

PRISCILLA DO CARMO DE AZEVEDO RAMOS

**USO DE ANTOCIANINA NA CRIOPRESERVAÇÃO  
DE SÊMEN CAPRINO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

R175u  
2012

Ramos, Priscilla do Carmo de Azevedo, 1983-

Uso de antocianina na criopreservação de sêmen caprino /  
Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos. – Viçosa, MG, 2012.  
xii, 39f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Domingos Guimarães

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-39

1. Caprino - Recursos do germoplasma - Criopreservação.
  2. Antocianinas. 3. Antioxidantes. 4. Sêmen. 5. Caprino.
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária. II. Título.

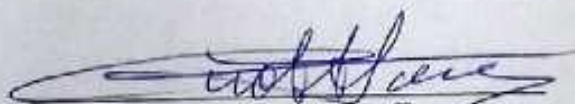
CDD 22. ed. 636.39082

PRISCILLA DO CARMO DE AZEVEDO RAMOS

## USO DE ANTOCIANINA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

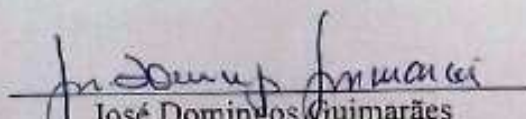
APROVADA: 24 de julho de 2012.



Ciro Alexandre Alves Torres



Eduardo Paulino da Costa  
(Coorientador)



José Domingos Guimarães  
(Orientador)

*“A mente que se abre a uma nova  
ideia jamais voltará ao seu  
tamanho original.”*  
Albert Einstein

*“Temos o destino que  
merecemos. O nosso destino está  
de acordo com os nossos  
méritos.”*  
Albert Einstein

*Dedico esta obra a minha família, minha  
mãe **Maria do Carmo de Azevedo Ramos**,  
meu pai **Ofir de Sales Ramos**, meus irmãos  
**Ofir de Sales Ramos Junior**, **Osny de  
Azevedo Ramos e Sônia Tavares da Cruz**  
que sempre estiveram do meu lado em  
todos os momentos e sempre acreditaram  
em mim e no meu sucesso.*  
**AMO VOCÊS!**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos, em primeiro lugar, pelo fato de todos contribuírem de forma direta ou indireta para realização desta dissertação, Porém grande é minha lista de agradecimentos (o que me torna uma pessoa de sorte).

Então agradeço primeiramente:

Á DEUS: agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo e estar do meu lado em todos os momentos por meio das minhas orações.

AOS MEUS PAIS: Maria do Carmo Ramos e Ofir Ramos que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperanças, que se doaram por inteiro e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus e sempre confiaram neles, até mesmo os mais loucos, e me ensinaram a acreditar que é possível realizá-los, além de me mostrarem que trabalho duro, perseverança e honestidade são as ferramentas ideais para atingirmos nossas metas. A vocês pais é a forma de dizer muito obrigada, mais é o que me acontece agora quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção impar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. AMO VOCÊS.

AOS MEUS IRMÃOS: Junior, Osny e Sônia, pelas longas jornadas em que chegava em casa, após muito tempo longe deles, e que me acalentavam com seus abraços e não se recusavam em me ajudarem sempre que precisava da ajuda deles. AMO VOCÊS.

AO MEU ORIENTADOR: José Domingos Guimarães, por ter acreditado no meu trabalho e ter depositado toda sua confiança em mim; por todas as vezes que me ajudava de várias formas, seja para tirar minhas dúvidas ou dar sugestões, enfim, por toda paciência que teve comigo e por dedicar parte de seu tempo. Meus mais sinceros Agradecimentos!

AOS AMIGOS DO LABORATÓRIO DE ANDROLOGIA ANIMAL: Alberto Chaya (japabob), Damares Betega (Dams), Bruna Waddington (Bruninha), Luciana Bezerra, Breno Camilo (Brê) e Fabricio que sempre estiveram dispostos a me ajudar, seja tirando minhas dúvidas, dando seus pontos de vista, que me apoiaram com críticas, sugestões, ou me ajudando nos momentos da atividade experimental, sempre com muita paciência. Muito obrigada vocês moram no meu coração!

Em especial as doutorandas Bruna Waddington de Freitas e Luciana de Lima Bezerra pessoas que me acolheram no laboratório sempre dispostas a me ajudar e entender todas as minhas dificuldades que não eram poucas ao longo do meu experimento e do meu curso de pós - graduação foram as minhas maiores incentivadoras e colaboradoras e que se tornaram amigas muito grandes que vou levar pra vida toda, junto com seus ensinamentos, e que contribuíram bastante para essa dissertação.

Ao técnico Dívino (Seu Didi), pela paciência que teve durante as coletas, ajudando com a alimentação aos animais e pelo café diário onde sem ele ficaria menos “esperta” e pelos momentos de descontração; aos estagiários Iuram Nunes, Tácio, Paula, Amanda, Thiago e Nara por dedicarem parte dos seus tempos em me ajudarem, meu mais sinceros agradecimentos! enfim agradeço pelos amigos que fiz e que contribuíram bastante para essa minha caminhada. Obrigada!

AO MEU ETERNO AMIGO E ORIENTADOR: Otávio Mitio Ohashi por ter me aceitado no laboratório de Fertilização *in vitro*, ter acreditado no meu trabalho, e que contribuiu de forma intensa na minha formação desde a graduação. Meus mais sinceros agradecimentos.

AOS MEUS AMIGOS: Alexandre Lobo e Deyse Yamaguchi (MIUKI) pela amizade, companheirismo, dedicação e sinceridade nas palavras, e mesmo eles, estando distante contribuíram pela sinceridade de uma amizade, aonde vimos que a distância não é suficiente para separar os amigos. AMO VOCÊS!

AO LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS: ao Drº Paulo Strigheta por ter permitido que eu realizasse parte de minhas análises no laboratório de Alimentos e estando sempre disposto a tirar todas as minhas dúvidas, por ter aberto todas as portas para que eu pudesse realizar minhas análises, não colocando nenhuma dificuldade em ajudar, sempre disposto, me mostrou os caminhos, e foi um dos incentivadores iniciais na realização desse trabalho, sou muito grata á você!

Ao técnico Valério, aos estagiários e doutorandos, Paula, Rita e Adriana, que me ajudaram auxiliando nas análises e sempre dispostos, onde com a convivência acabei formando novos amigos. Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos, filha de Ofir de Sales Ramos e Maria do Carmo de Azevedo Ramos, nasceu em Belém-PA, em 01 de Janeiro de 1983.

Em 2005 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Pará, Castanhal - PA, graduando-se em Dezembro de 2009.

Em agosto de 2010 ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, na área de Reprodução Animal, tendo apresentado sua dissertação de Mestrado em julho de 2012.

