



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

**EFICIÊNCIA DO DILUENTE TRIS SUPLEMENTADO COM  
ÓLEO DE *MAURITIA FLEXUOSA* SOBRE A QUALIDADE DO  
SÊMEN CAPRINO APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

**DANILO DE SOUSA LIMA**

Bom Jesus – PI

2016

**DANILO DE SOUSA LIMA**

**EFICIÊNCIA DO DILUENTE TRIS SUPLEMENTADO COM  
ÓLEO DE *MAURITIA FLEXUOSA* SOBRE A QUALIDADE DO  
SÊMEN CAPRINO APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

**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

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**Título: eficiência do diluente *tris* suplementado com óleo de *mauritia flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após criopreservação**

Autor: M.V. Danilo De Sousa Lima

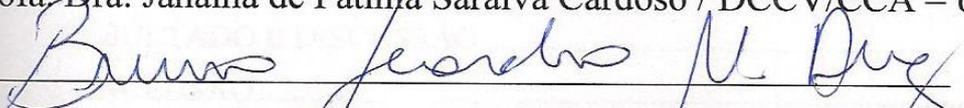
Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

Avaliada em: 31 /08 /2016

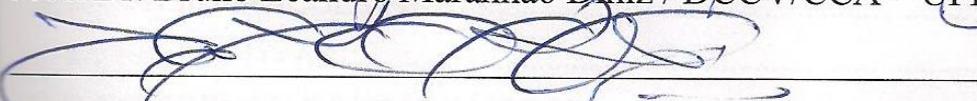
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Janaína de Fátima Saraiva Cardoso / DCCV/CCA – UFPI - Membro



Prof. Dr. Bruno Leandro Maranhão Diniz / DCCV/CCA – UFPI - Membro

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

Bom Jesus – PI

2016

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	8
ABSTRACT.....	9
1.INTRODUÇÃO .....	10
CAPITULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 Biologia espermática.....	15
2.2 Criopreservação de sêmen .....	16
2.2.1 Crioinjúrias .....	17
2.3 Diluidores para congelação seminal .....	19
2.5 Mauritia Flexuosa .....	22
2.6 Testes para avaliação da fertilidade espermática .....	23
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 2 – Eficiência do diluente tris suplementado com diferentes concentrações de óleo de mauritia flexuosa sobre a qualidade do sêmen caprino após a criopreservação. .....	31
1. INTRODUÇÃO .....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	32
4. CONCLUSÃO .....	37
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
6. PERSPECTIVAS .....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características seminais (Médias  $\pm$  Desvio padrão) pós-descongelamento do sêmen de bodes acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa*. 34
- Tabela 2.** Características seminais para integridade de membrana plasmática, integridade mitocondrial e integridade do acrossoma, pós-descongelamento de espermatozoides caprinos acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa*. 35
- Tabela 3.** Características seminais por animal e avaliação da integridade dos espermatozoides através do uso de sondas fluorescentes. 38

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Avaliação da Integridade de membrana através do uso de sondas fluorescentes. 37
- Figura 2.** Avaliação da Integridade mitocondrial através do uso de sondas fluorescentes. 37

## LISTAS DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
ACP	Água de coco em Pó
CFD	Diacetato de carboxifluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Etilenoglicol
GLY	Glicerol
Host	Teste hiposmótico
IP	Iodeto de propideo
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Potencial de hidrogeniônico
SAS	Software Statistical Analysis
IA	Inseminação Artificial
TRIS	Tris hidroximetil aminometano
CFDA	Diacetato de Carboxifluresceina
IP	Iodeto de Propídeo
CASA	Computer-assisted semen analysis
JC1	Mitochondrial Membrane Potential

## RESUMO GERAL

**LIMA D. S. Eficiência do diluente Tris suplementado com óleo de *Mauritia Flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após criopreservação. 2016. p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2016.**

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do uso do Tris suplementado com óleo de *Mauritia Flexuosa* como diluentes para criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados quatro caprinos, com idade média de 4 anos, clinicamente saudáveis e com escore de condição corporal 3,5 numa escala de (0-5). Os animais eram alimentados diariamente com volumoso (capim elefante), concentrado (ração peletizada, 300g/animal/dia) e sal mineral a vontade. Foi coletado 64 ejaculados dos quatro bodes utilizados. A coleta do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39°C e acoplada a um tubo coletor graduado recomendada pelo manual do CBRA (2013). Foram realizadas coletas em duas etapas. Primeiro foi realizado um teste de toxicidade no total de trinta e duas coletas, sendo oito ejaculados de cada animal, os ejaculados foram avaliados com a adição de 5%, 10%, 15%, 20% de diluente a base de óleo de *Mauritia flexuosa*. Após o teste de toxicidade, foi escolhido a concentração que apresentou o melhor resultado. Logo após, foram realizadas mais trinta e duas coletas, que foram diluídos em Tris-gema-glicerol (grupo controle) GC ou diluente contendo óleo vegetal (*Mauritia flexuosa*) GB. As amostras foram criopreservadas com auxílio do aparelho Tk3000®. Posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijões criogênicos. Após o período mínimo de uma semana as partidas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos tipo *ependorf* e homogeneizadas para a análise imediata de motilidade, vigor espermático e morfologia. Em seguida foram avaliadas as integridades do acrossomo, através de sondas florescentes (FITC-PNA), membrana plasmática (Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propideo) e função mitocondrial (JC-1) sob microscopia de epifluorescência. Os dados foram analisados empregando-se o programa BIOESTAT 5,0. Foram realizadas as análises estatística através do software SAS (ANOVA) e para comparação de médias usado o teste de Tukey a 5%.

**Palavras chaves:** caprinos, *Mauritia flexuosa*, sêmen

## **ABSTRACT**

**LIMA D. S. Efficiency Tris diluent supplemented with oil concentrations on the quality of goat semen after cryopreservation. 2016 Thesis ( Ms in Zootecchnisc) - Federal University of Piauí, Bom Jesus, in 2016.**

The aim of this study was to investigate the effects of Tris use supplemented with *Mauritia Flexuoxa* oil as thinners for goat semen cryopreservation. four goats were used, with an average age of 4 years old, clinically healthy and body condition score 3.5 on a scale of (0-5). The animals were fed daily with roughage (elephant grass), concentrate (pelletized feed, 300g / animal / day) and mineral salt will. Totaling 64 ejaculates of the four goats used. The semen collection was performed with the aid of a specific artificial vagina to small ruminants, preheated to an average temperature of 39 ° C and coupled to a collector tube graduate recommended by the CBRA manual (2013). Sampling was carried out in two stages. First we conducted a toxicity test in total of thirty-two samples, eight ejaculates from each animal, the ejaculates were evaluated with the addition of 5%, 10%, 15%, 20% diluent *Mauritia* oil based flexuoxa . After the toxicity test, the concentration was chosen that showed the best result. Soon after, most were held thirty-two collections, which were diluted in Tris-egg yolk-glycerol (control group) or GC diluent containing vegetable oil (*Mauritia flexuoxa*) GB. Samples were cryopreserved with the aid of Tk3000® device. Subsequently, the vanes raqueadas were immersed in liquid nitrogen (-196 ° C) and stored in cryogenic cylinders. After the minimum period of one week matches were thawed in a water bath at 37 ° C for 30 seconds, put up in microtubules Ependorf and homogenised for immediate analysis of motility, sperm vigor and morphology. Then we assessed the integrity of the acrosome through fluorescent probes (FITC-PNA), plasma membrane (Carboxifluoresceina diacetate and propidium iodide) and mitochondrial function (JC-1) under microscopy epifluorescencia.

