *Mauritia flexuosa* extract. 2016. Thesis (MS in Zootechnics) - Federal University of Piauí, Bom Jesus, 2016.**

This study aimed to evaluate the effects of *Mauritia flexuosa* extract, increased by TRIS extensor on the goat semen cryopreserved. They used four goats, clinically healthy. For the collection was used only artificial vagina, totaling ninety ejaculated. After collection was performed evaluating the macro and microscopic characteristics, followed by dilution with the following treatments: G5 (TRIS solution + 5% *Mauritia flexuosa* extract), G10 (TRIS solution + 10% *Mauritia flexuosa* extract) and GC (TRIS Yolk). After diluting semen was packaged in 0.25 ml French straws and cryopreserved in appliance automated TK 3000®, subsequently, the pallets were immersed in liquid nitrogen (-196 ° C) and finally stored and placed on racks in cryogenics tanks. The pallets were thawed in a water bath at 37 ° C for 30 seconds, put into microtubes and homogenized for analysis of slow TTR, (RTD Test) and morphology. The integrity of the membrane and mitochondrial potential were analyzed by means of fluorescent probes in epifluorescence microscope. Data were analyzed using the ANOVA. The indices obtained from motility and vigor were evaluated by PROC GLM and when checked significance ( $p \geq 0,05$ ) proceeded to the Tukey test. In fresh semen, the physical characteristics remained within the established normal parameters. After thawing, the TTR was no significant difference in the control group ( $16,05 \pm 9,06$ ) and G10 ( $1,73 \pm 0,56$ ) in motility parameter until the time of 60 minutes, the plasma membrane and mitochondrial membrane ( $11,05 \pm 11,07$ ). In conclusion, it was found that the control group containing as a dilute egg yolk obtained the best results compared to groups containing different concentrations of *Mauritia flexuosa*, however, the presence of motility and force the groups containing the aforementioned extract shows that it can still make if a viable alternative in semen cryopreservation.

**Keywords:** Sperm viability, *Mauritia flexuosa*, bucks.

## 1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma importante biotecnologia reprodutiva, pois possibilita a conservação do germoplasma masculino (CASTELO et al., 2008) e apesar de influenciar negativamente alguns parâmetros seminais, é uma ótima metodologia para a prolongação da fertilidade (CIPRIANO e FREITAS, 2013).

O desenvolvimento de técnicas de congelação evoluiu progressivamente ao longo dos últimos 60 anos. Inúmeros diluidores e procedimentos de congelação têm sido descritos em diferentes espécies animais especialmente em Bubalinos (MARTIN, 2004) caprinos (JIMENEZ-RABADANAN et al., 2013) e ovinos (AISEN, 2002). Quando associada à Inseminação Artificial (IA), esta técnica torna-se um instrumento eficaz para a promoção e difusão de material genético de excelente qualidade (CASTELO et al., 2008).

Geralmente, os ingredientes de um diluidor variam desde componentes químicos puros a produtos de origem animal ou vegetal. Dentre os meios diluentes de origem vegetal, destacam-se aqueles à base de água de coco, que têm se mostrado efetivos na conservação de sêmen de caprinos (NUNES, 1988), ovinos (FIGUEIREDO, 2001), suínos (TONIOLLI, 1998), peixes (CARVALHO, 2002) e cães (CARDOSO, 2003). Outros componentes de origem sintética, por exemplo, ácido cítrico, Tris, Triladyl<sup>®</sup>, leite desnatado e o INRA 96<sup>®</sup> são diluentes que têm sido amplamente utilizados para a congelação de sêmen (KULAKSIZ et al, 2012. ), embora os resultados deste e de outros foram notavelmente variáveis ( BYRNE et al., 2000 e JOSHI et al., 2005 ).

No processo de criopreservação seminal é necessária a utilização de um diluente que forneça energia, proteja as células contra danos relacionados a baixas temperaturas e mantenha um ambiente adequado para a sobrevivência espermática (EVANS e MAXWELL, 1987). Toda essa proteção ao espermatozoide é essencial, pois durante os processos de congelação-descongelação estes são submetidos a condições desfavoráveis como a desidratação, as mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana, o efeito solução e a formação de cristais de gelo (VIVIEROS et al., 2011).

O Brasil em sua diversidade apresenta uma variedade de frutas nativas, com características sensoriais peculiares e alto potencial nutricional e econômico (RUFINO et al., 2010). O Buri (*Mauritia flexuosa*) por sua vez, é uma palmeira encontrada nos biomas da Amazônia e cerrado, localizados em algumas regiões no Brasil, produz um fruto com uma cor que varia do amarelo ao marrom avermelhado escuro (CERQUEIRA e FERREIRA, 2004) e é conhecida pelo seu elevado teor de carotenoides provitamina A (3531 ug ERA/100g) nomeadamente  $\beta$ -caroteno (ROSSO e MERCADANTE, 2007), proteínas, sais minerais,

ácidos graxos, vitaminas do complexo B (SILVA et al., 2008). Mariath et al (1989), Tavares et al. (2003) e Manhães (2007) analisando a composição química do buriti encontraram para umidade 69,6%; 67%; 62,93%±0,12; proteínas 1,8%; 1,4%; 2,10%; lipídeos 8,1%; 3,8%; 13,85%; cinzas 0,7%; 1,4%; 0,94% e carboidratos 19,8%; 12,1%; 8,25,%, respectivamente.

Embora muitos estudos já tenham sido desenvolvidos utilizando outros produtos vegetais na tecnologia do sêmen, não há relatos sobre a utilização do efeito da *Mauritia flexuosa* na criopreservação. O presente estudo foi desenhado para avaliar a viabilidade *in vitro* de sêmen caprino criopreservado em diluente Tris contendo extrato bruto de *Mauritia flexuosa*.

## **CAPITULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**Elaborada de acordo com as normas da Revista Ciência Rural  
(<http://coral.ufsm.br/ccr/revista/normas.htm>)**

# **A utilização de extratos vegetais como alternativas para criopreservação de sêmen**

**The use of vegetal extracts as alternative for cryopreservation of sêmen**

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**Dayana Maria do Nascimento, Ney Rômulo de Oliveira Paula**

### **Resumo**

Com o crescente aumento dos rebanhos caprinos e ovinos no Nordeste brasileiro e a grande demanda por proteína animal a exigência do mercado tem sido cada vez maior, principalmente em se tratando da qualidade carne. A criopreservação de sêmen como incremento tecnológico vem ganhando espaço e uma das grandes vantagens trata-se da possibilidade de conservação de germoplasma de animais geneticamente superiores por longos períodos, entretanto, apesar dos inúmeros estudos durante as últimas décadas existe um grande impasse quanto à taxa de sobrevivência desses espermatozoides, visto que durante o processo de congelamento a célula espermática sofre inúmeros danos, reduzindo assim a sua capacidade fertilizante. As proteínas da gema de ovo e o leite ainda hoje são os crioprotetores mais utilizados, entretanto devido a sua origem animal, existe uma maior restrição quanto à sua comercialização, devido à facilidade de contaminação. Por este motivo, procura-se por novos diluentes e crioprotetores que sejam capazes de melhorar ou manter as características de fertilidade espermática, por conseguinte inúmeras substâncias de origem vegetais, com aportes nutricionais excelentes vêm sendo estudadas.

**Palavras-chave:** Pequenos Ruminantes, Tris-gema, Criopreservação de sêmen

### **Abstract**

With the increasing herds of goats and sheep in northeastern Brazil and the great demand for animal protein requirement of the market has been increasing, especially in the case of production systems. The cryopreservation of semen as technological improvement is becoming more popular, one of the great advantages, it is the possibility of preserving germplasm of animals genetically superior for long periods, however, despite numerous studies over the past decades there is a big problem about the rate the survival of sperm, since the sperm cells during the freezing process suffer many damage thus reducing its fertilizing capacity. The egg yolk proteins and milk are still the most commonly used cryoprotectants,

however due to its animal origin, there is restriction as marketing of the samples due to the ease of contamination. For this reasons, looking for new diluents and cryoprotectants that are able to improve or maintain sperm fertility characteristics, therefore many substances of vegetable origin with excellent nutritional contributions have been studied.

**Keywords:** Small ruminants, Tris-yolk, semen cryopreservation

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Biologia espermática*

De acordo com Corteel (1981) o sêmen é o produto da ejaculação normal de um reprodutor, e é composto por espermatozoides que são produzidos nos testículos. Estes espermatozoides são formados por um processo denominado de espermatogênese, fenômeno que ocorre nos túbulos seminíferos (KNOBIL e NEILL, 2006).

A espermatogênese é um processo altamente organizado e precisamente sincronizado, através do qual espermatogônias diploides dividem-se por mitose para manter sua população e produzem ciclicamente espermatócitos, estes sofrem meiose e produzem espermatozoides haploides (JOHNSON et al., 1991; SHARPE, 1994; JOHNSON et al., 2000). A célula espermática possui características morfológicas e fisiológicas próprias, como a capacidade de movimentação e formato ideal para aperfeiçoar seu potencial de fertilização. Constitui-se de duas regiões distintas envolvidas por uma única membrana plasmática com domínios diferenciados, que são a cabeça e a cauda, ligadas por uma peça de conexão, chamada colo. A membrana plasmática envolve todas as estruturas espermáticas e é composta por dupla camada lipoproteica, com características bioquímicas que podem variar conforme a espécie animal. A cabeça do espermatozoide é constituída por acrossoma e núcleo, sendo que o acrossoma contém enzimas essenciais para a fertilização; já o flagelo possui as fontes de energia e estruturas necessárias para gerar a motilidade. Os papéis desses componentes são de assegurar a transferência do material genético contido no núcleo espermático para o ovócito (AZEVEDO, 2006 ;GUERRA, 2012).

O espermatozoide, ganha sua forma na fase pós-meiótica (espermio gênese), sendo esta fase caracterizada pelo extensivo remodelamento das espermátides, com a formação do acrossoma, condensação nuclear, desenvolvimento do flagelo e perda de grande parte do citoplasma. Como produto final dar se há origem a esta célula altamente especializada em sua estrutura e função, com capacidade de unir-se ao oócito para iniciar o processo de fecundação (KNOBIL e NEILL, 2006).

O sêmen caprino é composto por substâncias orgânicas como: a frutose, sorbitol,

inositol, ácido cítrico, fosfolipídios, glicerilfosforilcolina, prostaglandinas e proteínas. O pH se mantém muito próximo a 7,0 devido ao seu complexo sistema tampão. A energia proveniente dos açúcares, em especial da frutose, é fundamental para manter a motilidade e viabilidade dos espermatozoides (EVANS e MAXWELL, 1987).