# SUMÁRIO

|                                                                                                     |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE TABELAS.....                                                                               | VII  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                              | VIII |
| RESUMO.....                                                                                         | IX   |
| ABSTRACT .....                                                                                      | XI   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                 | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                      | 3    |
| 2.1 Criopreservação de Sêmen .....                                                                  | 3    |
| 2.2 Capacitação Espermática .....                                                                   | 4    |
| 2.3 Problemas Associados ao Sêmen .....                                                             | 6    |
| 2.3.1 Oxigênio Espécie Reativo (ROS) e o sêmen .....                                                | 6    |
| 2.4 Os Antioxidantes.....                                                                           | 8    |
| 2.5 O Açaí (EUTERPE OREACEAE) .....                                                                 | 10   |
| 2.5.1 Bioatividade do açaí (antocianina).....                                                       | 11   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                         | 14   |
| 3.1. Local do Experimento e Animais.....                                                            | 14   |
| 3.2. Etapas de Execução da Criopreservação de Sêmen Caprino e Análise de Dados.....                 | 15   |
| 3.3. Extração da antocianina. ....                                                                  | 16   |
| 3.4. Diluidor utilizado. ....                                                                       | 16   |
| 3.5. Coleta do Sêmen .....                                                                          | 17   |
| 3.5.1 Avaliação do sêmen in natura .....                                                            | 18   |
| 3.5.2 Avaliação do sêmen resfriado e congelado.....                                                 | 19   |
| 3.5.3 Testes Complementares .....                                                                   | 19   |
| 3.5.3.1. Teste Hiposmótico (HOST).....                                                              | 20   |
| 3.5.3.2 Supra Vital.....                                                                            | 20   |
| 3.5.3.3 Sondas Fluorescentes.....                                                                   | 21   |
| 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                                        | 22   |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                     | 23   |
| 5.1. Avaliação de Motilidade e Vigor nos Tratamentos pós descongelamento .....                      | 23   |
| 5.2. Porcentagens de Espermatozóides Viáveis (teste supra vital).....                               | 25   |
| 5.3. Integridade Funcional da Membrana Plasmática de Espermatozóides (teste hiposmótico). ....      | 26   |
| 5.4 Defeitos espermáticos.....                                                                      | 27   |
| 5.5 Integridades funcionais da membrana plasmática de espermatozóides (teste de fluorescência)..... | 28   |
| 6. CONCLUSÃO .....                                                                                  | 32   |
| 7. REFERÊNCIAS .....                                                                                | 33   |



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1– Composição química do diluente base (bovimix®) .....                                                                                                                                                  | 17 |
| Tabela 2 – Composição dos diluentes dos tratamentos 1,2, 3 e controle: .....                                                                                                                                    | 17 |
| Tabela 3– Motilidade espermática progressiva retilínea de sêmen caprino diluído e congelado/descongelado em diferentes meios de criopreservação (média ± erro-padrão): .....                                    | 24 |
| Tabela 4: Vigor espermático de sêmen caprino diluído e congelado/descongelado em diferentes meios de criopreservação (média ± erro-padrão): .....                                                               | 25 |
| Tabela 5– Percentagem de células espermáticas de caprinos reativas ao teste supra vital (sv) após diluídas e congeladas/descongeladas em diferentes meios de criopreservação (média ± erro-padrão): .....       | 26 |
| Tabela 6– Percentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (host) do sêmen caprino diluído e congelado/descongelado em diferentes meios de criopreservação (média ± erro-padrão): .....             | 27 |
| Tabela 7– Características morfológicas (defeitos menores, defeitos maiores, defeitos totais) do sêmen descongelado de caprino (média ± erro-padrão): .....                                                      | 28 |
| Tabela 8–Integridade da membrana plasmática de espermatozoide caprino após congelamento/descongelamento por meio do teste de fluorescência com a utilização das sondas dic+ip+jc-1 (média ± erro-padrão): ..... | 31 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Palmeira conhecida como açazeiro.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 11 |
| Figura 2: Caprino da raça alpina em utilizado durante o período experimental.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 14 |
| Figura 3: Manequim vivo para coleta de sêmen.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 18 |
| Figura 4 Vagina artificial com tubo graduado para coleta de sêmen .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 18 |
| Figura 5: Diferentes formas de dobramento da cauda dos espermatozóides caprinos submetidos ao teste hiposmótico (microscópio de contraste de fases, 1000x). (a) indica espermatozoide sem dobramento de cauda (lesado), (b-j) espermatozóides com a cauda dobrada (íntegro) e (k-w) espermatozóides com a cauda fortemente dobrada (íntegro). Adaptado de fonseca et al. (2005). ..... | 20 |
| Figura 6: Células espermáticas de caprinos coradas de rosa (mortos).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 21 |
| Figura 7- Classificação de células espermáticas após o teste de fluorescência com utilização de sondas dic + ip + jc- 1: a - espermatozóide íntegro, b- espermatozoide semi – íntegro, c - espermatozoide semi – íntegro, d - espermatozoide lesado. ....                                                                                                                              | 22 |

## RESUMO

RAMOS, Priscilla do Carmo de Azevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012.  
**Uso de antocianina na criopreservação de sêmen Caprino.** Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientador: Eduardo Paulino da Costa.

Objetivou – se com este estudo verificar se a antocianina tem efeito sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de caprinos e investigar o potencial desse antioxidantes no uso de meios diluidores de criopreservação de sêmen caprino. Dez ejaculados de cada reprodutor foram obtidos e denominados partidas, onde no final do experimento foram congeladas 10 palhetas de 0,25mL de cada partida totalizando 400 palhetas congeladas de cada tratamento e controle, sendo após a diluição na proporção de 1:1 (sêmen x Bovimix) determinou-se a concentração espermática. Em seguida, o sêmen fresco foi diluído com o diluidor Bovimix® (controle); Bovimix® + 2,5% de antocianina (tratamento 1); Bovimix® +2,5% antocianina + 2,5% de ciclodextrina (tratamento 2); Bovimix® +2,5% antocianina + 2,5% de ciclodextrina (atomizado) (tratamento 3). Após as diluições finais, o sêmen foi envasado, resfriado e congelado. Após sete dias, as partidas foram descongeladas em banho - Maria a 37°C para avaliação do sêmen pós – descongelamento (motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático, teste supra vital, fluorescência, e morfologia espermática). Foi verificado diferença ( $p<0,05$ ) nas médias da motilidade espermática, entre os tratamento 1 ( $49,8\pm10,6\%$ ), tratamento 2 ( $50,2\pm12,1\%$ ) e o controle ( $40,7\pm12,4\%$ ), enquanto que não houve diferença ( $p>0,05$ ) nos valores médios do vigor, entre os tratamentos 1 ( $3,5\pm0,4$ ), 2 ( $3,5\pm0,4$ ) e o controle ( $3,4\pm0,5$ ); houve diferença ( $p<0,5$ ) dos valores médios entre os tratamentos 1 ( $3,5\pm0,4$ ) e 2 ( $3,5\pm0,4$ ), onde o tratamento 2 apresentou um vigor espermático melhor. No teste supra vital observou-se diferença nos valores médios da porcentagem de espermatozoides vivos entre os tratamentos 1 ( $44,8\pm10,7\%$ ), 2 ( $45,8\pm13,1\%$ ) e o controle ( $36,9\pm13,3\%$ ). Em relação ao teste hiposmótico os tratamentos 1 ( $51,3\pm10,3\%$ ) e tratamento 2 ( $49,2\pm12,01\%$ ), não apresentaram diferença ( $p>0,05$ ), porém diferem ( $p<0,05$ ) do controle ( $42,4\pm12,1\%$ ). Nos defeitos espermáticos todos os tratamentos se mantiveram dentro dos parâmetros aceitáveis para defeitos maiores, menores e defeitos totais. Já no teste de fluorescência o controle apresentou a maior porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial e membrana íntegra (BAMI) ou membrana lesada (BAML), respectivamente ( $25,2\pm14,9\%$ ) e ( $50,2\pm16,0\%$ ) do que os tratamentos; 1