**Keywords:** goats, *Mauritia Flexuoxa*, *semem*

## 1.INTRODUÇÃO

A caprinocultura apresenta importante papel econômico-social para a região Nordeste, por suprir as populações de baixa renda com proteína de alto valor biológico. Apesar do baixo nível tecnológico ainda presente em todo processo produtivo, a caprinocultura de corte e leite no Brasil tem apresentado resultados produtivos positivos. A caprinocultura tem crescido bastante nos últimos anos como um ramo economicamente rentável, sendo a região Nordeste o local de maior concentração de caprinos no Brasil, totalizando 90,3% do efetivo nacional (ANDRIOLI et al., 2002; IBGE, 2012).

O sêmen de boa qualidade é um dos fatores de fundamental importância para o sucesso da inseminação artificial, por isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. O processo de criopreservação promove diversas alterações estruturais e funcionais no espermatozoide, podendo comprometer a viabilidade das células pós-descongelamento, devido ao gradiente osmótico gerado entre o meio intra e extracelular, que podem resultar em danos a membrana plasmática e acrossomal, bem como a outras estruturas espermáticas (HASHIDA et al., 2005). O desenvolvimento de técnicas de congelamento evoluiu progressivamente ao longo dos últimos 60 anos. Inúmeros diluidores e procedimentos de congelamento têm sido descritos em diferentes espécies animais especialmente em bubalinos (MARTIN, 2004) caprinos (JIMENEZ-RABADANAN et al., 2013) e ovinos (AISEN, 2002). Em geral, poucos avanços foram obtidos em relação aos componentes dos diluentes seminais desde a incorporação da gema de ovo ou leite (crioprotetor não penetrante), glicerol (crioprotetor penetrante) para a proteção dos espermatozoides durante a refrigeração e congelamento (DELL VALLE et al., 2013).

O Brasil apresenta uma grande diversidade de frutas nativas, com características sensoriais peculiares e alto potencial nutricional e econômico (RUFINO et al., 2010). O buriti (*Mauritia flexuosa* L.) é um fruto silvestre encontrado principalmente nas margens dos rios e áreas úmidas do Piauí, Amazônia e do Cerrado brasileiro (ALMEIDA, 1998). Composto por antioxidantes, sendo considerados fonte de carotenóides, ácido ascórbico, compostos fenólicos, possuindo ainda atividades bactericida (MELO et al, 2008; SILVEIRA et al., 2005). Nesta perspectiva, o buriti (*Mauritia flexuosa*) possuindo, características que o qualificam com potencial para o desenvolvimento de diluentes seminais e/ou meios de conservação celulares, objetivou-se avaliar a eficiência do diluente Tris suplementado com diferentes concentrações de óleo de *Mauritia Flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após a criopreservação.



## **CAPITULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**Elaborada de acordo com as normas da Revista Animal Brasileira  
de Reprodução animal:**

**(<http://www.cbpa.org.br/portal/index.htm>)**

# **Uso de lipídios de origem vegetal como alternativa para criopreservação espermática**

Use of lipid plant origin as an alternative to sperm cryopreservation

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**Danilo de Sousa Lima, Ney Rômulo de Oliveira Paula**

### **Resumo**

O uso de sêmen criopreservado em programas de reprodução em caprinos ainda depende de desenvolvimento tecnológico na busca de eficácia, considerando principalmente os aspectos relacionados ao custo-benefício, simplicidade, possibilidade de repetição e promoção do bem-estar animal. O uso do sêmen criopreservado se destaca entre as técnicas aplicadas por conservar a capacidade fecundante do sêmen por longos períodos de armazenamento, contribuindo significativamente em programas de melhoramento genético. A necessidade do uso de reprodutores por longos períodos ou em diferentes épocas do ano estimula a pesquisa sobre a conservação de sêmen sob condições artificiais, tornando-se fundamental a utilização de meios diluentes capazes de prolongar sua viabilidade. No Brasil, a utilização de diluentes alternativos parece ser a solução para a adoção da inseminação artificial pelos pequenos produtores, já que a dose de sêmen, principalmente importada, custa caro, e mesmo assim, também possui riscos de veiculação de contaminantes pelos diluidores empregados. Diversos países, diante do risco de introdução de doenças exóticas, têm buscado por diluentes que não contenham substâncias de origem animal, demonstrando a necessidade de garantir elevada segurança sanitária nos processos biológicos. Com isso evidencia-se os motivos ao qual procura-se por novos diluentes e crioprotetores que sejam livres de contaminantes, em consequência inúmeras substâncias vegetais vêm sendo estudadas.

**Palavras-chave:** criopreservação, sêmen, óleo, diluidor seminal

## **Abstract**

The use of cryopreserved semen breeding programs in goats still depends on technological development in the search for efficiency, especially considering the aspects related to cost-effectiveness, simplicity, possibility of repetition and promotion of animal welfare. The use of cryopreserved semen stands out among the techniques used to preserve the fertilizing capacity of sperm for long periods of storage, significantly contributing in breeding programs. The need to use players for long periods or at different times of year encourages research into the conservation of semen under artificial conditions, making it essential to use thinners means able to extend its viability. In Brazil, the use of alternative thinners appears to be the solution to the adoption of artificial insemination by small producers, since the dose of semen, mainly imported, expensive, yet also has risks serving contaminants by diluting employees. Several countries, faced with the risk of introducing exotic diseases, have sought for diluents which do not contain substances of animal origin, demonstrated the need to ensure high food safety in biological processes. It is evident that the reasons for which demand is for new diluents and cryoprotectants that are free of contaminants as a result many plant substances have been studied.

Keywords: cryopreservation, sêmen, lipid, seminal diluent

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Biologia espermática*

O espermatozoide é a célula reprodutiva masculina produzida pelos testículos, capaz de fertilizar o ovócito, a célula reprodutiva feminina, e formar o zigoto, dando origem a um novo organismo, a vida. O espermatozoide é uma célula diferenciada, normalmente composta pelas regiões da cabeça, da peça intermediária e da cauda. A região da cabeça é dividida em quatro sub-regiões (apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial), formada por três membranas (plasmática, acrossomal e nuclear), algum citoplasma e pelo material nuclear, no qual estão presentes os cromossomos masculinos, necessários para o processo de fertilização (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O espermatozoide possui uma cabeça achatada e alongada, que possui a função de armazenamento do material genético; de um colo que conecta a cabeça à cauda; o flagelo, que os impulsiona através de um meio aquoso, e o plasma seminal (PAULA et al., 2008).

Toda a estrutura básica do espermatozoide se forma durante a espermatogênese, período em que essas células possuem no citoplasma organelas essenciais à síntese proteica, como retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Durante o desenvolvimento da fase inicial de espermátide, formam-se duas estruturas especializadas da membrana, que são o anel nuclear ou anel posterior, que se forma na região do pescoço da célula e será o limite entre a cabeça e a peça principal (HOLT, 1984).

A membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos sofre mudanças na morfologia e na composição química durante a passagem e a maturação espermática no epidídimo. Isto torna a membrana menos resistente ao estresse, uma vez que espermatozoides coletados nos epidídimos de bovinos, suínos e ovinos são mais resistentes ao choque térmico que espermatozoides ejaculados desta mesma espécie, há evidências de que durante o trânsito epididimário e a maturação espermática, há aumento da fluidez da membrana em decorrência da elevação do teor de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados e diminuição da concentração de colesterol (HOLT, 1984; AMANN E PICKETT, 1987).

As propriedades da membrana espermática são determinadas pela sua composição celular, formada por uma dupla camada fosfolipídica, entremeada por proteínas ancoradas por ligações específicas. Esse componente espermático sofre constante remodelação devido a mudanças nas quantidades relativas de fosfolipídios,

reposicionamento de proteínas com plasma seminal. Por isso, a membrana plasmática é extremamente importante para a manutenção do balanço iônico celular. Lesões nessa estrutura podem resultar em morte do espermatozoide (HAFEZ, 2004; MASCARENHAS, 2007; CASTELO et al., 2008).

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).

A realização de processos de conservação do sêmen pode ocasionar alterações físicas e químicas nas membranas celulares, causadas pelo resfriamento, podem levar a danos irreversíveis. Esses podem ser devidos aos danos diretos, à ruptura de membranas; ou indiretos, causados pela diminuição dos processos metabólicos (GRAHAM, 1996). A alteração na fluidez e na permeabilidade da membrana compromete a fertilidade do espermatozoide, devido aos danos causados no acrossoma e à redução da atividade metabólica e do consumo de adenosina trifosfato (WEITZE e PETZOLD, 1992).

## *2.2 Criopreservação de sêmen*

A criopreservação é uma maneira de preservar o material genético com aplicações na agropecuária, na biotecnologia e na conservação de espécies ameaçadas (ANDRABI e MAXWELL, 2007; BARBAS E MASCARENHAS, 2009). Devendo proporcionar adequadas taxas de fertilidade em programas de inseminação artificial (OLIVEIRA et al., 2011).

A congelação do sêmen a baixas temperaturas e seu armazenamento a  $-196^{\circ}\text{C}$  promove uma cessação completa de sua atividade metabólica. Com isso, é possível preservá-lo por muitos anos, transportá-lo para os mais diversos lugares, utilizá-lo em expressivo número de fêmeas (NEVES et al., 2008).

Segundo Hunter (1982), para congelar o sêmen e poder utilizá-lo posteriormente com bons resultados, é necessário ter em conta uma série de fatores essenciais: o diluente e a concentração de células; o agente crioprotetor adequado e sua concentração no meio; o tempo e a temperatura de equilíbrio; a natureza da curva de resfriamento; a natureza da curva de descongelação específica; o modo de eliminar o agente crioprotetor (diluição ou diálise).

Independente do processo usado para a congelação ocorre diferenças entre indivíduos com relação à congelabilidade e fertilidade do sêmen podendo ser classificados como congeláveis e não-congeláveis, esta variedade é relativamente independente da qualidade inicial do sêmen, o sêmen de certos indivíduos congela com menos crio- injúrias que outros (CORTEEL et al., 1987).

Durante o processo de criopreservação, a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre aumento na temperatura necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para os espermatozoides, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES et al., 1999; GONÇALVES et al., 2002).

A criopreservação ocasiona aumento da fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides e as expõe a sítios de ligação com moléculas externas, o que resulta em capacitação espermática prematura, bem como outras crioinjúrias (HASHIDA et al., 2005).

Para alcançar sucesso nos programas reprodutivos, os espermatozoides devem reter pelo menos quatro atributos básicos após a congelação e descongelação: 1. Integridade do flagelo, que garante produção de ATP e motilidade; 2. Integridade do núcleo, que mantém 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 E NOLAN, 1990).

### *2.2.1 Crioinjúrias*

A criopreservação do sêmen altera as características das membranas dos espermatozóides, interferindo na sua capacidade fertilizante. Durante as fases de congelação e descongelação, ocorrem flutuações no volume celular, que contribuem para o dano celular quando os limites de tolerância das membranas são ultrapassados. (BECKER-SILVA, 2004). A criopreservação promove um processo de grande estresse celular e exposição dos espermatozoides há condições extremamente desfavoráveis em manter a sua viabilidade (PURDY, 2006). Todavia estes danos irreversíveis podem ser reduzidos pelo uso de diluentes adequados e aditivos crioprotetores (GIL,

2003; JEYEDRAN, 2008).

Os espermatozoides submetidos a essa técnica, sofrem injúrias e morte, devido a formação de cristais de gelo no seu interior. Este fenômeno físico ocorre quando rápidas taxas de resfriamento são usadas. Além disso, ocorre o desenvolvimento de regiões com elevada concentração de soluto, que desidratam a célula quando taxas lentas de resfriamento são usadas (AZEVEDO et al., 2000).

Durante a congelação- descongelação, os espermatozóides são submetidos a condições desfavoráveis como desidratação, mudanças da fase de transição dos fosfolipídios da membrana, efeito solução e a formação de gelo intracelular (PARKS E GRAHAM, 1992). Mudanças ultra-estruturais afetam principalmente a membrana plasmática, pois durante o processo de congelamento-descongelamento, existe uma redistribuição de lipídios que altera as interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína da membrana espermática (PARK E GRAHAM, 1992).

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).

O estudo sobre as modificações ocorridas no espermatozoide e em suas membranas durante a redução da temperatura elucida possíveis lesões e diminuição da capacidade fertilizante deste gameta masculino e possibilita a elaboração de estratégias para reduzir tais injúrias, como a seleção e/ou associação de crioprotetores mais eficazes para determinada espécie, assim como a adição de componentes que podem oferecer substrato ou remover os causadores de lesões celulares, como as espécies reativas ao oxigênio (SILVA E GUERRA, 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 ocorra o processo de fecundação (WATSON, 1995).

Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se bons crioprotetores. Os crioprotetores utilizados na congelação de sêmen das mais variadas espécies têm a função de evitar a formação de cristais grandes de gelo intracelular, reduzir

o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelamento da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (MEDEIROS et al., 2002).

### *2.3 Diluidores para criopreservação seminal*

Segundo Picket e Amann (1987), um diluidor apropriado, em geral deve apresentar as seguintes características: ser atóxico para os espermatozóides, ser de baixo custo e preparo fácil, pressão osmótica compatível, balanço mineral apropriado, combinação ajustada de nutrientes, capacidade de neutralizar produtos tóxicos originados do metabolismo espermático, proteção contra os danos causados por ação das mudanças de temperatura, bem como proporcionar a estabilidade dos sistemas enzimáticos e a integridade da membrana plasmática.