Além disso, o aparelho reprodutor do macho caprino apresenta particularidades que o diferencia das características das demais espécies, de forma, que uma das mais importantes, é a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbouretrais liberadas no plasma seminal (SIMPLÍCIO e MACHADO, 1989). A enzima EYCE (egg yolk-coagulating enzyme - enzima coaguladora da gema do ovo), que coagula a gema de ovo, é também secretada pela glândula bulbouretral. Na presença de cálcio a enzima EYCE, que é uma fosfolipase A, atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo (ROY, 1957) resultando em lisolecitinas e ácidos graxos, substâncias tóxicas aos espermatozoides (CORTEEL, 1974).

### *2.2 Membrana plasmática*

A membrana plasmática possui a função de transportar seletivamente moléculas através da célula, levando em consideração que esta permaneça íntegra para que ocorram as reações necessárias à fertilização (JEYENDRAN et al., 1984), juntamente com suas organelas e componentes intracelulares mantendo o gradiente químico de íons e outros componentes solúveis (SILVA e GADELLA, 2006).

Possui em sua formação uma bicamada lipídica, proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído. Estas membranas são impermeáveis a grande parte dos solutos polares, no entanto, são permeáveis a substâncias apolares. (LEHNINGER et al., 2005). As principais regiões da membrana plasmática da cabeça do espermatozoide da maioria dos mamíferos são a região acrossomal e a região pós-acrossomal. A região acrossomal pode ser subdividida em segmento apical, segmento principal e segmento equatorial. O tamanho e forma desses segmentos variam conforme a espécie. A região pós-acrossomal inclui a membrana plasmática entre a margem posterior do acrossoma e o colo. Em algumas espécies, a margem entre as regiões acrossomal e pós acrossomal é delimitada pelo anel subacrossomal (KNOBIL e NEILL, 2006).

Sua composição lipídica varia entre as espécies, possui geralmente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros, e 5% de glicolipídios, distribuídos assimetricamente entre os folhetos da bicamada. O colesterol é o componente mais variável da membrana, possuindo assim uma relação direta com a membrana (HARISSON & GADELA, 2005). De forma que, espécies que possuem uma maior quantidade de colesterol apresentam menos danos na membrana, durante o processo de resfriamento (HOLT e NORTH, 1984).

### *2.3 Criopreservação de sêmen*

A criopreservação de sêmen é uma importante técnica usada para o aprimoramento da reprodução em diversas espécies. Agentes crioprotetores são substâncias que oferecem energia, proteção e um ambiente favorável à sobrevivência das células armazenadas (SILVA e GUERRA, 2011), além do que, permite a utilização do sêmen por período indeterminado, bem como a redução dos riscos e custos quanto à aquisição e transporte de reprodutores (CASTELO et al., 2008).

Contribui também contribui para a melhoria das condições sanitárias nas explorações agrícolas e na segurança dos gêneros alimentícios derivados como rastreabilidade e barreira sanitária (PELLICER-RUBIO et al., 2016). Além de quando associada a IA (Inseminação Artificial) facilita a difusão de genes dos melhores reprodutores e aumenta a descendência de machos selecionados, uma vez que somente um ejaculado permite a criopreservação de 20 a 40 doses de sêmen (SIMÕES; MASCARENHAS; BARIL, 2008).

Para alcançar sucesso nos programas reprodutivos, os espermatozoides devem manter pelo menos quatro atributos básicos após a congelação e descongelação: 1. Integridade do flagelo, garantindo assim a produção de ATP e motilidade; 2. Integridade do núcleo, que capaz de manter estável o armazenamento do DNA; 3. Integridade do acrossomo, já que possui enzimas responsáveis pela fecundação; 4. Integridade de membrana plasmática, importante para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana do oócito durante a fertilização (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

### *2.3.1 Danos causados durante o processo de criopreservação*

A criopreservação de sêmen é uma técnica que promove um processo de grande estresse celular e exposição dos espermatozoides a condições extremamente desfavoráveis em manter a sua viabilidade (PURDY, 2006). No entanto estes danos irreversíveis podem ser reduzidos pelo uso de diluentes adequados e aditivos crioprotetores (GIL, 2003; JEYEDRAN, 2008). A membrana espermática também é alterada em função da adição do crioprotetor, das mudanças volumétricas associadas à distensão e contração em resposta a soluções hiperosmóticas, da desidratação induzida pela congelação, da elevada concentração de solutos e da formação de gelo intracelular, induzindo a necessidade de substâncias crioprotetoras que reduzam os efeitos deletérios do resfriamento, congelamento e descongelamento aos espermatozoides (SILVA et al., 2006).

O período mais crítico ocorre durante as fases de congelação e descongelação, momento este em que ocorrem oscilações no volume celular, contribuindo para o dano quando os limites de tolerância das membranas são ultrapassados. (BECKER-SILVA, 2004).

O primeiro estresse térmico ocorre na fase de resfriamento entre os 20° e 5 °C. O

choque térmico ocorre se esse resfriamento é feito de forma inadequada, causando danos irreversíveis que vai desde o padrão anormal de motilidade (circular ou retrógrada), rápido declínio da motilidade, acrossoma e lesão de membrana plasmática, metabolismo reduzido e perda de componentes intracelulares. A maioria desses danos é resultado das alterações ocorridas na membrana durante o processo de refrigeração que é quando os fosfolipídios passam pela fase de transição, no entanto danos como estes, podem ser reduzidos pelo controle da taxa de resfriamento (GRAHAM, 1996; WATSON, 2005). Esta fase é caracterizada pela transição da membrana do estado líquido cristalino para o estado de gel (MEDEIROS et al., 2002).

Em uma curva de resfriamento muito rápido ( $>60^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) a água não tem tempo hábil de sair da célula e, em algum ponto abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ , a célula sofrerá a congelação interna. As extensões dos danos causados pelo gelo intracelular dependem do grau de formação deste e do tamanho dos cristais. Grandes cristais podem causar danos mecânicos à célula, enquanto que os pequenos podem não ser deletérios, no entanto, se reaquecidos, o crescimento destes pequenos cristais, em decorrência da recristalização, pode vir a causar danos severos (MAZUR, 1980).

A sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com a espécie e com a quantidade e composição do plasma seminal, podendo ser determinada assim pelo conteúdo de colesterol da membrana, grau de saturação dos ácidos graxos, tipo de fosfolipídios e quantidade de proteína presente na membrana (BORGES et al., 2011)

Apesar de toda a evolução ocorrida nesse processo é esperada uma redução de aproximadamente 50 % na proporção de espermatozoides viáveis, pois devido ao estresse térmico, muitas células não resistem a congelação e morrem. No entanto, é necessário um número suficiente de espermatozoides que além de sobreviver, mantenham sua integridade funcional e estrutural para que estes continuem férteis (WATSON, 1995).

Tuli e Holtz (1995) calcularam que o percentual de redução de motilidade progressiva subjetiva, do sêmen fresco para o sêmen descongelado de bodes, foi em torno de 46%. Azêredo et al. (2001) constataram uma diminuição da motilidade após a descongelação do sêmen caprino lavado e, que o processo de criopreservação teve um efeito deletério sobre o vigor da motilidade espermática. Bittencourt et al. (2004) avaliaram a eficiência do glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino e concluíram que o glicerol a 7% promoveu taxas de motilidade superiores, porém, mais alterações morfológicas.

#### *2.4 Diluidores seminais*

A diluição no geral proporciona um aumento na quantidade de ejaculado, conferindo a utilização em uma quantidade maior de fêmeas, além do que, exerce um papel fundamental na

preservação do sêmen (SALAMON e MAXWELL, 2000), tanto na fase de refrigeração quanto na de congelamento.

Vale dizer que um bom diluente deve possuir uma substância que atue contra o choque térmico; soluções tampões que são usadas para manter o pH; manutenção da pressão osmótica de aproximadamente de 300 mOsm, o equivalente ao do sêmen; conter antibióticos, que visam cobrir um amplo espectro bacteriano. Além disso, deve fornecer substratos adicionais para manter o metabolismo de energia do espermatozoide (CHACUR et al., 2012).

Silva (2001) e Gibbons (2002), concluíram que substâncias como o Fosfato de Sódio, Citrato de Sódio, TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano), que atuam como soluções tampões; a Glicose e a Frutose, como fontes energéticas; a Gema de Ovo ou o Leite como crioprotetores externos, o Glicerol (GLY) e o Etilenoglicol (EG), como protetores internos; bem como os antibióticos, como a Penicilina, a Estreptomicina e a Gentamicina, são considerados constituintes indispensáveis no processo de diluição para posterior conservação do sêmen.

Em razão disso, diluidores à base de água de coco (FIGUEIRÊDO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011) e lecitina de soja (FUKUI et al., 2008; SHARAFI et al., 2009) têm sido utilizadas para a criopreservação do sêmen, proporcionando resultados satisfatórios para os espermatozoides ovinos e caprinos.

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (NUNES e COMBARNOUS, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (BLUME e MARQUES JR., 1994).

A lecitina de soja é uma mistura natural de fosfatidilcolina e vários ácidos graxos, tais como o esteárico, oleico, palmítico e alguns fosfolipídios que prevalecem na maioria das membranas biológicas de mamíferos, e ainda são conhecidos por conferir estabilidade estrutural às células (OKE et al., 2010), além disso lecitina de soja pode substituir com sucesso gema de ovo como um suplemento para o meio de criopreservação, sem efeitos adversos sobre a pós-descongelamento motilidade espermática, integridade da membrana e viabilidade, na concentração de 1,5% (SALMANI, 2014).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a utilização de diluidores de sêmen suplementados com extrato aquoso de alecrim também podem melhorar a qualidade pós-descongelamento de espermatozoides em porcos (MALO et al., 2010), canino (GONZALEZ et al., 2010) e ovinos (GIL et al., 2010).

## *2.5 Protetores e crioprotetores*

Os agentes crioprotetores podem ser classificados tanto em: crioprotetores penetrantes, que são as substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica ocorridas pela criopreservação sobre a célula; e os crioprotetores não penetrantes, responsáveis por aumentar a osmolaridade do meio extracelular, e ainda pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo assim, a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação (GONZALEZ, 2004).