(11,3±11,2; 33,8±13,9%), 2 (15,3±11,5; 35,1±12,9%), 3 (17,6±11,7; 50,1±18,8%). Quanto aos padrões de alta atividade mitocondrial membrana íntegra (AAMI), o grupo controle (23,2±13,6%) obteve médias inferiores aos tratamentos 1 (51,3±18,6; 3,2±4,5%) e 2 (47,3±16,3; 2,3±4,3). Porém nos padrões de alta atividade mitocôndria e membrana lesada (AAML) não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre o controle (1,5±2,0%) e os tratamentos; 1 (3,2±4,5%), 2 (2,3±4,3%) e 3 (1,8±3,9%). A adição de antocianina proveniente do açaí ao diluente contribuiu para melhorar a preservação da integridade das membranas na congelação do sêmen Caprino.

## ABSTRACT

RAMOS, Priscilla do Carmo de Azevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012.  
**Use of anthocyanin in goat seminal cryopreservation.** Advisor: José Domingos Guimarães.  
Co-advisor: Eduardo Paulino da Costa.

The aim of the study was to verify whether the anthocyanin has an effect on the plasma membrane integrity of goats spermatozoa and investigate the potential use of antioxidants in diluents goats semen cryopreservation. The semen from each collection was named after player game, where at the end of the experiment were 10 frozen straws of 0.25 mL of each game totaling 400 frozen straws of each treatment and control. After dilution 1:1 (sperm x diluent ) determined sperm concentration. Then, the fresh semen was diluted with tinner Bovimix® (control); Bovimix® + 2.5% de antocinina (treatment 1); Bovimix® +2.5% antocianina + 2.5% de ciclodextrina (treatment 2 ); Bovimix® +2.5% antocianina + 2.5% de ciclodextrina (atomizado) (treatment 3). After the final dilution, the semen was submitted to the filling, cooling and freezing. After seven days, the matches were thawed in a water bath - Maria at 37 ° C for semen evaluation post - thawing (total sperm motility, progressive straight, sperm vigor, supra vital test, fluorescence, and morphology). has shown a significant difference ( $p<0.05$ ) between treatment 1 ( $49.8\pm10.6\%$ ), treatment 2 ( $50.2\pm12.1\%$ ) and control ( $40.7\pm12.4\%$ ), while there was no statistical difference ( $p>0.05$ ) between the force of group 1 ( $3.2\pm0.4$ ), 2 ( $3.4\pm0.4$ ), and control ( $3.3\pm0.5$ ); there was a difference between treatments ( $3.2\pm0.4$ ) and 2 ( $3.4\pm0.4$ ), where treatment 2 showed a better effect. In the test above was vital - difference in the percentage of live sperm between treatment 1 ( $44.8\pm10.7\%$ ), 2 ( $45.8\pm13.1\%$ ) and control ( $36.9\pm13.3\%$ ). Regarding testing a hypoosmotic treatment ( $51.3\pm10.3$ ) and treatment 2 ( $49.2\pm12.1\%$ ), not different ( $p<0.05$ ), but differ ( $p>0.05$ ) from control ( $42.4\pm12.1\%$ ), in sperm defects All treatments were maintained within acceptable parameters for defects and total defects, since the fluorescent assay control had the highest percentage of sperm with low mitochondrial activity and membrane includes (Bami) or damaged membrane (BAML), respectively ( $14.9\pm25.2\%$ ) and ( $50.2\pm16.1\%$ ) of the treatments: 1 ( $11.3\pm11.2$ ;  $33.8\pm13.9\%$ ) , 2 ( $15.3\pm11.5$ ;  $35.1\pm12.9\%$ ), 3 ( $17.6\pm11.7$ ;  $50.1\pm18.8\%$ ). The standards mitochondrial membrane integrates high activity (AAMI), the control group ( $23.2\pm13.6\%$ ) averaged less than the first treatment ( $51.3\pm18.6$ ;  $3.2\pm4.5\%$ ) and 2 ( $47.3\pm16.3$ ;  $2.3\pm4.3\%$ ). But the standards high activity and mitochondrial membrane damaged (AAML) was not different ( $p>0.05$ ) between control ( $1.5\pm2.0\%$ ) and treatments; 1 ( $3.2\pm4.5\%$ ), 2

( $2.3 \pm 4.3\%$ ) and 3 ( $1.8 \pm 3.0\%$ ). The anthocyanins additions from acai to the diluent improved the membrane integrity preservation in Caprino semen freezing.

## 1. INTRODUÇÃO

Constantes mudanças ocorrem na caprinocultura brasileira, apesar da Região Nordeste se destacar pelo desenvolvimento da produção de caprinos, onde se encontra a quase totalidade do rebanho nacional (91%) (ANUALPEC, 2011). Em outras regiões, o número de criatórios tem aumentado, devido à aptidão desta espécie na produção de carne ou leite. Além disso, a pequena oferta de produtos oriundos dessa espécie e a crescente demanda têm encorajado muitos pecuaristas a diversificarem suas atividades por meio da caprinocultura.

Devido à estacionalidade reprodutiva que ocorre nessa espécie, em algumas regiões do Brasil, nem sempre é possível obter bons resultados na distribuição de parições ao longo do ano utilizando-se o estro natural. Sendo assim, os criadores podem recorrer à sincronização artificial do estro, por meio da sua indução com uso da terapia hormonal (MEDEIROS et al., 1994), visto que, a Inseminação Artificial (I.A) pode ser programada e realizada em um grande número de fêmeas em período pré - determinado, resultando na concentração da época de parição das fêmeas, o que possibilita a melhor programação da oferta de produtos ao mercado consumidor. (GONÇALVES et al., 2001).

O desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação de sêmen é um dos passos mais importantes no avanço da reprodução animal nas diferentes espécies e vem sendo alcançado pela aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas (PAPA et al., 2002). A criopreservação é uma biotécnica que permite o armazenamento de material genético por tempo indefinido. No entanto, o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade quando comparado com sêmen fresco (GUTHRIE et al., 2002). Com isto, é necessário que testes sejam realizados para avaliar as condições do sêmen criopreservado, e prever qual a capacidade de fertilização do mesmo. Para conhecer a extensão dos danos causados à célula espermática e aperfeiçoar os métodos de criopreservação, é de grande importância a análise de parâmetros que não são empregados na rotina da avaliação seminal. Sendo importante estudar técnicas que possam mensurar a extensão dos danos à célula espermática pela ação deletéria, direta e/ou indiretamente, causada pela criopreservação do sêmen, buscando melhor acurácia na avaliação do sêmen criopreservado e aumentar as taxas de fertilidade.

Relatos sobre a resistência dos espermatozoides ao processo de congelamento datam de 1776 por Spallazini, seguida por Ivanovi (1921 – 1924), porém foi somente a partir de

1949 quando os cientistas ingleses Polge, Smith e Parkers descobriram os efeitos crioprotetores do glicerol que a criopreservação tornou-se uma biotécnica capaz de manter a viabilidade espermática de forma satisfatória. Desde então, estudos vem sendo realizados em busca de novos agentes crioprotetores, meio de diluição e protocolos de congelamento / descongelamento. No entanto, ainda há uma perda grande dos espermatozóides submetidos ao congelamento por danos ultra-estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais nos diferentes componentes da célula espermática.

Embora imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelamento, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozoide, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000). Em elevadas concentrações, os crioprotetores podem reduzir a capacidade fertilizante deste gameta devido à lesão por danos osmóticos (GRAHAM, 1996).

Existem relatos referentes a ejaculados que apresentaram elevados índices de viabilidade espermática, tanto antes quanto após o congelamento, os quais possuíam elevada atividade de antioxidantes enzimáticos, como SOD e glutathione peroxidase dependente de selênio (GSP-Pe-Se), assim como de antioxidantes não enzimáticos, como glutathione reduzida e vitamina E. A elaboração de protocolos de congelamento o deve considerar a quantificação de ROS geradas e a identificação das substâncias que possam atuar na proteção das células espermáticas aos efeitos oxidativos ocorridos na criopreservação do sêmen (VALENÇA & GUERRA, 2007).

Devido a esses fatores, a antocianina, por ser um potente antioxidante pode melhorar a viabilidade do espermatozoide quando adicionada ao diluente no processo de criopreservação.

O objetivo com este experimento é verificar o efeito do uso da antocianina sobre a viabilidade da célula espermática de caprinos durante o processo de criopreservação, analisando os parâmetros quali-quantitativos do sêmen de caprino com uso da antocianina em pasta ou atomizada no diluente durante a fase de pós – congelamento e avaliar a integridade do acrossoma e da membrana espermática por meio de testes complementares (HOST, supra vital e sondas fluorescentes – Iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína, e pelo teste de termo resistência.



## 2. .REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Criopreservação de Sêmen

A utilização das biotecnologias aplicadas à reprodução permite maximizar genéticas superiores para obtenção de produtos de elevado ganho de peso e boa qualidade de carcaça. Neste contexto, o processo de criopreservação de sêmen tem contribuição importante no incremento da produção em rebanhos comerciais, nos quais a lucratividade depende da alta eficiência reprodutiva.

A utilização de sêmen criopreservado maximiza o uso de outras biotecnologias da reprodução como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões (PIV).

Apesar de inúmeras técnicas de criopreservação, a inseminação artificial é uma biotecnologia reprodutiva de custos mais acessíveis e serve como uma ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos. Todavia, para sua aplicação ampla é indispensável o uso de sêmen congelado. Adicionalmente, permite disponibilizar, em curto espaço de tempo, uma grande quantidade de reprodutores com patrimônio genético avaliado (ASBIA, 2006).

A temperatura do sêmen no momento da ejaculação é de aproximadamente 37,5 °C. A exposição do sêmen a temperaturas superiores a essa aumenta o ritmo metabólico e esgota suas reservas energéticas, ocorrendo decréscimo da viabilidade média do espermatozoide. Por outro lado, a diminuição da temperatura contribui para a redução do metabolismo espermático, além disso, a diminuição dessa temperatura de forma abrupta produzirá a perda da viabilidade celular (WATSON, 1981). Produtos do metabolismo como o ácido láctico e, ou, gás carbônico podem aumentar a acidez do sêmen, desencadeando danos celulares irreversíveis (MCKINNON, 1996). A peroxidação dos lipídios da membrana leva à perda de sua integridade, o que prejudica a função celular e, conseqüentemente, diminui a motilidade do espermatozóide (AURICH et al., 1996). Quando os espermatozoides são armazenados a 5 °C, as necessidades metabólicas decrescem a aproximadamente 10 % daquela que teriam se estivessem à temperatura de 37 °C. Em conseqüência, a produção de catabólitos será menor e a peroxidação da membrana plasmática será mais lenta, de modo que o desgaste da célula não ocorra de forma tão rápida (MCKINNON, 1996).

Para o sucesso na preservação dos espermatozoides pelo resfriamento, é necessário seguir uma série de passos que visem à redução nos danos causados às células e que

asseguem longevidade *in vitro* e *in vivo*, a saber: taxa da diluição adequada, diluentes, substâncias protetoras, taxas adequadas de resfriamento (FASTAD, 1996) e manutenção em temperaturas específicas que reduzam o metabolismo, minimizem os danos na membrana e não desencadeiem prematuramente a capacitação e a reação acrossômica (LOOMIS, 1992).

## 2.2 Capacitação Espermática

A capacitação espermática é de fundamental importância para que os espermatozoides tornem-se aptos para fecundar *in vivo*. Esse processo ocorre no trato genital feminino pela remoção de componentes decapitantes, sem modificações morfológicas, mas bioquímicas, que resultam em desestabilização (fluidez) da membrana plasmática e hiperativação espermática, essenciais para que ocorram a reação do acrossomo e a penetração do espermatozoide no ovócito (IRITANI *et al.*, 1977).

Algumas glicosaminoglicanas presentes no trato genital feminino são responsabilizadas por induzirem a capacitação espermática *in vivo*. Nos processos *in vitro*, uma glicosaminoglicana, a heparina, tem sido utilizada para capacitar espermatozoides em bovinos. O mecanismo pelo qual a heparina atua na capacitação espermática não é completamente conhecido, todavia, parece estar envolvido no desencadeamento de mudanças bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide. Sua ligação com o espermatozoide é mediada, provavelmente, por proteínas, como a proteína carreadora de heparina (HBP) presentes no plasma seminal de touros (MONTAGNER *et al.*, 1999).

A remoção do plasma seminal por centrifugação ou migração espontânea é uma condição semelhante para o processo de capacitação "*In vitro*". Contudo, a capacitação pode ser revertida, ressuspensão o espermatozoide capacitado no plasma seminal ou nos diluidores de sêmen. Dessa maneira, este se torna decapitado e requer tempo adicional para capacitação antes de reaver sua fertilidade (DELPECH E THIBAUT, 1993; SENER, 2003).