Na atualidade os diluidores oferecem boa proteção à integridade espermática, entretanto com os últimos avanços na fisiologia da fecundação, é possível inferir que a baixa fertilidade do sêmen congelado está relacionada, fundamentalmente com a composição dos diluidores, que pode favorecer modificações na distribuição e características dos componentes de membrana que cobrem o espermatozóide, resultando na sua desestabilização. Esta desestabilização está correlacionada ao aumento de fluidez da bi-camada lipídica da membrana o que a torna mais permeável favorecendo a entrada de Cálcio livre no interior da célula, o qual por sua vez estimula o processo de capacitação (SILVA, 2007).

O TRIS é um dos principais componente dos diluentes de sêmen ovino utilizados rotineiramente, que atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0. Ele é uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais (CHOE et al., 2006; DORADO et al., 2007). 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.

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 e o Etilenoglicol, 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.

Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se úteis como agentes crioprotetores. O modo pelo qual os crioprotetores atuam não se encontra totalmente elucidado. Acredita-se que estes reduzam o ponto de congelação da solução, o qual é determinado como a temperatura onde ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo puro. Numa solução contendo glicerol, no momento em que ocorrer a congelação, restará mais água descongelada do que numa solução sem glicerol, havendo, com isso, um aumento do volume dos canais de solvente não congelado e uma menor concentração de sais nesses canais (KEITH, 1998).

O crioprotetor penetrante glicerol é o principal crioprotetor utilizado para espermatozoides sendo adicionado aos diluidores. Seu efeito se relaciona à sua capacidade de ligação com a água e à baixa dissociação com sais. Estas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa (GONZALEZ, 2004). O glicerol interage com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, baixando a temperatura de transição de fase dos lipídios da membrana e diminuindo a adesão entre as células (KUNDU et al., 2000). Apesar de seus efeitos protetores, em determinadas situações, o glicerol pode ser tóxico à célula espermática, sendo importante determinar sua concentração ideal em cada diluente, para que ele possa proporcionar um efeito benéfico ao sêmen (GONZALEZ, 2004).

A gema de ovo é o ingrediente mais comum utilizado como protetor de sêmen de mamíferos; e é utilizado para preservá-lo contra as crioinjúrias ocorridas durante o processo de congelação-descongelação (BENCHARIF, 2010). A gema de ovo e o leite proporcionam fosfolipídios que contribuem para a estabilização da membrana celular as baixas temperaturas retardam a ativação prematura da membrana acrossomal (HOPKINS e EVANS 1991). Os efeitos benéficos da gema de ovo foram descobertos por Phillips em 1939, as lipoproteínas e lecitinas contidas na gema de ovo são os componentes mais diretamente implicados na proteção dos espermatozoides (COLE e CUPPS 1984).

O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação dos espermatozoides por possuir certa capacidade tampão, ação bactericida,

viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido, e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia (CASTELO et al., 2008). O leite desnatado ou integral também é empregado para proteger a membrana espermática contra o choque frio e, como consequência, para conservar a fertilidade dos espermatozoides, o agente responsável por essa proteção é a caseína do leite (COLE e CUPPS, 1984). As lipoproteínas do leite protegem a membrana plasmática através da estabilização da mesma permitindo uma melhor adaptação ao ambiente, sobretudo durante o abaixamento da temperatura (OLIVEIRA et al., 2013).

Segundo GIL et al. (2003), o uso de aditivos de origem animal como gema de ovo e leite na diluição pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto. 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).

Diluidores a base de água de coco apresentam como vantagem o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante no Nordeste do Brasil. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quanto à conservação por longos períodos após a sua extração do fruto, limitações na disponibilidade do fruto em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos (NUNES et al., 2010).

Devido a variações físico-químicas da água de coco e disponibilidade de frutos em estágios ideais, elaborou-se um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP® ACP Biotecnologia, Fortaleza- Ceará, Brasil), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco por meio de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específico para células e tecidos (Salgueiro et al., 2002), mantendo os mesmos constituintes bioquímicos da água de coco *in natura*, tendo a vantagem de ser facilmente estocado, transportado e preparado (Viveiros et al., 2010).

A *Aloe Vera* é conhecida por suas propriedades terapêuticas legendárias, sendo considerada como divindade em algumas civilizações. Era chamada de “A Planta da Saúde e Beleza”, “Planta das Queimaduras”, “Planta dos Primeiros Socorros” e, também,

“Planta dos Milagres”. A *Aloe vera* sp. pertence à família das Liláceas, da qual fazem parte, a cebola, o nabo e os aspargos, lírio, alhos, muito conhecida no Brasil pelo nome de "Babosa", é tão suculenta que se assemelha a um cacto. (MAURELLE et al., 1996).

O conteúdo de polissacarídeos presente no gel tem forte propriedade antiviral, bactericida e fungicida. Foram descobertas até o momento mais de 300 substâncias bioativas e componentes vitais, tem como componentes ativos enzimas, aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais, ácidos graxos e varias outras substâncias como triglicérides, esteróis, sais e ácidos orgânicos, vitaminas A, C, B1, B2, B5, B12 e sais minerais (CARNEIRO e CARNEIRO, 2011). Compostos extraídos de *Aloe vera* têm sido usados como um imunostimulante que auxilia no combate ao câncer em cães e gatos (KING et al., 1995). No entanto, este tratamento não foi cientificamente testado em seres humanos. Sendo que a injeção dos extratos de *Aloe vera* para tratar o câncer resultou na morte de vários pacientes (SKINNER, 1997). Em sua composição foram identificadas substâncias interessantes para o desenvolvimento de diluentes seminais como polissacarídeos contendo glicose, galactose e xilose, tanino, substâncias antibióticas, resíduos de açúcar, vitaminas, e diversos minerais (VELOSO e PEGLOW, 2003).

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*

O buriti (*Mauritia flexuosa*), também conhecido como coqueiro-buriti, miriti, muriti, muritim, palmeira-dos-brejos, carandá-guaçu e carnadaí-guaçu, é uma palmeira da família Palmae, que vegeta as regiões alagadas e úmidas do Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil (ALMEIDA et al., 1998).

É uma planta que possui fruto em forma de drupa globoso-alongada de 4-7 cm de comprimento, constituída de epicarpo (casca mais externa) formado de escamas rombóides de cor castanho-avermelhada; mesocarpo (parte comestível) representado por uma massa espessa de cor alaranjada; endocarpo esponjoso que envolve a semente muito dura. Inúmeros produtos úteis do buritizeiro são aproveitados pelas populações ribeirinhas de sua região de ocorrência, tanto na sua alimentação como em outras necessidades diárias: bebida natural ou fermentada, sabão caseiro, material para

casa, óleo e doces dos frutos, fécula e açúcar. Ocorre em toda a Amazônia, Nordeste, Centro Oeste e Brasil Central (ALMEIDA et al., 1998).

O óleo extraído da polpa dos frutos de buriti é rico em carotenóides, ácidos graxos e tocoferol, o que sugere boa perspectiva na utilização desse produto como alternativa terapêutica e cosmética (ROSSO e MERCADANTE, 2007), o óleo de buriti tem a função de lubrificar e regenerar a barreira hidrolipídica da pele frequentemente submetida a lesões (ZANATA et al., 2008). Também quando usado em produtos pós sol, o óleo de buriti evita danos provocados por radiação UV, justamente por apresentar propriedades fotoprotetoras (ZANATTA et al., 2010).