A gema de ovo é o ingrediente mais comum utilizado como protetor de sêmen de mamíferos; ela é utilizada para preservar os espermatozoides contra as crioinjúrias ocorridas durante o processo de congelação-descongelação (BENCHARIF, 2010). O mecanismo de crioproteção das macromoléculas presentes na gema do ovo e também no leite ainda não está bem elucidada, porém acredita-se que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sejam as responsáveis pela proteção do espermatozoide frente aos danos causados pela criopreservação (SINGH et al., 2007; CARVALHO et al., 2008). Em estudo desenvolvido por Moussa et al. (2002), foi sugerido que a LDL participa formando um filme protetor sobre a membrana espermática, protegendo-a dos cristais de gelo formados durante este processo. Em sêmen de ovinos, o LDL se liga fortemente a membrana espermática. A gema, que é rica em LDL, doa lipídeos para a membrana do espermatozoide, protegendo-o e mantendo a razão colesterol / fosfolipídios, preservando a integridade dos gametas (NEVES e HENRY, 2012).

De acordo com Hu et al. (2011), a substituição da gema de ovo pela LDL na composição do meio diluente foi benéfica para criopreservação do sêmen de touros. O meio diluente contendo LDL obteve uma maior proporção de espermatozoides móveis, acrossomas intactos e membranas plasmáticas intactas após o processo de congelação/descongelação quando comparados ao meio diluente contendo a gema de ovo.

O leite e os bioprodutos lácteos contém ingredientes que ajudam a manter a motilidade espermática nomeadamente pelo seu efeito tampão, combatendo assim algumas substâncias originadas durante o metabolismo destas células e que deprimem fortemente a motilidade (PICKET e AMANN, 1987). As lipoproteínas do leite protegem a membrana plasmática através de uma estabilização, permitindo uma melhor adaptação da membrana plasmática ao ambiente, sobretudo durante a queda de temperatura (WATSON, 1981; OLIVEIRA et al., 2013). Os lipídios assim como as caseínas auxiliam a membrana impedindo o acúmulo de concentrações tóxicas de  $Ca^{2+}$  intracelular por se ligarem vigorosamente a ela (HOCHACHKA, 1986).

Apesar dos efeitos benéficos atribuídos ao leite, assim como na gema de ovo ocorre um efeito deletério entre o diluente a base de leite e a fração glicoprotéica do plasma seminal caprino (SBUIII) identificada por NUNES (1982), que é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e triglicerídeos no leite desnatado, resultando em um ácido graxo, o ácido oleico, que é tóxico aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO et al., 1997).

Por isso, a procura por substituir a gema de ovo nos diluidores tem aumentado nos últimos anos pelo fato desta conter substâncias que impedem a respiração dos espermatozoides levando a uma diminuição de sua mobilidade (BENCHARIF, 2008; NAJAFI, 2013). Além de aumentar o risco de contaminação microbiana (BOUSSEAU, 1998), levando à produção de endotoxinas capazes de reduzir a fertilização dos espermatozoides, aumentando o risco de transmissão de doenças por meio do transporte de diluentes à base de gema de ovo para mercado internacional (BENCHARIF, 2010).

Estudos realizados por Salmani et al. (2014) utilizando a lecitina de soja, um protetor à base de plantas como suplemento para o meio de criopreservação, numa concentração de 1,5% concluíram este ser capaz de substituir a gema de ovo como meio de criopreservação, sem efeitos adversos sobre a motilidade espermática pós-descongelação, integridade da membrana e viabilidade seminal. No entanto outros autores concluíram que o diluidor comercial Bioxcell<sup>®</sup> (lecitina de soja) se mostrou inferior ao diluidor leite-gema em preservação de sêmen ovino refrigerado (KULAKSIZ; CEBL; AKCAY, 2012).

A *Aloe vera* sp. pertence à família das Liláceas, da qual fazem parte, a cebola, o nabo e os aspargos (MAURELLE et al., 1996). Suas aplicações, atualmente, embora não totalmente conhecidas, expandiram-se e abrangem problemas como a artrose, a acne, a úlcera e até cardiopatias. Possui inúmeras propriedades regeneradoras, curativas, umectantes, lubrificantes e nutritivas (MAURELLE et al., 1996). Em sua composição foram identificadas inúmeras substâncias, dentre elas estão os polissacarídeos contendo glicose, galactose e xilose, tanino, esteróides, ácidos orgânicos, substâncias antibióticas, enzimas de vários tipos, resíduos de açúcar, uma proteína com 18 aminoácidos, vitaminas, minerais, sulfato, ferro, cálcio, cobre, sódio, potássio, manganês e outras (VELOSO e PEGLOW, 2003). O uso deste extrato de *Aloe Vera* adicionado ao sêmen e a outros diluidores têm demonstrado resultados satisfatórios, na concentração de 5%, quando mantido resfriado pode substituir integralmente a gema de ovo em meios de refrigeração do sêmen caprino, associado a outros diluidores (MELO et al., 2012).

Espécies de plantas, como a Sálvia (*Salvia officinalis*) (HO et al., 2002), orégano (*Origanum vulgare*) (SKROVARKOVA, 2012), e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (HO et al.,

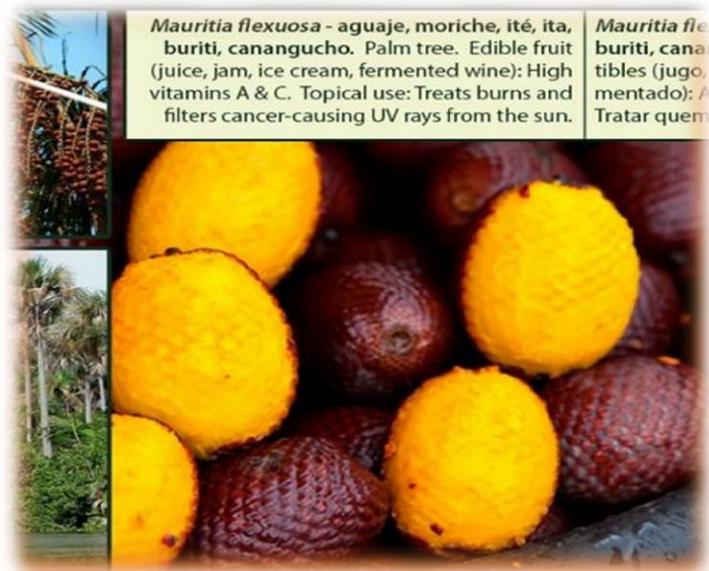
2002), foram testados para o desenvolvimento das formulações antioxidantes naturais. Dentre essas espécies, o extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) com sua potente ação antioxidante é muitas vezes a primeira escolha para o alimentos processados e amplamente utilizados na indústria de alimentos (SANCHER-SILVA, 2014).

Del Valle et al. (2013), utilizando óleos vegetais de coco e de palma em substituição a gema de ovo no diluente TRIS para sêmen ovino, e concluiu que apesar de não ter sido demonstrado efeito superior desses óleos na qualidade seminal pós descongelação, são ainda necessárias mais pesquisas sobre assunto.

### 2.5 *Mauritia Flexuosa*

A *Mauritia flexuosa* (Figura 1) pertence à família Arecaceae e ao gênero *Mauritia*; é uma palmeira amplamente distribuída na Floresta Amazônica do Brasil (DELGADO et al. 2007), podendo ser encontrada em diversas cidades das regiões norte e nordeste.

É considerada a palmeira nativa mais abundante que cresce naturalmente no bioma amazônico do Brasil, e apresenta grande potencial socioeconômico, devido à sua ampla utilização. Ela é utilizada comercialmente para a produção de não-subprodutos alimentares, produção de bebidas, como matéria-prima para a construção de casas ou como uma fonte de alimento direto de vitaminas e minerais. Além disso, ele também desempenha um papel importante nas estratégias da conservação da fauna, uma vez que sua fonte de frutas é utilizada como fonte de alimento para muitos pássaros e espécies de mamíferos. *M. flexuosa* é um excelente indicador de solos mal drenados e alagados também, como sendo ligada à existência de nascentes e poços (Vieira et al., 2010). O fruto possui polpa de coloração amarelo alaranjada, tem sabor agridoce com consistência amilácea e oleosa, envolvendo endocarpo esponjoso (BELTRÃO e OLIVEIRA, 2007); possui uma casca muito dura, formada por pequenas escamas de coloração castanho-avermelhado. É um fruto sazonal, onde sua frutificação em maior escala ocorre nos meses de dezembro a junho na maioria das regiões (LEÃO, 2005). Na microrregião de Teresina, PI a frutificação ocorre mais intensamente entre os meses de outubro a dezembro (LEAL, 2005). Os frutos são largamente consumidos pela população local e são considerados uma das melhores fontes de pró-vitamina A encontrados na biodiversidade brasileira (Ministério da Saúde, 2002). No que diz respeito aos seus macronutrientes, a polpa *in natura* dos frutos de buriti é composta principalmente por carboidratos e lipídios (25,53% e 18,16%, respectivamente) (Carneiro e Carneiro, 2011).



**Figura 1.** *Mauritia flexuosa*

Fonte: commons.wikimedia.org

O óleo possui atividade bactericida (SILVEIRA et al. 2005) e é muito rico em antioxidantes, o que o torna muito atrativo para a indústria de cosméticos, principalmente para a fabricação de protetor solar (ZANATTA et al. 2010). Além disso, o óleo pode ser utilizado para a produção de plásticos fotoluminescentes (DURÃES et al. 2006).

As famílias de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 consistem de ácidos graxos poliinsaturados contendo de 18 a 22 carbonos. Os principais ácidos graxos n-3 são o ácido linolênico, o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA), enquanto os principais n-6 são o ácido linoléico e o ácido araquidônico (SUÁREZ- MAHECHA et al. 2002). O estudo de Manhães (2007) comparou a composição do óleo de buriti, em relação às frações lipídicas, com dois óleos muito utilizados na dieta humana (azeite de oliva e o óleo de canola) tidos como alimentos saudáveis, e encontrou que o óleo de buriti possui níveis mais elevados de ácido graxo oléico (n-9) e contém aproximadamente quatro vezes mais ácido linolênico (n-3) do que o azeite de oliva.

Com relação aos teores de ácido ascórbico e de polifenóis na polpa de buriti o estudo de Manhães (2007) encontrou que esta polpa contém teores de vitamina C próximos aos da laranja e menores dos encontrados na couve. Outros estudos realizados por Candido (2015), analisando os compostos bioativos e capacidade antioxidante de buriti (*Mauritia flexuosa*), concluiu que as regiões de onde foram obtidos os frutos de buriti influenciou o teor de compostos bioativos e a capacidade antioxidante. Os frutos da região do Cerrado foram mais promissores sobre os compostos fenólicos e capacidade antioxidante. No entanto, a melhor fonte de carotenóides totais foi que da região amazônica.