Mudanças nos componentes da membrana espermática seguem-se progressivamente: perda de proteínas ou redução de seu peso molecular, redução da proporção de colesterol: fosfolípido, aumento da mobilidade lateral de lipídios e proteínas (DELPECH E THIBAUT, 1993; GADELLA *et al.*, 2001). As proporções de colesterol: fosfolípidos na membrana plasmática e na membrana acrossômica externa diminuem, aumentando sua fluidez

(DELPECH E THIBAUT, 1993). O fluxo de colesterol ocorre devido sua transferência para albuminas e lipoproteínas de alta densidade da tuba uterina (AMANN E GRAHAM, 1993; DELPECH E THIBAUT, 1993; GADELLA et al., 2001). O colesterol tem uma importante função na estabilização de membranas. A desestabilização da membrana provocada pela remoção do colesterol promove a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (AMANN E GRAHAM, 1992; GADELLA et al., 2001; GADELLA E COLENBRANDER, 2003).

Há evidências de que o bicarbonato também facilite a desorganização da membrana (COLENBRANDER et al., 2002; GADELLA et al., 2001), principalmente na região apical da cabeça do espermatozóide (GADELLA E COLENBRANDER, 2003). Consequentemente, foi sugerido que a capacitação das células espermáticas dos mamíferos “*in vivo*” fosse dependente de bicarbonato, supostamente presente em níveis maiores na tuba uterina (20 mM) do que no fluido espermático (<1 mM) (FLESCHE E GADELLA, 2000; COLENBRANDER et al., 2002; GADELLA E COLENBRANDER, 2003). As respostas induzidas pelo bicarbonato podem diferir de acordo com as regiões da célula espermática, como cabeça e cauda (VISCONTI E KOPF, 1998; GADELLA E COLENBRANDER, 2003). O bicarbonato estimula uma forma solúvel de adenilciclase (AC), abundante nos espermatozóides, resultando no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que ativa uma proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, induz a fosforilação de tirosina de vários substratos (VISCONTI E KOPF, 1998; FLESCHE E GADELLA, 2000; GADELLA E COLENBRANDER, 2003).

Em consequência, as proteínas da membrana plasmática, relacionadas com a ligação na zona pelúcida se tornam ativadas. Além disso, a fosfolipase C (PLC) do citosol é fosforilada e translocada para a membrana plasmática (FLESCHE E GADELLA, 2000; GADELLA et al., 2001). Estudos de COLENBRANDER et al. (2002) e FLESCHE et al. (2001) demonstraram a presença de colesterol na superfície da cabeça do espermatozóide na ausência de bicarbonato e nas regiões apical, equatorial e pós-acrossomal, em sua presença. A desestabilização afeta a porção lipídica da membrana, alterando a permeabilidade iônica, particularmente do cálcio, e as propriedades da capacidade de fusão da membrana, as quais são importantes para a reação acrossômica (AMANN E GRAHAM, 1993).

## 2.3 Problemas Associados ao Sêmen

Os processos de refrigeração, congelamento e descongelamento causam danos à membrana plasmática e acrossomal, motilidade espermática progressiva e metabolismo espermático para produção de energia, prejudicando o tempo de sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozóides nos órgãos genitais femininos (WATSON, 2000). Uma das injúrias ocasionadas aos espermatozóides é a oxidação lipídica das membranas (JONES E MANN, 1977) causada pelo estresse oxidativo devido à produção excessiva de radicais livres, os quais estão associados com o declínio da fertilidade do sêmen após o período de estocagem (MAXWELL E WATSON, 1996).

Segundo Nunes (2001), a secreção de grandes quantidades de fosfolipase A contida no plasma seminal tem efeito deletério nos processos de preservação do sêmen, agindo sobre os fosfolipídios dos diluentes. O mesmo autor, demonstrou que o congelamento do sêmen caprino diluído em leite, contendo acima de 10 mg de fosfolipídios causa a morte de todos os espermatozoides.

### 2.3.1 Oxigênio Espécie Reativo (ROS) e o sêmen

A infertilidade é uma síndrome multifatorial que abrange uma grande variedade de desordens, que podem ser congênitas ou adquiridas. As causas podem ser deficiência de gonadotropinas, aberrações cromossômicas, desordens genéticas, drogas, infecções genitais e doenças autoimunes, entre outras (AITKEN, 1997). Acredita-se que alguns destes defeitos possam ser causados por uma excessiva produção de oxigênio espécie reativa (ROS) no plasma seminal, levando a um estresse oxidativo. Este fato resulta em sérios danos aos espermatozóides como diminuição da motilidade e viabilidade espermática, comprometendo a capacitação e reação acrossômica (YANAGIMACHI, 1994).

A capacidade de fertilização dos espermatozóides é dependente, entre outros fatores, da sua motilidade e da integridade de sua membrana. As substâncias oxidativas, quando produzidas em excesso no organismo, em particular no líquido seminal comprometem a motilidade do espermatozóide e a sua viabilidade em promover a fertilização (CARVALHO et al., 2002 ).

Segundo Gadella e Colenbrander (2003) o bicarbonato agiria na cauda espermática levando a fosforilação da tirosina, induzindo a hipermotilidade. Esta se caracteriza por aumento da amplitude do batimento flagelar, devido a maior flexibilidade principalmente na peça intermediária, e mudança do movimento progressivo que se torna circular, devido a não rotação da cabeça do espermatozóide (DELPECH E THIBAUT, 1993; BEDFORD, 2003). Os processos de hiperativação e capacitação espermática envolvem mecanismos distintos (AMANN E GRAHAM, 1993; DELPECH E THIBAUT, 1993; BEDFORD, 2003;). A liberação de colesterol e a redistribuição de proteínas da membrana plasmática permitem a abertura dos canais de cálcio e, conseqüentemente, o aumento do cálcio intracelular.

Contudo, há evidências de que a hiperativação esteja mais diretamente relacionada aos níveis de AMPc do que com o influxo de cálcio. Um aumento progressivo nos níveis de AMPc, o qual é cálcio dependente, precede o início da motilidade hiperativada (DELPECH E THIBAUT, 1993). BEDFORD (2003) sugeriu que a hiperativação maximiza a chance de contato dos poucos espermatozóides presentes na ampola com o ovócito e ajuda no transporte espermático do istmo para a ampola, facilitando a penetração no ovócito.

O uso do oxigênio pelas células é essencial para manutenção das funções vitais, porém reativas de oxigênio (ROS) que, em concentrações adequadas, contribuem para o bom funcionamento celular e quando em excesso produzem danos importantes. Especificamente, no caso dos espermatozóides, concentrações normais de ROS estimulam a capacitação, reação acrossômica e fusão com o ovócito enquanto que concentrações aumentadas diminuem a motilidade e causam dano ao DNA celular (ZINI et al., 1995; AGARWAL E SALEH, 2002).