## *2.6 Testes para avaliação da fertilidade espermática*

Os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da viabilidade das células espermáticas para utilização na inseminação artificial. Entre esses exames encontra-se das técnicas mais simples às mais sofisticadas e precisas, como as sondas fluorescentes e a análise computadorizada; não existe um único teste *in vitro* que seja capaz de mensurar todas as funções espermáticas. Assim, deve-se considerar que, quanto maior a quantidade de exames e características avaliadas, mais precisa será a capacidade de se predizer a fertilidade *in vivo* do sêmen (BARROS,2010). O ensaio ideal para avaliação da qualidade do sêmen deve ser objetivo, repetível, fidedigno e econômico (AISEN; VENTURINO, 2002).

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). No entanto, 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). Entretanto, 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).

A avaliação da membrana espermática é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que ela é extremamente sensível às crioinjúrias (PENA et al., 2005). Para a realização do Teste Hiposmótico, como um teste complementar para a avaliação da funcionalidade da membrana plasmática, o espermatozoide é exposto a uma solução de baixa osmolaridade, resultando no influxo de água, a fim de estabelecer o

equilíbrio entre o meio intracelular e o extracelular. Esse influxo de água provoca o aumento do volume da célula, a expansão da membrana e o dobramento da cauda do espermatozoide (FONSECA et al., 2001), dando um indicativo da integridade funcional da membrana plasmática (DELL AQUA JÚNIOR et., 2002).

Dentre as técnicas de avaliação da membrana plasmática espermática destacam-se as sondas fluorescentes permeáveis e impermeáveis, detectando assim 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).

O CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) é um sistema automático (*hardware e software*) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula, bem como, de subpopulações de células espermáticas (AMANN E KATZ, 2004). A análise da motilidade e morfologia espermática têm sido apontadas por muitos autores como importante ferramenta na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para prever a qualidade seminal (VERSTEGEN et al., 2002).

Tradicionalmente, a quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade massal e individual, contudo, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (AMANN E HAMMERSTEDT, 1980; VERSTEGEN et al., 2002).

Para reduzir a subjetividade, nos últimos 15 anos, sistemas automáticos para análise computadorizada de sêmen (CASA) vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de fornecer dados acurados da motilidade de cada espermatozoide e resumo estatístico das subpopulações (VERSTEGEN et al., 2002). Este sistema pode ainda ser utilizado para mensurar o número de células por unidade de volume e ser modificado para capturar

dados aproximados para classificação morfométrica de cada célula examinada (AMANN E KATZ, 2004).

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Devido a uma busca continua do desenvolvimento de crioprotetores que possam viabilizar a substituição dos de origem animal, diversos países vem investindo no desenvolvimento de substancias que tenham um bom potencial de proteção do espermatozoide e minimizar os riscos de transmissão de patógenos. Contudo os crioprotetores de origem animal ainda são os mais utilizados ou apresentam melhores resultados.

### **4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, S.P.; CARNEIRO, J.G.M Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **EMBRAPA-CPAC**. 464p, 1998.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of crypreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Veterinary Science.**, v.7,p. 147,1987.

AISEN, E. G.; MEDINA ,V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concetrations. **Theriogenology**, v.57, p. 1801–1808, 2002.

ANDRIOLLI, A., GOUVEIA, A.M.G., MOURA-SOBRINHO, P.A., PINHEIRO, R.R.; SALLES, H.O. Transferência de Embriões em cabras naturalmente infectadas pelo Lentivirus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, p.215-220, 2002.

ANDRABI, S.; MAXWELL, W. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 223-243, 2007.

AZEVEDO, H.C., MACHADO R., SIMPLÍCIO A.A., SOARES A.T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. **Revista Ciência Rural**. V.5. 148-157, 2000.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49-62, 2009.

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.

BECKER-SILVA S. C. 2004. Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas desacarose 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.

CARNEIRO, T. B.; CARNEIRO, J.G.M. Frutos e polpa desidratada buriti (*Mauritia flexuosa* L.): aspectos físicos, químicos e tecnológicos. **Revista Verde**, v.6, n.2, p. 105–111, 2011.

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

CAVALCANTE, M. M. J. AVALIAÇÃO DO SÊMEN OVINO DILUÍDO E CONGELADO EM MEIO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP102®) OU TRIS. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual do Ceará, 2008.

CHOE, C.Y.; RAMÓN,M.; DUTTA, P. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. **Reproduction Domestic Animal**, v.41, p.55-60, 2006.

CORTEEL, J. M.; BARIL, G.; LEBOEUF, B. **IV International Conference on Goats**. Brasília. Proceeding. V.1. p. 523- 547, 1987.

COLE H.; CUPPS P. T. **Reproducción de los Animales Domésticos**. Ed. Acribia. Zaragoza, 1984.

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.

DORADO J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v.68, p.168-177, 2007.

GIL J, RODRIGUEZ-IRAZOQUI M, LUNDEHEIM N, SODERQUIST L, RODRIGUEZMARTINEZ H. Fertility of ram semen frozen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-70, 2003.

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

GRAHAM, J. K. Current techniques for freezing equine sêmen. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa, 1995-1996. **Proceedings Fort Collins-Co**, 1996.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas a reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p. 304. 2002.

GONZALEZ, R.A.F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozoide bovino. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2004.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeito da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para a redução das crioinjúrias. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.370-384, 2011.

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.; MAROTOMORALES,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.

KEITH, S. L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Colorado. 104p. **Tese (Master of Science)**. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1998.

KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA D.; GHOSH A.; MAJUMDER, G.C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology** 40:117–125, 2000.

KING, G. K.; YATES, K. M.; GREENLEE, P. G. O efeito da Acemannan Immunostimulant em combinação com cirurgia e radioterapia em espontânea fibrossarcomas canina e felina. **Journal of Animal Hospital da Associação Americana**, v.31, p.439-47, 1995.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MELO, K. S.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Comportamento reológico da polpa do buriti com leite. *Rev. Biologia e Ciências da Terra*, v. 8, n.2, 2008. **Disponível em:** <<http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/22buriti.pdf>> **Acesso em: 12 jul 2016.**

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S.E. **Reproduction in farm animals**. 7. Ed., p.509, 2002.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. **Reprodução Animal**. São Paulo: Editora Manole, 7. ed., 513p. 2004.

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.

HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NOOR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v.16, n. 2, p. 119-123, 2005.

HOLT, W.V. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoa. **International Review of Cytology**, v. 87,p. 159 – 194, 1984.

HOLT,W.V.Basic aspects of frozen storage of sêmen. **Animal Reproduction Science**, v 62, p. 3—22, 2000a.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58,2000b.

HOPKINS, S. M., EVANS, L.E In: MCDONALD, L. E. **Endocrinología veterinária y reproducción**. 4. ED. INTERAMERICANA. MÉXICO, 1991.

HUNTER, R.H. F. **Fisiología y tecnologia de La reproducción de La hembrade los animales domésticos**. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.

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 Medicinails**, n.2, p.15-17, 1996.

NEVES, J.P.; Inseminação Artificial em Pequenos Ruminantes. In: **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. GONÇALVES. P.B.D; FIGUEREDO.J.R; FREITAS. V. J; 2 ed.São Paulo: Roca, 2008.