## *2.6 Testes para avaliação da fertilidade*

Parâmetros como motilidade, vigor e as patologias espermáticas têm sido totalmente correlacionados com a característica fertilidade do reprodutor (VAZQUEZ et al. 1997; SANCHO et al. 1998). Entretanto, o método mais empregado para avaliar a viabilidade dos espermatozoides submetidos a procedimentos de congelamento e descongelamento consiste em determinar a porcentagem de células com movimentos progressivos e dotadas de vigor (KARATZAS et al. 1997). Todavia, a maneira mais eficaz de se avaliar a preservação da capacidade fecundante de um espermatozoide na dose de sêmen é a taxa de concepção pós IA (SAACKER e WHITHE, 1972). Porém estas técnicas que avaliam o status funcional de organelas espermáticas (acrossomas e mitocôndrias), ou a integridade de determinados componentes celulares (membranas, cromatina), têm ganhado importância durante as últimas décadas (MARTINEZ-PASTOR et al. 2004).

Jeyendran et al. (1984) propuseram o uso do teste hiposmótico (HOST), por ser considerado um método simples e acessível, capaz de detectar alterações intensas na funcionalidade espermática em amostras que não seriam descartadas se somente os resultados de motilidade e morfologia espermáticas fossem considerados. Este teste é caracterizado pelo influxo de fluidos para o interior da célula espermática, sob condições hiposmóticas, até que o equilíbrio entre os compartimentos seja alcançado, sendo que este é um indicativo de que o transporte de água através da membrana esteja ocorrendo normalmente (INAMASSU et al. 1999). Este influxo de água aumenta o volume da célula e provoca a dilatação da membrana plasmática, enrolando o flagelo. A cauda é particularmente susceptível a esta condição, torcendo-se em helicoidal (reação positiva), ou seja, enrolando a cauda. Esta situação é facilmente observada com um microscópio de contraste de fase, sendo suficiente contar 100 espermatozoides para validar o teste (ROTA et al. 2000).

A integridade da membrana espermática é um atributo essencial para a fertilidade do espermatozoide e, por isso, a análise deste parâmetro é fundamental para a predição da fertilidade (LUZ et al. 2000). O uso de corantes vitais, como a eosina-nigrosina, é eficiente na determinação de espermatozoides com danos na membrana, uma vez que estes corantes não sejam capazes de passar pela membrana de uma célula viva, mas este penetra em células mortas, corando-as (BEARDEN e FUQUAY, 1992).

De modo semelhante, a integridade do acrossoma é pré-requisito básico para garantir um bom potencial de fertilidade dos espermatozoides, uma vez que o percentual de espermatozoides que apresentaram reação acrossomal possui correlação negativa com a fertilidade (GIL et al. 2000). Entretanto, a integridade acrossomal não reflete necessariamente

a integridade de membrana, sendo importante o uso de testes que combinem ambas as avaliações (HOLT, 2000).

Dentre as técnicas de avaliação da membrana plasmática espermática destacam-se as sondas fluorescentes permeáveis e impermeáveis, detectando as membranas danificadas, como as que utilizam os corantes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP) (ANZAR et al. 1997; SOUZA, 2003).

O CFDA é uma solução não fluorescente que penetra o ambiente celular e é, rapidamente, convertida em carboxifluoresceína pelas esterases intracelulares. A carboxifluoresceína é uma solução altamente fluorescente não permeável que é mantida no meio intracelular na presença de uma membrana plasmática intacta, apresentando a coloração verde. Por outro lado, o IP tem a capacidade de corar o DNA de células que estão mortas ou têm sua membrana danificada, produzindo uma coloração vermelho fluorescente quando excitada (PEÑA et al. 1998).

A mensuração do potencial de membrana mitocondrial é realizada, especialmente, com a finalidade de analisar o risco de apoptose dos espermatozoides, uma vez que a interrupção deste parâmetro é considerada como o primeiro sinal de estresse, induzido pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MARCHESI e FENG, 2007).

O JC-1 é uma sonda fluorescente utilizada para avaliação da funcionalidade mitocondrial (ARRUDA et al., 2007), cujo princípio de atuação se baseia nas mudanças de polarização da membrana mitocondrial interna (SILVA e GADELLA, 2006). Por ser dependente do gradiente eletroquímico, este corante necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativa para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final (ARRUDA et al., 2007). Em concentrações elevadas, o corante apresenta-se na forma de J-conjugado e emite coloração vermelha caracterizando mitocôndrias funcionais, enquanto que em concentrações baixas encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde, inerente a mitocôndrias afuncionais (ARRUDA et al., 2007).

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nos últimos anos, a procura por substituir os crioprotetores de origem animal vem ganhando força e os resultados quanto às pesquisas utilizando extratos vegetais são bem satisfatórios, toda via os origem animal ainda são os mais utilizados, devido ao seu elevado poder de proteção.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p. 1801–1808, 2002.
- ANZAR, M. Post-thaw membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion-exchange column. **Theriogenology**, v.47, p.845-856, 1997.
- ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.8-16, 2007.
- AZERÊDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.
- AZEVEDO, H. C. Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico- linoléico e  $\alpha$ -lactoalbumina. 2006. 195f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu/ SP.
- BEARDEN, H. J.; FUQUAY, J. W. Applied Animal Reproduction. New Jersey: Prentice-Hall, 478p. 1992.
- BECKER-SILVA S. C. Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 121p, 2004.
- BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. Oleaginosas Potenciais do Nordeste para a Produção de Biodiesel. **Embrapa Algodão**, Campina Grande, 2007.
- BENCHARIF, D.; AMIRAT-BRIAND, L.; GARAND, A.; ANTON, E.; SCHIMITT, S.; DESHERCES, G.; DELHOMME, M. L.; LANGLOIS, P; BARRIERE, S.; DESTRUMELLE, O.; VERA-MUNOZ, D. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing equex and LDL (low density lipoproteins). **Animal Reproduction Science**, v.119, p. 305–313, 2010.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOU, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelamento do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.
- BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; 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.
- BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; BAŞPINAR, N.; TAŞPINAR, M.; COYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P. P.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ,

S.; SUNGUROĞLU, A.; OZTUNA, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, p. 248-253, 2010.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; ULUTAS, P. A. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 81, p. 13-17, 2009.

BYRNE, G.P., LONERGAN, P., WADE, M., DUFFY, P., DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*. 62, 265–275, 2000.

CAMPOS ACN, NUNES JF, MONTEIRO AWU, PINHEIRO JHT, FERREIRA MAL, ARAUJO AA, CRUZ JF. Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003 ;27:620- 624.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D. M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*. 2003 ;59: 743-751.

CARNEIRO, T. B., e CARNEIRO, J. G. M. (2011). Frutos e polpa desidratada buriti (*Mauritia flexuosa* L.): Aspectos físicos, químicos e tecnológicos. *Revista Verde*, v.6, p. 105–111.

CARVALHO, F. P.; SILVA, J. F. S.; SOUZA, G. V.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. S. P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 612-620, 2008.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen caprino. **Acta Veterinaria Brasília**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

CASTRO, A. Buriti. In: Clay, J. W. e Clement, C. H. Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests. **FAO**, Roma, Itália, 1993.

CHACUR, M. G. M.; DIAS, H. S.; PAPA, F. O. et al. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Veterinária e Zootecnia**, p. 346-355, 2012.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 3ª Ed., Belo Horizonte, 2013.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, p.466-470,1977.

DARNET, S. H.; SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. C. e LINS, R. T. Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the Amazon region. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, p.488-491, 2011.

DEL VALLE, I.; 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.

DELGADO, C., COUTURIER, G., MEJIA, K. *Mauritia flexuosa* (Arecaceae: Calamoideae), an Amazonian palm with cultivation purposes in Peru. **Fruits**, v.62, p. 157–169, 2007.

DURÃES, J. A.; DRUMMOND, A. L.; PIMENTEL, T. A. P. F.; MURTA, M. M.; BICALHO, F. S.; MOREIRA, S. G. C. e SALES, M. J. A. Absorption and

- photoluminescence of Buriti oil/polystyrene and Buriti oil/poly(methyl methacrylate) blends. **European Polymer Journal**, v. 42, p.3324-3332, 2006.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Australia: Butterworths Pty Limited, 194 p. 1987.
- FIGUEIREDO, E. L.; MONTEIRO, A.W.U.; SILVA, F.A.H.S.; CAMPOS, A.C.N, NUNES,J.F. Avaliação in vitro do sêmen ovino resfriado diluído em água de coco previamente criopreservado em nitrogênio líquido. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.25, p.430-431, 2001.
- FIGUEIRÊDO, E. L.; NUNES, J. F.; CORDEIRO, M. A.; SOUZA,P.T.;FILHO, R. N. G VIEIRA, V. E.; FILHO, A. H. S. S.; MESQUITA, F. L. T.; SALGUEIRO, C. L. M.; FEITOSA, J. V. Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em água de coco in natura e em pó. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 14, n. 2, p. 95-97, 2007.
- FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, n.4, p.286-289, 2008.
- GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v.4, n.16, p.24-32, 2002.
- GIL J, RODRIGUEZ-IRAZOQUI M, LUNDEHEIM N, SODERQUIST L, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.1157-1170, 2003.
- GIL,J. RODRIGUEZ, I. M, LUNDEHEIM, N.SODERQUIST, L. RODRIGUEZ, M. H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-70, 2003.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. *Reprodução Animal*. São Paulo: Editora Manole, 7. ed., 2004. 513p.
- HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-78, 1990.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343–352, 1990.
- HO, C.T .; WANG, M.; WEI, G. J.; HUANG,T.C.; HUANG,M,T. Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage, **Biofactors**, v.13,p.161–166, 2000.
- HOCHACHKA, P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science (New York, N.Y.)*, v.231, p.234–41, 1986.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.2-22. 2000.
- INAMASSU, A., UECHI, E., LOPES, M. D. Viabilização do teste hiposmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira Reprodução Animal.**, v.23, p.302-304, 1999.