Um dos agentes oxidantes capazes de promover estes efeitos é o óxido nítrico (ON-), responsável pela mediação em vários processos fisiológicos (CARVALHO et al., 2002). O uso de terapias antioxidantes no tratamento de alguns tipos de infertilidade deve ser feito com cautela, pois uma inibição muito severa poderá comprometer as taxas de ON e, conseqüentemente, irá influenciar outros mecanismos fisiológicos dependentes de sua concentração (CARVALHO et al., 2002).

## 2.4 Os Antioxidantes

Substâncias antioxidantes têm sido utilizadas para prevenir a produção ou os efeitos deletérios do estresse oxidativo causado pela excessiva quantidade de oxidantes. Todavia, a ação dos antioxidantes depende do tipo e da concentração de ROS produzidas (AGARWAL et al., 2004), além do tempo de incubação da célula espermática pós descongelamento (WATSON, 2000).

Os alimentos contêm compostos oxidantes, os quais podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidos durante o processamento para o consumo. Por outro lado, os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes, também contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (McDOWELL, 2000). No século passado, a partir dos anos 80, deu-se o início às pesquisas com antioxidantes naturais visando à substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos, aos quais se atribuem efeitos deletérios ao organismo animal quando utilizados em doses elevadas (McDOWELL, 2000). Além dos possíveis riscos que o uso irregular e/ou indiscriminado dos antioxidantes sintéticos pode acarretar ao animal, soma-se a rejeição generalizada dos aditivos alimentares sintéticos.

Ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa e restringir a utilização dos antioxidantes sintéticos (LEHNINGER et al., 2005). Os antioxidantes sintéticos mais empregados são o butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e butilhidroquinonas terciárias e em alguns casos a ação sinérgica do ácido cítrico é indispensável. Estes agentes antioxidantes tendem a estabilizar os ácidos graxos por meio da reação com radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação da oxidação lipídica.

Os antioxidantes naturais ou artificiais apresentam funções similares, sendo que vem sendo questionada a salubridade de alguns antioxidantes comerciais, visto que alguns estudos têm demonstrado que os mesmos podem favorecer efeitos mutagênicos e carcinogênicos, também como o aumento da formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nos microssomos, que ocasiona alteração das funções hepáticas e adenomas e carcinomas em células hepáticas

(BAKER et al., 1996). Frente a estas evidências, desenvolveu-se a pesquisa sobre os antioxidantes de origem natural, com a perspectiva de sua utilização como aditivos celulares, como também pelas evidências de que estes compostos podem atuar em benefício da saúde. (BAKER et al., 1996).

O interesse pelos antioxidantes naturais teve início diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT, BHA e t-BHQ (t-butil hidroquinona) sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outras. Numerosos antioxidantes possuem benefícios provados no tratamento da infertilidade em machos, como a Vitamina C, Vitamina E, Glutathione e a Coenzima Q10 - 11(SINCLAIR, 2000). Antioxidantes podem proteger os espermatozóides contra os efeitos danosos de ROS (BAKER et al., 1996).

Segundo Donnelly et al. (1999) o ácido ascórbico atua como inibidor de uma grande variedade de ROS e possui habilidade de contrapor ao efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos danos causados ao DNA espermático.

Estudos têm mostrado que a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é capaz de interagir diretamente com radicais oxidantes (JONES et al., 1997) interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica em biomembranas e lipoproteínas (DIEBER-ROTHENEDER et al., 1991), protegendo as células de estresse oxidativo (KAGAN et al., 1992), de danos nas membranas plasmática e acrossomal, bem como do DNA (SIKKA, 2004). O trolox (6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxylic acid) é um análogo hidrossolúvel do  $\alpha$ -tocoferol que, devido à sua solubilidade em água, apresenta potente propriedade antioxidante (WU et al., 1991), inibindo as reações oxidativas e neutralizando os efeitos deletérios dos radicais peróxilas (SILVA et al., 2007).

Tem sido relatado também que o ácido ascórbico e o  $\alpha$  - tocoferol agem sinergicamente para evitar a peroxidação lipídica da célula por meio da redução da produção de ROS induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DONNELLY et al., 1999). Ácidos graxos poli-insaturados são necessários para eventos de fusão da membrana associados à fertilização. No entanto, a presença deles acarreta uma vulnerabilidade para os danos peroxidativos. Sob várias condições de tensão oxidativa, o início da cascata da peroxidação lipídica resulta em perda da fluidez e prejuízo da função espermática.

Por serem hidrofóbicos, os tocoferóis associam-se com as membranas celulares, depósitos lipídicos e lipoproteínas sanguíneas. Os tocoferóis são antioxidantes biológicos, o anel aromático reage e destrói a maioria das formas reativas de oxigênio e outros radicais livres, protegendo os ácidos graxos insaturados da oxidação e prevenindo o dano oxidativo das membranas lipídicas que pode causar fragilidade celular (LEHNINGER et al., 2005).

Há evidências de que os tocoferóis têm uma função específica nas membranas celulares. Os tocoferóis podem interagir intimamente com o ácido araquidônico e com outros ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa em membranas, levando a estabilização da estrutura da membrana e também a proteção dos ácidos graxos contra danos oxidativos (BENDER, 2003).

Os radicais livres podem causar danos não somente na célula em que se originaram, mas podem migrar e causar danos em células adjacentes, nas quais mais radicais livres serão formados em uma cadeia de reações que leva à destruição tecidual. A vitamina E interrompe a produção de radicais livres no estágio inicial (McDOWELL, 2000).

A função antioxidante da vitamina E está estritamente relacionada ao mineral Selênio (Se), segundo Marin-guzman et al. 1989; citado por McDowell, 2000, a suplementação de vitamina E e Se aumentou a qualidade do sêmen de javalis.

A membrana plasmática dos espermatozóides é rica em ácidos graxos poliinsaturados sendo vulnerável ao processo de peroxidação lipídica, o que pode prejudicar a estrutura celular, motilidade, sobrevivência e funções metabólicas do espermatozóide. O estresse oxidativo pode induzir dano ao DNA espermático, podendo ser responsável pela aceleração do processo de apoptose da célula germinativa, levando a diminuição da concentração de espermatozóides e à aparente deterioração da qualidade seminal em Caprinos (LUCCHESI et al., 2009).

## 2.5 O Açaí (EUTERPE OREACEAE)

O Açaí (*Euterpe oreaceae*) é um fruto bacáceo roxo oriundo de uma palmeira conhecida como açaizeiro (figura 01). É uma espécie nativa das várzeas da região amazônica, especificamente na Venezuela, Colômbia, Equador, Guianas, e Brasil (estados do Amazonas, Amapá, Pará, Maranhão, Rondônia e Acre), assim como em Trinidad e Tobago e nas bacias



do Pacífico na Colômbia e no Equador (EMBRAPA, 2005). É um alimento muito importante na dieta dos habitantes do Pará, onde seu consumo remonta aos tempos pré-colombianos. Hoje em dia é cultivado não só na Região Amazônica, mas em diversos outros estados brasileiros, sendo introduzido no resto do mercado nacional durante os anos oitenta e noventa (EMBRAPA, 2005).