NUNES, J.F. Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes. 1 ed. Fortaleza. Tecnograf, 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 e Zootecnia**. v.6, p.1295-1302, 2011.

PAULA, N.R.O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S.; SANTOS, D.O.; ELOY, A.M.X. Reprodução no Macho Caprino: Análise Básica e Aplicada. Sobral-CE: Embrapa Ovinos e Caprinos, 2008 (Comunicado Técnico).

PICKETT.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MICKINNON A.O, VOSS, J.L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.769-789,1993.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 6, p. 215–225, 2006.

PARK, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, supl., n. 5, p. 96-98, 2002.

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

SILVA, L.D.M. Avanços da inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.107-111, 2001.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWAL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Principles of cryopreservation**. In: Cooled and frozen Stallion Semen, b. 09,1999.

SKINNER, W. J. Aloe vera resultou em injeções de suspensão para licença médica. **Medicina Natural Law**, 1997

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.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, T.A.S.N. Efeito do plasma seminal na descongelação do sêmen ovino avaliado invitro e na inseminação artificial cervical. 2007. 64p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - **Universidade de Brasília. Brasília**. 2007.

ROSSO, V.V.; 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. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/jf0705421>>. Acesso em: 03 set. 2011.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURACALIXTO, F., & MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996–1002, 2010.

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

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, 74, p.551-556. 2010.

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

WEITZE, K. F.; PETZOLDT, R. Preservation of sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 2229-235, 1992.

ZANATTA, C. F.; MITJANS, M.; URGATONDO, V.; ROCHA-FILHO, P. A. & 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 – Eficiência do diluente *tris* suplementado com óleo de *mauritia flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após a criopreservação.**

(<http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/instrucoes.htm>)

## **1. INTRODUÇÃO**

A criopreservação de sêmen promove um melhor aproveitamento genético de animais de grandes valores econômicos e zootécnicos (Oliveira et al., 2013). A utilização dessa biotecnologia tem permitido significativos avanços na preservação e multiplicação de várias espécies. No entanto, o processo apresenta distintas limitações, sendo necessárias a evolução e a adaptação de diferentes protocolos de criopreservação de gametas de acordo com as características de cada espécie (Sousa et al., 2014).

A fim de que ocorra a fertilização do ovócito, é extremamente necessário que ocorra a manutenção da membrana plasmática, que pode ser lesada durante o processo de criopreservação, mudando sua fluidez, permitindo a entrada de moléculas que normalmente não entrariam, levando, assim, à morte celular (Oliveira et al., 2013).

O estudo sobre as modificações ocorridas no espermatozoide e em suas membranas durante a redução da temperatura elucida possíveis lesões e diminuição da capacidade fertilizante deste gameta masculino e possibilita a elaboração de estratégias para reduzir tais injúrias, como a seleção e/ou associação de crioprotetores mais eficazes para determinada espécie, assim como a adição de componentes que podem oferecer substrato ou remover os causadores de lesões celulares, como as espécies reativas ao oxigênio (Silva e Guerra, 2011).

Nos últimos anos, tem-se observado um amplo desenvolvimento de substâncias adicionadas ao diluente no processo de criopreservação de sêmen em animais domésticos (Sousa et al., 2014). Nesse contexto diluidores alternativos a base de substratos de origem vegetal possibilitam um maior controle sanitário do produto, especialmente quando se pretende introduzir o material biológico em diferentes rebanhos dentro do País ou exportá-lo (Bittencourt et al., 2013).

Diante do exposto o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência do diluente *Tris* suplementado com óleo de *Mauritia Flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após a criopreservação.

## **2. 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. Sob aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFPI) nº: 105/15.

Foram utilizados quatro caprinos, com idade média de 4 anos, clinicamente saudáveis e com escore de condição corporal 3,5 numa escala de (0-5). Os animais eram alimentados diariamente com volumoso (capim elefante), concentrado (ração peletizada, 300g/animal/dia) e sal mineral *ad libitum*. Totalizando 64 ejaculados dos quatro bodes utilizados. A coleta do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39°C e acoplada a um tubo coletor graduado, o sêmen foi colocado em banho-maria à temperatura de 37°C e mantido nessa temperatura durante todo o processo de análise do sêmen. Os parâmetros também foram avaliados quanto ao volume (tubo graduado), aspecto, cor. Para avaliação microscópica, uma alíquota de 5µL de sêmen fresco foi colocada entre uma lâmina e uma lamínula, previamente aquecidas 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). Foram realizadas coletas em duas etapas. Primeiro foi realizado um teste de toxicidade no total de trinta e duas coletas, sendo oito ejaculados de cada animal, os ejaculados foram avaliados com a adição de 5%, 10%, 15%, 20% de diluente a base de óleo de *Mauritia flexuosa*, para se verificar qual melhor concentração. Após o teste de toxicidade, foi escolhida a concentração que apresentou o melhor resultado. Logo após, foram realizadas mais trinta e duas coletas, que foram diluídas em Tris-gema-glicerol (grupo controle) GC ou diluente contendo óleo vegetal (*Mauritia flexuosa*) GB. As amostras foram criopreservadas com auxílio do aparelho Tk3000® (TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante, com curva de resfriamento de 0,25 °C/min, duração em torno de 1 hora e 20 minutos, permanecendo a 5 °C por mais 2 horas. Com curva de congelamento de -20 °C/min até alcançar -120 °C, posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijões criogênicos.

O diluente utilizado neste experimento foi constituído por Tris 254 mM (Merck, Darmstadt, Alemanha), frutose 70 mM (Merck), ácido cítrico 85 mM (Merck), 7% de glicerol (v / v) e 500 µg / ml de gentamicina, respectivamente (Bucak, 2009). Os outros três diferentes diluentes foram preparados adicionando 5% e 10% e 15% óleo de Buriti (*Mauritia Flexuosa*), extraído do fruto do buriti a temperatura de 280°C e um diluente contendo 20% de gema de ovo como tratamento controle.

Após o período mínimo de uma semana as partidas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em microtubos tipo ependorf e homogeneizadas para a análise imediata de motilidade, vigor espermático e morfologia. A análise da integridade da membrana plasmática (IMP) foi realizada com a utilização das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP), sendo diluídos 10µL de sêmen em 40µL da solução de trabalho composta por: 1 mL de citrato de sódio a 2,95%; 10µL de formol salina; 10µL de carboxifluoresceína e 20µL de iodeto de propídio. Após o preparo da lâmina com os marcadores fluorescentes, os espermatozoides foram avaliados em microscópio de fluorescência em sala com iluminação controlada (aumento de 100x). Foram avaliados 100 espermatozoides em microscópio de fluorescência, os quais foram classificados como íntegros, quando a cabeça do espermatozoide se encontrava com a coloração verde, e lesados, quando observado uma coloração vermelha (Harisson & Vickers, 1990). Os dados foram analisados empregando-se o programa BIOESTAT 5,0. Foram realizado a SAS (ANOVA) e para comparação de médias usado o teste de Tukey a 5%.

### 3. Resultados e Discussão

As características microscópicas do sêmen pós descongelamento acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa* estão descritos na tabela 1.