- IRITANI, A.J.; NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. **In: SILVER JUBILEE LABORATORY ANIMAL HUSBANDRY KYOTO UNIVERSITY**, 1961, Kyoto. Proceedings...Kyoto, p.97-104, 1961.
- JEYENDRAN R, ACOSTA V, LAND S, COULAM C. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. **Fertil Steril**, v.90, p.1263-5, 2008.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. CRABO, B. G.; ZANEVELD, L.J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.
- JIMÉNEZ-RABADÁN,P.; RAMÓN,M.; GARCÍA-ÁLVAREZ,O.; MAROTO-MORALES,M.; P.J. ÁLVARO-GARCÍA,P. J.; OLMO,E. D .;M.D. PÉREZ-GUZMÁN,M. D FERNÁNDEZ-SANTOS,M.R.; J. JULIÁN GARDE,J.; SOLER,A.J. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. **Cryobiology**, v, 67p. 251–257, 2013.
- JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P. T. (Ed.) **Reproduction in domestic animals**, 4 ed., p. 173-219, 1991.
- JONES, T. C., HUNT, R. D., KING, N. W. Patologia Veterinária . Editora Manole, São Paulo/SP, 6ª Edição, p.63-65, 2000.
- KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; BRIKAS, P. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 48, p. 1049-1059, 1997.
- KNOBIL, E.; NEILL, J.D. Physiology of Reproduction. 3 ed. Elsevier Academic Press USA. 2006.
- KULAKSIZ, R.; CEBL, C.; AKCAY, E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. **Turkish Journal of Veterinary e Animal Sciences**, v. 36, p. 177–182, 2012.
- LEAL, A. F. Condições do extrativismo e aproveitamento das frutas nativas da microrregião de Teresina – Piauí. Teresina: UFPI, 2005. 93p. **Dissertação Mestrado**.
- LEÃO, M. M.; CARVALHO, M. de F. C. C. de. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos: uma contribuição do setor saúde para a promoção da segurança alimentar e nutricional no Brasil. **In: Salay, E. (Org.). Composição de Alimentos: uma abordagem multidisciplinar**. Campinas -SP: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação - NEPA, p. 13-23, 2005.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. Editora Sarvier. 4ed. São Paulo. 2005.
- LORENZI, H., SOUZA, H. M., COSTA, J. T. M., CERQUEIRA, L. S. C., e FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. Martins, R. C., Santelli, P., & Figueiras, T. S. (2010). Buriti. **In R. F. Vieira (Ed.), Frutas nativas da Região Centro-Oeste do Brasil** (pp. 109–126). Brasília: Embrapa, 2004.
- LUZ, S. L. N.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P.B. D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, 2000.
- MARIATH, J. G. R.; LIMA, M. C. C. & SANTOS, L. M. P. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera* Mart) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p.849-853, 1989.

- MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A., GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen–thawed ram semen. **Animal Reproduction Science** , v.84, p.121-133, 2004.
- MAURELLE, J. A. F.; RODRIGUEZ, F. M.; GUITIERREZ, Z. P. Acción analgésica del extrato acuoso liofilizado de Aloe vera L. em ratones. **Revista Cubana Plantas Medicinai**s, n.2, p.15-17, 1996.
- MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M.T.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.
- MELO, C. C. S.; MELO, L.C.S.; CASTRO, E.V.; SANTOS, B.M.B.; OLIVIERA, E.C.S.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F. *Aloe Vera* sp. is an acceptable alternative to egg yolk for preserving goat semen at 4° C. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, suppl.4, p.433, 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. . Alimentos regionais brasileiros (1st Ed.). Brasilia: Secretaria de Políticas de Saúde, 2002.
- MOUSSA, M.; MATINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695–706, 2002.
- NAJAFI, M.; ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; SHARAFI, M.; AKBARI, A.; KHODAEI M.M.; MARTINEZ-PASTOR, F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender .**Cryobiology**, v. 66, p. 275–282, 2013.
- NEVES, M. M.; HENRY, M. Gema de ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.4, 0.209-14, 2012.
- NUNES, J. F. A inseminação artificial em caprinos no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 12, p. 85-91, 1988.
- NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações como diluidor de sêmen dos mamíferos domésticos. In: I Simpósio Nacional da Reprodução de Mamíferos Domésticos, 1995, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: UECE – FAVET, p.57-63, 2005.
- OKE, M., JACOB, J. K., PALIYATH, G. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. **Food Res. Int.** 43, 232–240, 2010.
- OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B. M. M.; CELEGHINI, E. C. C.; FERNANDES, C. B.; MATTOS, C. B. Cryopreservation of equine semen: a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2013.
- OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; BRASIL, O.O.; MOURA, A.A.A.N. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.6, p.1295-1302, 2011.
- PELLICER-RUBIO, M. T.; BOISSARD, K.; FORGERIT.; POUGNARD, J. L.; JEAN LUC BONNÉ, J.L.; LEBOEUF, B. Evaluation of hormone-free protocols based on the “male effect” for artificial insemination in lactating goats during seasonal anestrus. **Theriogenology**, V.85, P.960–969, 2016.

- PEÑA, A. I., BARRIO, F., QUINTELA, L. A. & HERRADÓN, P. G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrossomal integrity. **Theriogenology**, 50:163-174, 1998.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 6, p. 215–225, 2006.
- ROSSO, V. V. e MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5062–5072, 2007.
- ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, n.15, p.1415-1420, 2000.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F., e MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996–1002, 2010.
- SAACKER, R. G.; WHITE, J.M. Semen quality test and their relationship to fertility. In :TECHNOLOGICAL CONFERENCE OF ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 4., **Chicago, Proceedings**, p.22-27, 1972.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 77-111, 2000.
- SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; BAHREINI, M.; SHARAFI, M. *In vitro* assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluent for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology**, v.68, p. 276-280, 2014.
- SANCHES-SILVA, A.; COSTA, D.; ALBUQUERQUE, T.G.; BUONOCORE, G.; RAMOS, F.; CASTILHO, M.C.; MACHADO, A.V.; COSTA, H.S. Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review, *Food Addit. Contam. Part A* **Chemical Analysis Control exposition**. Risk Assess. v.31, p.374–395, 2002.
- SANCHO, M.; PÉREZ-SANCHEZ, F.; TABLADO, L. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. **Theriogenology**, v. 50, p. 27-37, 1998.
- SHARAFI, M.; FOROUZANFAR, M.; HOSSEINI, S.M.; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; ABEDI, L.H.P.; NILIN.; RAHMANI, H.R.; JAVAHERI, A.R.; ESFAHANI, M.H.N. In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for Ram semen cryopreservation. **International Journal of Fertility and sterility**, v. 3, p. 149–152, 2009.
- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In. KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p.1363-1434.
- SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS G. G.; MARTINS, D. M. de O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1790-1793, 2008.
- SILVA, L.D.M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.107-111, 2001.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.
- SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOURENÇO, M. C. S.; NEVES JUNIOR, I.; MENEZES, F. S. & KAPLAN, M. A. C. Atividade antimicrobiana dos frutos de Syagrus

oleracea e *Mauritia vinifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15 (2), p.143-148, 2005.

SINGH, L. P.; HARSHAN, H. M.; ANSARI, M. R. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 395-400, 2007.

SKROVANKOVA, L.; MISURCOVA, L. MACHU. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants, **Adventury. Food Nutrition. Research**. v.67, p.75– 139, 2012.

TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL S.; LAMARDO, L. C. A.; CAMPOS, N. C.; JORGE, L. I. F.; GONZALEZ, E. Composição química e estudo anatômico dos frutos de buriti do Município de Buritizal, Estado de São Paulo.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.; CAVALCANTE, S. G. Avaliação in vitro do sêmen suíno diluído em BTS e na água de coco in natura e estabilizada. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v22, p.198-201, 1998.

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Seminal characteristics of Boer goat bucks as affected by months and seasons of the year. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ON GOATS, New Delhi, India, 1992. **Proceedings**. New Delhi, India, p.311, 1992.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. A., MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA J. ypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, v. 47, n. 4, p. 913-922, 1996.

VELOSO, C. C.; PEGLOW, K. **Plantas Mediciniais**. Porto Alegre: EMATER/ RS – ASCAR, 2003.

VIEIRA, R. F., AGOSTINI-COSTA, T. S., SILVA, D. B., SANO, S. M., FERREIRA, F. R., 2010. Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológica, 322 p.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H.; ISAU, Z. A.; DANILO CANEPPELE e MARCELO, C. LEAL. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features **Aquaculture Research**, v.42, p.858-865, 2011.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function of Reproduction, **Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.483- 492, 1981.

ZANATTA, C. F.; MITJANS, M.; URGATONDO, V.; ROCHA-FILHO, P. A. e VINARDELL, M. P. 2010. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p.70-75, 2010.

**CAPÍTULO 2 - Avaliação *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em diluente Tris contendo extrato bruto de *Mauritia flexuosa***

Pesquisa Agropecuária Brasileira (<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab>)

**Avaliação *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em diluente Tris contendo extrato  
bruto de *Mauritia flexuosa***

**In vitro evaluation of goat semen cryopreserved in Tris extensor increased by *Mauritia  
flexuosa* crude extract**

Dayana Maria do Nascimento (1), Ney Rômulo de Oliveira Paula (2)

(1) Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, Rodovia BR 135, km 3, Planalto Horizonte, 64900-000 - Bom Jesus, PI - Brasil, (2) Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Avenida Universitária, Ininga, 64049550 - Teresina, PI - Brasil, Telefone: (86) 3237-1246.

Resumo — Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato de *Mauritia flexuosa*, acrescido em solução Tris, sobre o sêmen caprino criopreservado. Foram utilizados quatro caprinos, das raças Gurguéia e Pardo alpino. A coleta foi utilizada pelo método de vagina artificial, totalizando dezenove ejaculados. Após o procedimento foi realizada a avaliação das características macro e microscópicas, seguido da diluição com os seguintes tratamentos: e GC (Tris gema), G5 (diluidor Tris+5% de extrato bruto de *Mauritia flexuosa*), G10 (diluente Tris+ 10% de extrato bruto de *Mauritia flexuosa*). Após diluição o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e criopreservado em aparelho automatizado TK 3000<sup>®</sup> em curva rápida, obedecendo às recomendações do fabricante, posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e, por fim, raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos. A cada semana as partidas eram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos e homogeneizadas para o teste de termo resistência (lento) nos tempos 0, 60, 120 e 180 para os parâmetros motilidade e vigor, além de avaliação da integridade da membrana e potencial mitocondrial. Houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), no Tempo 0, para o parâmetro motilidade entre os grupos GC e G10 bem como no tempo 60. Para o parâmetro vigor não houve nenhuma diferença entre os três grupos, controle, G5 e G10. Quanto aos parâmetros de integridade de membrana, também houve diferença entre os grupos GC ( $23,78 \pm 15,38$ ) e G10 ( $7,42 \pm 6,86$ ). Já no potencial mitocondrial não houve diferenças entre os grupos. Como conclusão, observou-se que o grupo controle contendo como diluidor a gema de ovo obteve os melhores resultados comparado aos grupos contendo diferentes concentrações de *Mauritia flexuosa*, contudo a presença de motilidade e vigor nos grupos que contêm o citado extrato demonstra que ainda pode torna-se uma alternativa viável na criopreservação de sêmen.