O fruto do açaizeiro é considerado alimento de alto valor calórico, com elevado percentual de Proteínas (13,0 g/100g), Lipídios totais (48,0 g/100g), Açúcares totais (1,5 g/100g), Açúcares redutores (1,5 g/100g), Frutose (0,0 g/100g), Glicose (1,5 g/100g), Sacarose (0,0 g/100g), Fibras Brutas (34,0 g/100g), Energia (66,3 Kcal/100g), Cinzas (3,50 g/100 g), Sódio (56,40 mg/100 g), Potássio (932,0 mg/100 g), Cálcio (286,00), Magnésio (174,00 mg/100 g), Ferro (1,50 mg/100 g), Cobre (1,70 mg/100 g), Zinco (7,00 mg/100 g), Fósforo (124,00 mg/100 g), Vitamina B1 (0,25 mg/100 g),  $\alpha$ -Tocoferol (vitamina E) (45,0 mg/100 g) e antocianinas (0,73 a 1,60 g/100 g) (EMBRAPA, 2005).



Figura 1: Palmeira conhecida como açaizeiro.

#### 2.5.1 Bioatividade do açaí (antocianina)

Além de sua histórica importância na alimentação dos amazônidas, mais recentemente foi demonstrado que o açaí (antocianina) possui uma das maiores atividades antioxidantes da natureza, sendo utilizado em várias biotecnologias, obtendo-se resultados satisfatórios (SPADA et al., 2008).

O açaí (antocianina) foi empregado com sucesso em células cerebrais do hipocampo e cerebelo de ratos, diminuindo os danos causados pelos peróxidos nos lipídios e proteínas destes tecidos, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase), tendo uma contribuição positiva na redução do desenvolvimento de doenças degenerativas ocasionadas pela idade (SPADA et al., 2008). SCHAUSS et al., (2006) demonstraram que os antioxidantes do açaí são capazes de entrar em células humanas de uma forma totalmente funcional e realizar uma função de resfriamento de oxigênio em doses muito baixas.

A fruta açaí (antocianina) foi analisada também com relação ao seu efeito antimutagênico contra o peróxido de hidrogênio e esse efeito foi positivamente correlacionado com a atividade da catalase, sugerindo que o açaí contribui para prevenção de danos biológicos (SPADA et al., 2008). Além de atenuar a reação ao stress inflamatório nas células microgliais BV-2 (neurônios hipocâmpais primários) de ratos. (POULOSE et al., 2012).

Pozo – innfran et al., (2006) relataram o potencial benefício do uso do açaí (antocianina) na saúde, quando comprovaram que o antioxidante induzia a apoptose das células HL-60, causadoras da leucemia; reduzindo a proliferação celular e aumentando a ativação da caspase-3 (apoptose).

Hatani et al., (2011) promoveram um pré-tratamento de ratos sensibilizado ao IgE em cultura de células de mastócitos com açaí (antocianina), onde encontraram que o antioxidante promove uma dramática supressão do antígeno que promove a degranulação, similarmente suprime a IgE que media a degranulação e a transcrição de genes das citocinas a partir de uma linha de células de mastócitos cultivadas da leucemia basofílica de ratos (RBL)-2H3, estes pesquisadores demonstraram que o açaí (antocianina) é um potente inibidor da ativação mediada por IgE nos mastócitos.

A utilidade medicinal e nutracêutica do açaí ocorre por sua propriedade antioxidante e no combate à formação de radicais livres no organismo humano que são importantes contra o acúmulo de depósito de colesterol nos vasos sanguíneos, aterosclerose (SATUE-GRACIA et al., 1997), prevenção da oxidação de LDL<sup>1</sup>, por atividade de agregação antiplaquetária (DUTHIE et al, 2000), ou inibição direta da oxidação das LDL's (HEINONEIN et al., 1998). Os resultados da pesquisa de Sampaio (2006) demonstraram que o açaí a 14% de matéria seca

---

<sup>1</sup> Lipoproteína de baixa densidade relacionada ao armazenamento de lipídios (ESCOTT-STUMP, 2003).

para consumo, apresenta boa atividade antioxidante das LDL's em plasma humano de indivíduos susceptíveis.

Assim, as alterações ocasionadas pelo açaí, às células, devido sua atividade antioxidante, as análises e os estudos voltados a esse assunto envolvem a otimização para tecnologias aplicadas ao melhoramento do potencial reprodutivo, da qualidade do sêmen congelado, a baixos custos, viabilizando interesses comerciais e industriais. Além disso, os estudos de caracterização estão voltados ao açaí (antocianina) sob forma de extrato pastoso e atomizado, onde esses extratos tem sua atividade oxidante mais prolongada se armazenados de forma ideal, ao abrigo de luz.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local do Experimento e Animais

O estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, Brasil. O município está localizado a uma altitude de 649 m e tem como coordenadas geográficas o paralelo de 20°45'14'', latitude sul, e o meridiano de 42°52'54'', longitude oeste. A temperatura média anual é de 18,5 °C e o clima da região é, segundo a classificação de Köppen, do tipo Cwa - clima tropical de altitude com inverno seco e verão chuvoso.

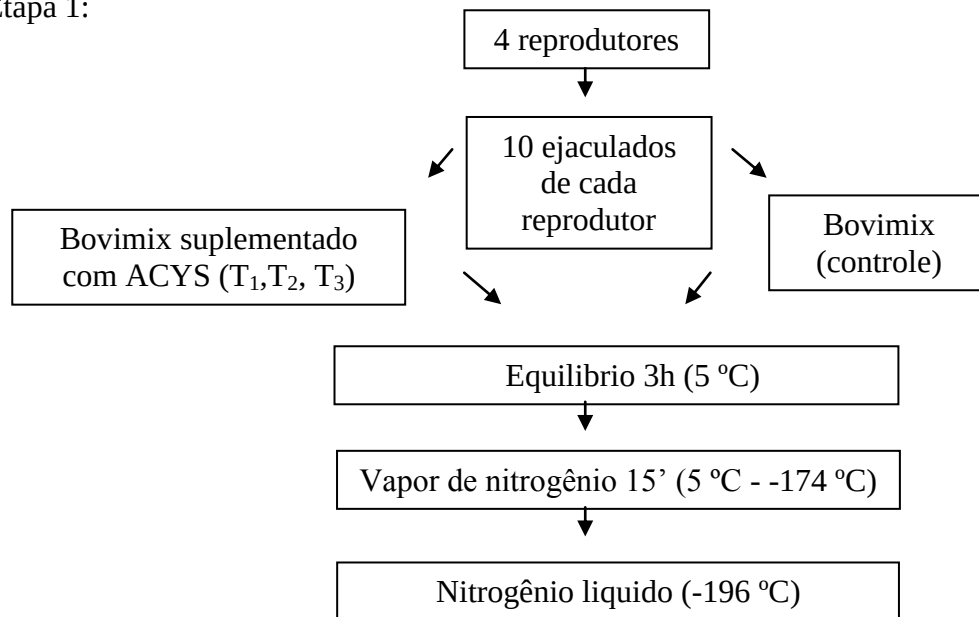
Foram utilizados quatro reprodutores caprinos da raça Alpina (figura 02), com boa condição corporal, aproximadamente dois anos de idade, avaliados e aprovados para reprodução por meio de exame andrológico de acordo com os padrões de qualidade de sêmen *in natura* e *in vitro* preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998). A alimentação foi ofertada duas vezes ao dia sendo composta por silagem de feno e concentrado protéico (550 g/dia). Água e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. O manejo sanitário empregado foi eficiente, com os animais mostrando-se vacinados contra clostridioses e vermifugados periodicamente para endo e ectoparasitas.