**Tabela1.** Características seminais (Médias  $\pm$  Desvio padrão) pós-descongelamento do sêmen de bodes acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa*

\*Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Parâmetros	GC	GB5%
<b>Motilidade</b>	36,25 $\pm$ 8,94 <sup>a</sup>	18,15 $\pm$ 13,63 <sup>b</sup>
<b>Vigor</b>	2,34 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	1,74 $\pm$ 1,24 <sup>b</sup>
<b>Morfologia</b>	96,03 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>	96,03 $\pm$ 1,33 <sup>a</sup>

GC: Grupo Controle; GB5%: Grupo Buriti, concentração 5%.

A tabela 1 nos mostra que no parâmetro motilidade e vigor do grupo controle (GC) foi superior quando comparado com o grupo (GB5%) apresentando diferença significativa no teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em relação ao parâmetro morfologia ambos os grupos não apresentaram diferença significativa.

Os resultados desse trabalho para o grupo controle estão de acordo com os parâmetros mínimos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para o sêmen caprino congelado (CBRA, 2013). Para se obter esses parâmetros fisiológicos adequados e bons resultados após a criopreservação Silva e Guerra (2011), relatam que

faz se necessária a padronização de protocolos de criopreservação para cada espécie animal.

Os resultados referentes as análises através de sondas fluorescentes estão descritos na tabela 2.

No presente estudo não obteve-se diferença significativa entre os grupos testados na avaliação da membrana plasmática através do uso de sondas florescentes (Figura 1 e 2), o que é bastante satisfatório uma vez para uma boa taxa de fertilidade as membranas devem estar integras para realizar tal função

**Tabela 2.** Características seminais para integridade de membrana plasmática, integridade mitocondrial e integridade do acrossoma, pós-descongelamento de espermatozoides caprinos acrescidos ou não de Óleo de *Mauritia Flexuosa*.

Parâmetros	GC	GB5%
Membrana plasmática (%)	49,72± 21,96 <sup>a</sup>	37,84± 26,67 <sup>a</sup>
Mitocôndrias (%)	34,28± 27,50 <sup>a</sup>	13,31± 20,94 <sup>b</sup>
Acrossoma (%)	39,25±19,29 <sup>a</sup>	26,15±18,76 <sup>b</sup>

\*Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade  
GC: Grupo Controle; GB5%: Grupo Buriti, concentração 5%.

A baixa fertilidade do sêmen descongelado é atribuída, em grande parte, as alterações por que passam as membranas espermáticas (Plasmáticas, acrossomais e mitocondriais) durante os processos de congelação e descongelação (Medina et al., 2000). Neste contexto as análises através de sondas fluorescentes tornasse essenciais para verificar se há ou não alterações que possam tornar os espermatozoides inaptos a fertilização.

De acordo com Snoeck et al. (2007), os espermatozoides devem possuir membrana e organelas integras e funcionais e um genoma haploide intacto para obtenção de sucesso na concepção.

Medina et al. (2000), utilizando sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana de espermatozoides ovinos verificaram que o número de membranas integras aumentaram na medida que se aumentava os níveis de testosterona.

Em relação a avaliação de mitocôndria e acrossomo através do uso das sondas foi possível observar que o grupo contendo óleo de buriti apresentou menor qualidade nesses parâmetros quando comparado com o grupo controle.

Em relação avaliação da viabilidade do acrossomo os resultados desse trabalho são semelhantes ao encontrados por Medina et al. (2000), onde os autores afirmam que o principal motivo de acrossomo danificado seria a influência da criopreservação.

De acordo com Oliveira et al. (2013), cada animal possui uma pequena variação na composição da membrana plasmática o que pode torná-lo mais resistente ou não ao processo de criopreservação. Porém no presente trabalho não houve diferença entre animais na avaliação da membrana plasmática, mitocôndria e acrossomo.

Em relação a análise morfológica do acrossomo Medina et al. (2000) observaram diferenças entre animais e entre tratamentos e também destacaram a influência da técnica de criopreservação sobre a incidência de acrossomo danificados.

O óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) pode ser utilizado em tecnologias aplicadas ao sêmen animal devido suas características que qualificam com potencial para o desenvolvimento de diluentes seminais. Porém um dos requisitos para o sucesso de sua aplicação como diluidor e crioprotetor é manter a viabilidade da célula espermática e prevenir as crioinjúrias durante a congelação e descongelação seminal (Salmito Vanderley et al., 2012).

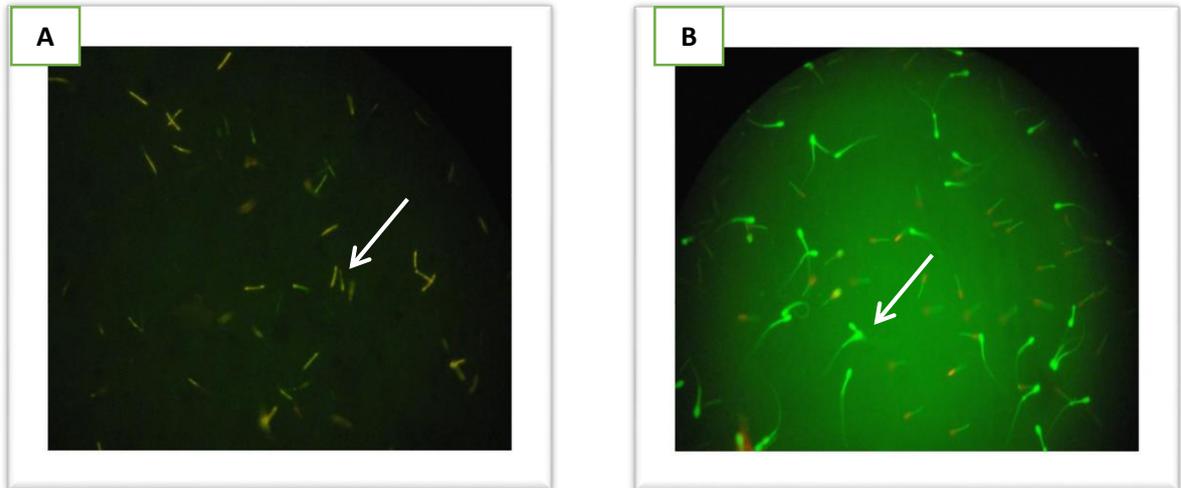
Neste presente trabalho os resultados mostraram que a adição do óleo de buriti ao diluente e crioprotetor seminal, apesar dos baixos resultados, apresentou dados satisfatórios na substituição da gema de ovo como crioprotetor. Esse achado é um grande avanço principalmente na parte sanitária uma vez que o grande gargalo da utilização da gema de ovo é o não controle sanitário por se tratar de um produto de origem animal.

Gil et al. (2003) relatam que apesar da gema de ovo beneficiar os espermatozoides na criopreservação, por ser um produto de origem animal pode apresentar risco ao potencial das células, por conter agentes microbiológicos específicos, comprometendo assim a qualidade espermática. Relatam também a substituição da gema de ovo por produtos de origem vegetal como a lecitina de soja, para minimizar os riscos sanitários.