**Palavras chave:** *Mauritia flexuosa*, qualidade seminal, diluidor seminal.

**Abstract**

This study aimed to evaluate the effects of *Mauritia flexuosa* extract, increased by Tris solution on the goat semen cryopreserved. They used four goats Gurguía e Pardo Alpino clinically healthy. For the collection was used only artificial vagina, totaling ninety ejaculated. After collection was performed evaluating the macro and microscopic characteristics, followed by dilution with the following treatments: GC (Tris yolk), G5 (Tris extensor + 5% *Mauritia flexuosa* extract), G10 (Tris extensor + 10% *Mauritia flexuosa* extract). After diluting semen was packaged in 0.25 ml French straws and cryopreserved in appliance automated TK 3000®, subsequently, the pallets were immersed in liquid nitrogen (-196 ° C) and finally stored and placed on racks in cryogenics tanks. The pallets were thawed in a water bath at 37 ° C for 30 seconds, put into microtubes and homogenized for analysis of slow TTR, (RTD Test) and morphology. The integrity of the membrane and mitochondrial potential were analyzed by means of fluorescent probes in epifluorescence microscope. Data were analyzed using the ANOVA. The indices obtained from motility and vigor were evaluated by PROC GLM and when checked significance ( $p \geq 0,5$ ) proceeded to the Tukey test. In fresh semen, the physical characteristics remained within the established normal parameters. After thawing, the TTR was no significant difference in the control group (CG) and G10 in motility parameter until the time of 60 minutes, the plasma membrane and mitochondrial membrane respectively ( $16.05 \pm 9.06$   $1.73 \pm 0.56$ ). The groups containing flexuosa *Mauritia* extract showed positive results, as this work it is the pioneer using this fruit as semen cryoprotectant. The presence of motility and vigor in groups shows, it can still become a viable alternative in semen cryopreservation, however, more studies are needed.

**Keys words:** *Mauritia flexuosa*, semen quality, semen extensor.

## INTRODUÇÃO

A criação de caprinos tanto para leite quanto para corte no Brasil tem revelado resultados bem positivos, o que a coloca numa posição privilegiada dentro do cenário do agronegócio. Segundo dados recentes da Anualpec (2013), a região Nordeste do País retém o maior rebanho, cerca de 91%, em todo o território brasileiro, cerca de 9,379 milhões de cabeças (IBGE,2013).

Para que essas estatísticas sejam maximizadas, torna-se necessário incrementar a produção, desta forma, é imprescindível o aprimoramento de técnicas adequadas para preservação de sêmen, talvez este tenha sido um dos passos mais importantes no avanço da reprodução animal nas diferentes e inúmeras espécies e esta vem sendo alcançada pela aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas (Papa et. al., 2002). Apesar das muitas vantagens, ainda existem limitações quanto ao uso do sêmen criopreservado, um dos principais motivos está sobre poder fecundante dos espermatozoides congelados que é menor em comparação ao sêmen fresco (Salamon; Maxwell, 1995; Salamon; Maxwell, 2000; Anel; Alavarez; Martinez-pastor, 2006). Isto porque durante o processo de congelação podem ocorrer lesões à estrutura espermática, principalmente a desestabilização das membranas celulares. Danos que por muitas vezes são irreversíveis, diminuindo a viabilidade dos gametas (Holt, 2000).

Além disso, a criopreservação do sêmen caprino é um grande desafio (Purdy, 2006), visto que inclui uma elevada concentração de lipases pode interagir com os componentes mais comuns de criopreservação diluentes tais como os da gema de ovo (Roy, 1957) e do leite (Nunes, 1982).

A principal desvantagem em se utilizar um material de origem animal na constituição do diluidor para criopreservação é representada pelo risco sanitário da transmissão de doenças. Isso tem levantado limites nas legislações internacionais de transporte de sêmen de muitos países por causa de questões de biossegurança (Althouse, 2008).

Para tanto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para que a gema de ovo seja substituída, durante o processo de congelação, e os produtos vegetais vêm ganhando espaço. A fruta *Mauritia flexuosa* vem sendo bastante estudada na área da nutrição humana quanto as suas características nutricionais, a partir disto surgiu o interesse em analisar como a polpa do fruto funciona como um possível um crioprotetor e ou aditivo espermático. Portanto, devido à escassez de pesquisas recentemente desenvolvidas com esse tipo de extrato bruto de *Mauritia*

*flexuosa*, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade do sêmen caprino criopreservado em diluente Tris contendo extrato bruto de *Mauritia flexuosa*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Petrônio Portela, Cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil, situado às coordenadas geográficas 5° 03' 23.1'' de Latitude Sul e 42° 47' 27.9'' de Longitude Oeste, com altitude média de 72,7 metros. O mesmo foi submetido e aprovado na comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí com um número de protocolo nº 106/15.

O sêmen foi obtido a partir de quatro bodes das raças Pardo Alpina e Gurguéia, mantidos em baias individuais, inteiros, alimentados com volumoso Capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e concentrado peletizado (IRCA nutrição animal), sal mineral tortuga® e água *ad libitum*. Os ejaculados foram obtidos pela técnica da vagina artificial específica para pequenos ruminantes (figura 2) pré-aquecida a uma temperatura de 30°C acoplada a um tubo coletor graduado tipo *falcon* uma vez por semana, contabilizado um total de dezenove ejaculados, de acordo com o recomendado pelo manual do CBRA (2013).



**Figura 2.** Vagina artificial para coleta seminal de pequenos ruminantes.

Fonte: arquivo pessoal

Após coleta as amostras foram acondicionadas em banho-maria à temperatura de 37°C e mantidas nessa temperatura durante todo o processo de análise. Os parâmetros também foram avaliados quanto ao volume, aspecto e coloração. Para avaliação microscópica, uma alíquota

de 5µL de sêmen fresco foi colocada entre uma lâmina, para verificar-se o turbilhamento (escala de 0-5) e utilizando uma lamínula, previamente aquecida em placa aquecedora a 37°C, para avaliação em microscópio óptico (aumento de 100X e 400X) da motilidade espermática progressiva, expressa em percentagem (0 a 100), e do vigor espermático, numa escala de 0 (imobilidade) a 5 (rápida mobilidade), de acordo com a metodologia empregada e recomendada pelo manual do CBRA (2013). Para a realização da análise morfológica foram confeccionadas lâminas com esfregaço da amostra do sêmen dos bodes, em seus respectivos grupos e, posteriormente, coradas pelo método Panótico® rápido. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 x e, posteriormente, contados 200 espermatozóides por lâmina.

O diluente padrão utilizado neste experimento foi constituído por Tris, frutose, ácido cítrico, glicerol e gentamicina, respectivamente (Quadro 1). Os dois diferentes diluentes testados foram preparados adicionando 5% e 10 % de extrato bruto de *Mauritia flexuosa*, e um diluente contendo 20% de gema de ovo como tratamento controle.

**Tabela 1.** Composição do meio diluente seminal Tris-gema.

<b>Constituintes</b>	<b>Quantidades</b>
TRIS	3,786
Ácido cítrico mono hidratado	2,11
Frutose	1 g
Gentamicina	40 mg
Gema	20%
Glicerol	7%

Para o preparo do diluente vegetal, foi utilizado 20g do extrato bruto desidratado (Figura 3) e triturado, em 100mL de solução de citrato de sódio a 5% mantido resfriado. A amostra foi filtrada, centrifugada por 10 minutos e utilizado apenas o sobrenadante (figura 4).



**Figura 3.** Polpa desidratada de *Mauritia flexuosa*

Fonte: arquivo pessoal



**Figura 4.** Amostra do extrato diluído em citrato após centrifugação

Fonte: arquivo pessoal

Os ejaculados reunidos foram divididos em três alíquotas de igual volume e conservados em banho-maria para a adição das duas concentrações do extrato, já preparado anteriormente, de *Mauritia flexuosa* (5%, 10% e o diluente controle contendo gema de ovo) com uma concentração final de  $100 \times 10^9$  espermatozoides/mL. As amostras diluídas foram envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL, e lacradas utilizando álcool polivinílico.

Para o processo de criopreservação foi utilizado o aparelho TK3000<sup>®</sup> (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante, utilizando a curva rápida (0,5°C/min até 5°C, -15°C/min até -20°C e -10°C/min até -120°C), sendo

posteriormente imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e, por fim, raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos. Após uma semana de conservação, cada amostra foi descongelada individualmente a 37°C durante 30s em banho-maria para a avaliação em TTR e análise de membranas plasmática e mitocondrial.

Para a análise da integridade da membrana plasmática (IMP) foram utilizadas sondas fluorescentes a base de diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP), sendo diluídos 50µL de sêmen em 15µL da solução de trabalho composta por: 5 µL de carboxifluoresceína e 10 µL de iodeto de propídio. Para análise do potencial mitocondrial, foi utilizado a sonda JC-1, sendo adicionado 50 µL de sêmen em 5 µL da solução preparada de JC-1. Após o preparo da lâmina (cerca de 10 minutos após) com os marcadores fluorescentes, os espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência em sala com iluminação controlada (aumento de 100x). Foram avaliados 100 espermatozoides, os quais foram classificados como íntegros, quando a cabeça do espermatozoide encontrava-se com a coloração verde, e lesados, quando observado uma coloração vermelha (Harrison e Vickers, 1990).

No tocante a análise estatística, os índices obtidos de motilidade, vigor, morfologia, integridade da membrana plasmática e mitocondrial foram avaliados pelo PROC GLM do SAS (Software Statistical Analysis System for Windows SAS® (SAS, 2001) e quando verificada significância ( $p \leq 0,5$ ) procedeu-se o teste de Tukey.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em estudos sobre as características físico-químicas do extrato de *Mauritia flexuosa*, esta fruta possui um excelente valor nutricional, que vai desde a presença de vitaminas, lipídios e minerais, além do que, é uma fruta largamente disponível no estado do Piauí, Brasil, e que participa da renda de inúmeras famílias de agricultores, pois praticamente tudo deste fruto pode ser aproveitado.

As características macroscópicas e microscópicas do sêmen fresco estão sumariadas na tabela 1. Como observado, somente o parâmetro turbilhonamento não está dentro dos padrões da normalidade para a espécie caprina.

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão de parâmetros do sêmen fresco de caprinos das raças Gurguéia e Pardo Alpina.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média<math>\pm</math> desvio padrão</b>	<b>Referência (CBRA,2013)</b>
Volume (mL)	0,85 $\pm$ 0,32	0,8
Concentração (sptz/mL)	7,49 $\pm$ 2,74 X 10 <sup>9</sup>	2x10 <sup>9</sup>
Turbilhonamento (0-5)	2,47 $\pm$ 0,60	3
Motilidade (0-100%)	71,31 $\pm$ 5,34	80%
Vigor (0-5)	3,21 $\pm$ 0,41	3

A média do volume seminal encontrado foi de 0,8 mL. Estes valores estão de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Dados semelhantes também são descritos por Hafez (2004), de forma que o autor afirma que o volume normal para a espécie caprina varia de 0,2 a 2 mL, e para os animais da raça Pardo Alpina (animais utilizados neste experimento), este volume varia de 0,6 a 1,3 mL (Karatzas et al., 1997; Rovay, 2006; Santos et al., 2006), corroborando com os valores deste experimento.

Entretanto, quanto à característica turbilhonamento, a média encontrada (2,47 $\pm$  0,60) foi considerada um pouco abaixo dos parâmetros estabelecidos. Fato como esse pode ter ocorrido devido ao estresse térmico, causado pelas altas temperaturas da região, durante o período experimental, mesmo nas primeiras horas da manhã. O estresse provocado pelas elevadas temperaturas ambientais também interfere na função reprodutiva do macho caprino (Silva et al., 2005). A temperatura ambiente é o fator de maior importância na espermatogênese dos machos de qualquer espécie e, quando muito elevada, em torno de 34,5°C é prejudicial tanto nas fases de formação dos espermatozoides quanto nas células já formadas e em trânsito pelo epidídimo (Mies Filho, 1987).

A elevação da temperatura ambiental também provoca um aquecimento dos testículos, conseqüentemente, um aumento do metabolismo e da demanda de oxigênio pelas células, porém seu fluxo sanguíneo é limitado, tornando-se incapaz de suprir essa demanda, resultando, portanto, em hipóxia seguida de degeneração seminal (Setchell, 1998), redução na fertilidade do macho (Hulet et al., 1956), alterações na síntese de proteínas e expressão de genes nas células germinativas e de Sertoli (Kumagai et al., 2000).

Nas características microscópicas, motilidade e vigor as médias encontradas 71,1 e 3,21 respectivamente, também se encontram dentro dos parâmetros pré-estabelecidos para a espécie.

As médias  $\pm$  desvio padrão do parâmetro morfologia do sêmen descongelado dos grupos controle (GC), G5 e G10 estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão do perfil morfológico do sêmen descongelado dos grupos controle e dos demais grupos contendo extrato bruto de *Mauritia flexuosa*.

<b>Grupos</b>	<b>GC</b>	<b>G5</b>	<b>G10</b>
Espermatozóides normais (%)	91,7 $\pm$ 6,89	88,5 $\pm$ 20,18	89,39 $\pm$ 19,64
Espermatozóides com defeito de flagelo (%)	8,3 $\pm$ 0,76	11,5 $\pm$ 0,87	10,61 $\pm$ 0,78

(GC=Grupo controle/ G5=Grupo com 5% de extrato de *Mauritia Flexuosa*/ G10=Grupo com 10% de *Mauritia Flexuosa*).

Os únicos defeitos visualizados na morfologia espermática foram os relacionados aos defeitos maiores, principalmente cauda enrolada, o fato da visualização somente deste tipo de defeito pode estar relacionado ao uso do corante, que de certa forma dificultou a visualização de outras partes da célula espermática.

A associação entre motilidade pós-descongelação e as patologias de cauda pode ser atribuída ao aumento da retenção de citoplasma residual, uma vez que segundo Nichi et al. (2007) as gotas citoplasmáticas podem proteger o espermatozoide contra o efeito dos ROS devido a um maior conteúdo de antioxidantes enzimáticos que podem estar presentes no citoplasma residual.

Quanto aos parâmetros normais, segundo o CBRA (2013), o mesmo sugere que o somatório dos defeitos maiores e menores deve ser apresentado como defeitos totais, sendo considerado como critério de aprovação do reprodutor, quando este valor não exceder a 20%, ou quando o número de um mesmo defeito não exceder a 10%.

Os resultados das médias  $\pm$  desvio padrão do TTR (Teste de Termoresistência) pós-descongelamento das amostras, estão expressos na tabela 3. Houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), no Tempo 0, para o parâmetro motilidade entre os grupos GC e G10; entre os demais grupos e parâmetros não foi possível observar diferença significativa. No tempo 60 minutos, também foi observada diferença entre os grupos GC e G10, não diferindo entre dos demais grupos. Por último, nos tempos 120 e 180 minutos não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados. Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), é desaconselhável utilizar-se de sêmen com motilidade e vigor inferiores a 30% e 3, respectivamente, após incubação da amostra descongelada a 37 °C por três horas. Resultados semelhantes foram descritos por Sonmez e Demirci (2004), utilizando ácido ascórbico, ao diluidor de sêmen Tris-gema, concluindo que este promove um efeito negativo na

congelabilidade do sêmen ovino contendo diferentes proporções de glicerol, 3%, 5% e 7% sobre a motilidade, integridade do acrossoma e patologias espermáticas.

**Tabela 4.** Média  $\pm$  desvio padrão do TTR lento (teste de termo resistência T0-T180) após o descongelamento do sêmen de bodes contendo ou não de extrato de *Mauritia flexuosa*.

<b>GC</b>	<b>Tempo 0 min</b>	<b>Tempo 60 min</b>	<b>Tempo 120 min</b>	<b>Tempo 180 min</b>
Motilidade (%)	10,78 $\pm$ 10,30a	6,57 $\pm$ 8,50a	2,63 $\pm$ 5,37a	0,52 $\pm$ 1,57a
Vigor (0-5)	1 $\pm$ 0,68a	0,69 $\pm$ 0,67a	0,26 $\pm$ 0,45a	0,10 $\pm$ 0,31a
<b>G5</b>	<b>Tempo 0 min</b>	<b>Tempo 60 min</b>	<b>Tempo 120 min</b>	<b>Tempo 180 min</b>
Motilidade (%)	4,47 $\pm$ 7,97b	3,16 $\pm$ 6,29a	0,79 $\pm$ 2,50a	0,27 $\pm$ 1,14a
Vigor (0-5)	0,52 $\pm$ 0,70a	0,31 $\pm$ 0,58a	0,10 $\pm$ 0,31a	0,05 $\pm$ 0,22a
<b>G10</b>	<b>Tempo 0 min</b>	<b>Tempo 60 min</b>	<b>Tempo 120 min</b>	<b>Tempo 180 min</b>
Motilidade (%)	3,42 $\pm$ 5,29 b	1,05 $\pm$ 2,68b	0,52 $\pm$ 1,58a	-
Vigor (0-5)	0,48 $\pm$ 0,61b	0,16 $\pm$ 0,38b	0,10 $\pm$ 0,31a	-

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ( $p > 5$ ), pelo teste de Tukey. (GC=Grupo controle/ G5=Grupo com 5% de extrato de *Mauritia Flexuosa*/ G10=Grupo com 10% de *Mauritia Flexuosa*).

Apesar de os tratamentos GC e G10 respectivamente (10,78 $\pm$  10,30, 3,42 $\pm$ 5,29) terem apresentado diferença significativa no tempo 0 de descongelação, o GC contendo Tris gema foi o que obteve maior média comparados aos demais grupos, como também foi o que apresentou maior persistência e diminuição menos abrupta dos parâmetros motilidade em relação aos outros tratamentos. No entanto, o período de sobrevivência do sêmen em todos os tratamentos não ultrapassou o tempo de 120 minutos após a descongelação. Santos et al. (2001) utilizando um diluente à base de gema de ovo (Tris-citrato-gema de ovo) na congelação do sêmen de caprinos, observaram comportamento semelhante, com a diminuição de motilidade após os primeiros 30 minutos no TTR. Esses resultados demonstram claramente um protocolo de congelamento ineficiente em todos grupos.

Outro fator que bem como pela presença de um teor elevado de água da polpa de *Mauritia flexuosa*, fato que pode ter influenciado a entrada de uma maior quantidade de fluído para o interior da célula espermática no processo de descongelação causando possível ruptura da membrana plasmática. Felows (2006) afirma que a atividade de água é um fator importante para o controle na taxa de deterioração do produto; geralmente alimentos com atividade de água superior a 0,95 estão classificados como alimentos frescos altamente perecíveis por isso tendem a se deteriorar rapidamente.

Outra hipótese a ser analisada trata-se da média do turbilhonamento (2,47 $\pm$  0,60) pode ter contribuído drasticamente para o grande número de espermatozoides inviáveis após a criopreservação. Não conferindo com o resultado encontrado por Oliveira et al., (2011), avaliando espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101<sup>®</sup>) ou TRIS, onde em 5 minutos obteve a motilidade total de 54,6 no tratamento à base de TRIS.

No momento da criopreservação propriamente dita, existe relação estreita entre a velocidade de congelamento e o aparecimento de lesões celulares. À medida que a velocidade de congelamento aumenta o índice de sobrevivência celular também aumenta após o descongelamento, até um ponto ótimo, em que a sobrevivência espermática é máxima. A partir desse ponto, com o aumento da velocidade de congelamento, a perda celular torna-se grande devido à formação de cristais de gelo no interior das células, promovendo lesões mecânicas à microestrutura das membranas e organelas (Ohashi, 2002; Luz et al., 2011).

A curva utilizada em nosso experimento tratou-se da curva rápida (0,5°C/min até 5°C, -15°C/min até -20°C e -10°C/min até -120°C), isto pode ter influenciado na deterioração espermática, corroborando com o que foi descrito por Luz et al. (2011).

Quando as células são congeladas, as mesmas são submetidas a diversas tensões, tais como choque ao frio, o stress oxidativo e susceptibilidade à peroxidação lipídica causando danos para a membrana do plasma durante o processo de congelação-descongelação (Anghel et al., 2010). Estes fatores podem levar ao comprometimento de funções espermáticas, tais como a motilidade dos espermatozoides, a integridade da membrana funcional e fertilidade, o extravasamento de enzimas intracelulares e danos ao DNA (Aitken, 1984, Alvarez e Storey de 1989; Aitken et al., 1993).