Corroborando com os nossos resultados Cavaltante et al. (2014) utilizando um produto vegetal a base de Água de Coco em Pó (ACP-102<sup>®</sup>), verificaram que o uso desse produto conferiu uma menor proteção aos espermatozoides de ovinos quando comparado ao grupo controle contendo o Tris. Porém os autores também afirmam que seu uso pode se tornar uma alternativa viável desde que haja um aprimoramento de sua formula.

Alguns autores como Oliveira et al. (2013) e Medina et al. (2000) relatam que alguns animais possuem algumas particularidades em seus ejaculados o que pode torná-los mais resistentes quando comparados a outros animais. Em vista disso no presente

trabalho também foi avaliado cada animal individualmente, tabela 3, para se determinar se existia alguma variação entre animais.



**Figura 1** - Avaliação da Integridade da mitocôndria A (seta indica alto potencial de membrana mitocondrial). Integridade de membrana B (seta indica células portadoras de acrossomas intactos), através do uso de sondas fluorescentes.

**Tabela 3.** Características seminais por animal e avaliação da integridade dos espermatozoides através do uso de sondas fluorescentes

Parâmetros	<u>ANIMAL</u>							
	<u>1</u>		<u>2</u>		<u>3</u>		<u>4</u>	
	GC	GB5%	GC	GB5%	GC	GB5%	GC	GB5%
<b>Motilidade</b>	40,01 ± 7,5 <sup>a</sup>	19,37 ± 15,69 <sup>b</sup>	32,5 ± 7,9 <sup>a</sup>	18,1 ± 11,70 <sup>b</sup>	37,01 ± 9,35 <sup>a</sup>	15,12 ± 13,55 <sup>b</sup>	35,01 ± 9,01 <sup>a</sup>	20 ± 12,74 <sup>b</sup>
<b>Vigor</b>	2,64 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,62 ± 1,11 <sup>b</sup>	2,25 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,75 ± 1,08 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,75 ± 1,08 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,44 <sup>a</sup>	1,87 ± 1,16 <sup>a</sup>
<b>Morfologia</b>	95,62 ± 1,21 <sup>a</sup>	95,55 ± 1,00 <sup>a</sup>	96,37 ± 1,31 <sup>a</sup>	96,25 ± 1,19 <sup>a</sup>	95,87 ± 1,45 <sup>a</sup>	95,62 ± 1,21 <sup>a</sup>	96,25 ± 1,29 <sup>a</sup>	96,75 ± 1,47 <sup>a</sup>
<b>Membrana Plasmática (%)</b>	45,5 ± 16,47 <sup>a</sup>	48,2 ± 30,82 <sup>a</sup>	51,75 ± 25,2 <sup>a</sup>	43,8 ± 26,40 <sup>a</sup>	50 ± 22,7 <sup>a</sup>	31,6 ± 19,51 <sup>a</sup>	51,63 ± 25,3 <sup>a</sup>	27,63 ± 25,6 <sup>a</sup>
<b>Mitocôndrias</b>	22,50 ± 20,8 <sup>a</sup>	4,25 ± 3,67 <sup>b</sup>	31,8 ± 22,3 <sup>a</sup>	8,87 ± 13,0 <sup>b</sup>	64,2 ± 30,3 <sup>a</sup>	7,25 ± 9,79 <sup>b</sup>	35,375 ± 29,1 <sup>a</sup>	32,8 ± 30,5 <sup>a</sup>
<b>Acrossomo (%)</b>	29,12 ± 21,37 <sup>a</sup>	36,6 ± 21,64 <sup>a</sup>	40,5 ± 18,4 <sup>a</sup>	19,0 ± 10,9 <sup>b</sup>	50,8 ± 10,0 <sup>a</sup>	25,1 ± 18,0 <sup>b</sup>	36,5 ± 21,5 <sup>a</sup>	23,8 ± 21,3 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas de mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

GC: Grupo Controle; GB5%: Grupo Buriti, concentração 5%

\*Integridade dos espermatozoides (Normais).

#### **4. CONCLUSÃO**

A obtenção de motilidade pós descongelamento no grupo sem gema de ovo acrescido de óleo de buriti demonstra uma possível alternativa na substituição de produtos oriundos de origem animal.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Novas pesquisas deverão ser desenvolvidas para que os diluentes a base de óleo de *Mauritia Flexuosa* possam apresentar resultados equivalentes aos obtidos com os crioprotetores convencionais a base de gema de ovo, podendo restringir o uso de produtos de origem animal como crioprotetores, evitando a possibilidade de disseminação de contaminantes. Pela ótica financeira, com a obtenção de um o diluidor de origem vegetal, pode-se diminuir os custo para a produção de doses inseminastes, por se tratar de um produto nativo e em abundância, facilitando o acesso a Biotecnologia, pelos produtores que possuem menor capital de investimento.

## **6. PERSPECTIVAS**

A presença de motilidade e vigor no presente trabalho demonstra que o extrato de *Mauritia flexuosa*, ainda pode torna-se uma alternativa viável na criopreservação de sêmen, contudo, são necessários mais estudos que possam evidenciar as reações provocadas pelos constituintes do óleo. Sendo necessário identificar modificações químicas que ocorre ao longo do processo de obtenção do extrato e durante o processo de criopreservação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bittencourt, R.F.; Oba, E.; Filho, A.L.R.; Chalhoub, M.; Azevedo, H.C.; Bicudo, S.D. Avancos na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. **Ciencia Animal Brasileira**. V.14, p.522-536, 2013.
- Cavalcante, J.M.; Brasil, O.O.; Salgueiro, C.C.M.; Salmito-Vanderley.; Nunes, J.F. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente á base de água de coco em po (ACP-102). **Ciência Animal Brasileira**, v.15, p.344-353, 2014.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 3ª Ed., Belo Horizonte, 2013.
- Gil, J.; Rodriguez-Martinez, M.; lundehein, N. Soderquist, L.; Rodriguez-Irazoqui, H. Fertility of ram sêmen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-1170, 2003.
- Mediana, V.H.; Vicente, W.R.R.; Esper, C.R., Malheiros, E.B. Uso de sondas Fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após a criopreservação. **ARS Veterinaria**. V.16, p.204-209, 2000.
- Oliveira, C.G.; Oliveira, B.M.M.; Celeguine, E.C.C.; Fernandes, C.B.; Matos, C.B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V.37, p.23-28, 2013.
- Salmito-Vanderley, C.B.S.; Vieira, M.J.A.F.; Leite, L.V.; Oliveira, F.C.E.; Linhares, F.R.A, Salgueiro, C.C.M. Nunes, J.F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciencia Animal**, v.22, p.255-268, 2012.
- Silva, S.v.; Guerra, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V.35, p.370-384, 2011.
- Sousa, A.L. P.; Lima, G.L.; Silva, A.R. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V.38, p.98-102, 2014.
- Snoeck, P.P.N.; Henry, M.; Melo, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pos descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. V.59, p.56-64, 2007.

## 8. ANEXO



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: 64049-560  
Telefone (86) 3215-5734, e-mail: ceuapi@ufpi.edu.br



### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Eficiência do diluente Tris suplementado com diferentes concentrações de óleo de *Mauritia flexuosa* sobre a qualidade do sêmen caprino após criopreservação", protocolo nº 105/15, 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	Caprino
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