**Tabela 5.** Médias± desvio padrão dos testes de fluorescência para a integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial dos Grupos experimentais (Controle, G5 e G10).

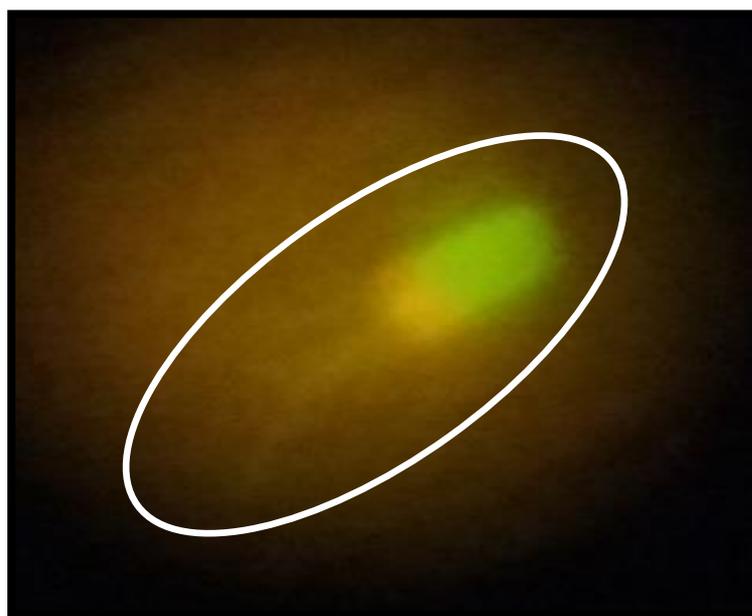
Parâmetros Avaliados	Grupos Experimentais		
	GC	G5	G10
SPTZ com membrana íntegra	23,78±15,38a	14,42± 22,03a	7,42± 6,86b
SPTZ com potencial mitocondrial	14,10± 15,47a	12,31±9,15a	11,05 ± 11,70a

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ( $p>5$ ), pelo teste de Tukey. (GC=Grupo controle/ G5=Grupo com 5% de extrato de *Mauritia flexuosa*/ G10=Grupo com 10% de *Mauritia flexuosa*). SPTZ=espermatozoides.

A mensuração do potencial de membrana mitocondrial é realizada, especificamente com o objetivo de predizer o risco dos espermatozoides sofrerem morte celular programada, uma vez que a interrupção deste parâmetro é considerada como o primeiro sinal de estresse, induzido pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Marchesi e Feng, 2007). Não há nenhuma evidência, a nosso conhecimento, sobre o efeito do extrato bruto de *Mauritia flexuosa* especialmente no padrão de atividade mitocondrial e estado apoptose dos espermatozoides de mamíferos. Vale ressaltar que o presente estudo foi o pioneiro avaliando o efeito deste extrato sobre os parâmetros pós-descongelação de espermatozoides caprino.

A integridade da membrana plasmática, bem como mitocôndrias com alto potencial de membrana estão relacionados a espermatozoides com boa motilidade, de modo que nesse experimento os resultados dos parâmetros motilidade e vigor estão correlacionados com os obtidos no potencial de membrana mitocondrial, ambos os valores encontrados estão. A queda de potencial mitocondrial foi associada à ativação de vias apoptóticas, mediadas pela liberação de citocromo e das mitocôndrias (Aly, 2013).

Os percentuais médios de espermatozoides com membrana plasmática íntegra foram  $23,79 \pm 15,3$ ,  $7,42 \pm 6,83$  para o grupo controle e o grupo G10 respectivamente para o teste de fluorescência (Figura 5). O grupo controle proporcionou um maior percentual de espermatozoides com a membrana plasmática intacta. Entretanto esses valores ainda estão bem abaixo dos encontrados por outros autores. A criopreservação afetou de forma drástica o percentual de células viáveis, observada pelo método das sondas fluorescentes, com redução no percentual de células viáveis no sêmen criopreservado ( $p < 0,05$ ), independente do crioprotetor utilizado (Tris gema, Tris+ 5% de extrato de *Mauritia flexuosa* e Tris+10% de *Mauritia flexuosa*). Os espermatozoides são especialmente vulneráveis à propagação da peroxidação lipídica devido à abundância de ácidos graxos poli-insaturados (Watson, 1995). De acordo com Salamon e Maxwell (1995), apenas 20-30% das células espermáticas permanecem íntegras após o descongelamento.



**Figura 5.** Espermatozóide com membrana plasmática intacta, avaliado pelo teste de fluorescência com Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de propídio usando filtro com excitação de 492 nm e emissão de 517 nm (40x).

Fonte: Arquivo Pessoal

Peterson et al. (2007) utilizaram uma combinação de sondas fluorescentes SYBR<sup>®14</sup>/IP para avaliar a integridade da membrana de espermatozoides caprinos e relataram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis. Porém, Coletto et al. (2002) utilizando a combinação de diacetato de carboxifluoresceína (DCF) com iodeto de propídio (PI) para avaliação da viabilidade espermática de caprinos demonstraram baixa correlação entre a técnica de fluorescência e a motilidade e o vigor espermático ( $r= 0,1403$ ). Os resultados citados acima corroboram com os valores encontrados em nossa análise; a correlação entre a integridade de membrana e a motilidade espermática, ambas abaixo dos valores aceitáveis para fertilização.

## CONCLUSÃO

Observou-se que o grupo controle contendo como diluidor a gema de ovo obteve os melhores resultados comparado aos grupos contendo diferentes concentrações de *Mauritia flexuosa*, contudo a presença de motilidade e vigor após descongelação nos grupos que contêm o citado extrato sugere que ainda pode torna-se uma alternativa viável na criopreservação de sêmen.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing steps of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, n.1160- 1172, 2004.
- AITKEN, R.J., BUCKINGHAM, D., HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**,v.97,p. 441–450.
- AITKEN, R. J. Pathophysiology of human spermatozoa. **Current Opin Obstet Gynecology**, v.6, p.128–135, 2003.
- ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction Domestic Animal**, v43, p.374–8, 2008.
- ALVAREZ, J. G., STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v. 23, p.77–90, 1989.
- ALY, H. A. A.; AROCIOR. Induce oxidative stress and mitochondria mediated apoptosis in adult rat sperm in vitro. **Environ Toxicol Pharmacol**v. 36, p.273,83, 2013.
- ANEL, L.; ALAVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.30-42, 2006.

ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2011.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; ULUTAS, P. A. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 81, p. 13-17, 2009.

C.S. MOURA, C. S.; NUNES, A. K. S.; SILVA, B.S, PEIXOTO, C.; SILVA, A.R.; SILVA, GUERRA, M.M.P. Efeito da temperatura de descongelamento na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**. Zootec., v.65, n.4, p.1057-1064, 2013.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen caprino. **Acta Vetrinaria Brasília**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 3ª Ed., Belo Horizonte, 2013.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M. M. P; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, p. 101-104, 2002.

EVANS G, MAXWELL W.M.C. Frozen storage of semen. In: Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Wellington: Butterworths, p. 122-141, 1987.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 1 ed. Porto Alegre, Artmed, 2006, 602 p.

HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed., Barueri-SP: Manole, 2004, 513p.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343–352, 1990.

HULET, C.V.; VOIGTLANDER, H.P.; POPE, A.L. The nature of early season infertility in sheep. **Journal Animal Science**, v.15, p.607- 615, 1956.

KUMAGAI, J.; FUKUDA, J.; KODAMA H. Germ cell-specific shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. **Europe Journal Biochemical**, v.267, p.3073-3078, 2000.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativa e embriões. **Acta Scientiae Vetrinariae**, v. 39, n. 2, 2011.

MIES FILHO A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v.1, 364p.

MOORE, C. R. Heat application and degeneration testicular; the function of the scrotum. **Animal Journal Anatomy**, v.34, p.337-349, 1924.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DECLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets

on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-340, 2007.

NUNES, J. F. A inseminação artificial em caprinos no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 12, p. 85-91, 1988.

OHASHI, O. M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002, p.340.

PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELL'AQUA Jr. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 26, p. 184-191, 2002.

PETERSON K, KAPPEN MAPM, URSEM PJF, NÖTHLING JO, COLENBRANDER B, GADELLA BM. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AIbucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v. 67, p. 863-871, 2007.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v.179, p.318-319, 1957.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SANTOS, A.D.F.; TORRES,C.A.A.; FONSECA,J.F.;BORGES,A.M.; COSTA, E.P, GUIMARÃES, J.D. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p.1934-42, 2006.

SANTOS, E.A.; TEIXEIRA, D.I.A.; LOPES JUNIOR, E.S. Características seminais, perímetro escrotal e comportamento sexual de bodes Saanen explorados em região litorânea do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 218-9, 2001.

SETCHELL, B.P. The parkers lecture: heat and testis. **Journal Reproduction Fertility**, v.114, p.179-194, 1998.

SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. **Journal. Veterinary Animal Science**, v. 28, p. 893-899, 2004.

## ANEXO 1



### PREPARO DO DILUENTE SEMINAL

Identificação do Animal: \_\_\_\_\_

Grupos	TRIS	EXTRATO	GEMA	TOTAL
G5				
G10				
GC				

### ANÁLISE MACROSCÓPICA

Coleta \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<b>Volume:</b>	
<b>Aspecto:</b>	
<b>Turbilhonamento:</b>	
<b>Motilidade:</b>	
<b>Vigor:</b>	

<b>Concentração:</b>					
<b>Quadrados:</b>					
<b>TOTAL:</b>					

### CÁLCULOS

$C1V1=C2V2$   
C. V. M/10

Total de Diluente: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

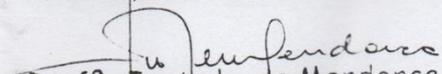


### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação *in vitro* do sêmen caprino criopreservados em Solução Tris acrescido de extrato de *Mauritia Flexuosa* em diferentes concentrações**", protocolo nº 106/15, sob a responsabilidade de **NEY RÔMULO DE OLIVEIRA PAULA**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 da 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 23/10/2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/ 2015 à Fevereiro/ 2016
Espécie/Linhagem	Caprinos
Nº de Animais	04
Peso/ Idade	---/---
Sexo	Machos
Origem	Animais alojados no Setor de Reprodução animal, localizado na UFPI, Campus Ministro Petrônio Portela no CCA, Teresina-Piauí.

Teresina, 23 de Outubro de 2015.

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