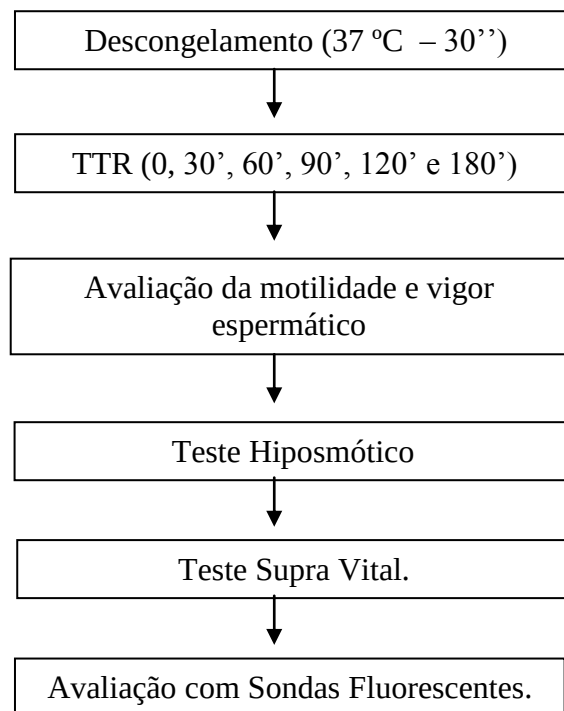
Figura 2: Caprino da raça Alpina em utilizado durante o período experimental.

### 3.2. Etapas de Execução da Criopreservação de Sêmen Caprino e Análise de Dados.

Etapa 1:



Etapa 2:



### 3.3. Extração da antocianina.

A extração da antocianina ocorreu no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, MG. Brasil. A extração do pigmento foi realizada de acordo com Silva (1996), onde quinhentos gramas de polpa de Açaí congelada foram utilizadas, foram adicionados 80 mL de Solvente extrator (Etanol-Água (70:30)) e HCl suficiente para ajustar o pH do meio para 2,0. O material foi, então, deixado em repouso por 24 horas a 5°C, ao abrigo da luz, para extração. Findado o período, o material foi prensado manualmente em filtro de tecido, com o fim de reter o resíduo, e o extrato transferido para balão volumétrico de 100 mL (VEc), tendo seu volume completado com o solvente extrator, formando o Extrato Concentrado (EC).

O conteúdo do balão foi centrifugado a uma força gravitacional de 3 G , por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado, posteriormente, em papel Whatman nº 1. Após a filtração, o extrato foi purificado, extraíndo-se (três extrações sucessivas). O método de pH único consistiu da transferência quantitativa de uma alíquota (VALq) do Extrato Concentrado para balão volumétrico (VEd) de 10 mL , tendo o volume completado com solução Etanol 95%– HCl 1,5N (85/15), formando, dessa maneira, o Extrato Diluído (ED). Os valores de absorvância (DO) foram contrastados com os valores dos brancos (Solução Etanol- HCL 1,5N (85:15)). O cálculo do teor de Antocianinas Totais (AntT) por 100 gramas da fração avaliada foi efetuado obtendo – se a concentração de antocianinas e posteriormente a atividade antioxidante da antocianina utilizada no experimento

### 3.4. Diluidor utilizado.

O diluidor base utilizado em todo o experimento foi o Bovimix® (Nutricell Nutrientes Celulares Ltda) a base TRIS UNIVERSAL ([2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrioloethanol; Bis (2-hydroxyethyl) amino-tris (hydroxymethyl) methane; 2-Bis (2-hydroxyethyl) amino-2-(hydroxymethyl) -1,3-propanediol], contendo gema de ovo, estreptomicina, leite desnatado, penicilina, glicerol, de acordo como descrito por GUNZEL (1979), e mostrado na tabela 01. suplementado com antocianina (ACYS) e ciclodextina (CCC) em diferentes concentrações, formando os tratamentos experimentais: Controle – 100 % Bovimix; Tratamento1 - ACYS

2,5 %; Tratamento 2 - ACYS 2,5 % + CCC 2,5% e Tratamento 3 - ACYS 2,5% + CCC 2,5% atomizada (a).

Tabela 1– Composição Química do diluente base (BOVIMIX®)

| COMPONENTES     | QUANTIDADE |
|-----------------|------------|
| Tris            | 36,25mL    |
| Leite desnatado | 36,25mL    |
| Gema de ovo     | 20mL       |
| Penicilina      | 10UI/mL    |
| Estreptomicina  | 0,02mg/mL  |
| GliceroL        | 7 mL       |

Tabela 2 – Composição dos diluentes dos tratamentos 1,2, 3 e controle:

| TRATAMENTOS  | COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES                   |
|--------------|--------------------------------------------|
| Tratamento 1 | BOVIMIX + ACYS 2,5%,                       |
| Tratamento 2 | BOVIMIX + ACYS 2,5% + CCC 2,5%             |
| Tratamento 3 | BOVIMIX + ACYS 2,5% + CCC 2,5% (atomizado) |
| Controle     | BOVIMIX                                    |

### 3.5. Coleta do Sêmen

Os ejaculados foram obtidos com a utilização de manequim vivo (figura 03), respeitando-se o intervalo de dois dias para coleta seguinte do mesmo animal (duas coletas semanais de cada animal) para não levar a uma queda qualitativa e quantitativa (concentração e volume) do ejaculado. O ejaculado de cada reprodutor após coleta foi denominado partida, onde ao final do experimento todas as palhetas congeladas (10 palhetas de 0,25mL de cada partida) totalizaram 400 (40 x 10 ejaculados x 10 palhetas / ejaculado = 400 doses / tratamento) palhetas de cada tratamento e controle ou 40 partidas / tratamento. Os ejaculados foram coletados em tubos graduados ao abrigo de luz solar (figura 04).



Figura 3: Manequim vivo para coleta de sêmen



Figura 4 Vagina artificial com tubo graduado para coleta de sêmen.

#### 3.5.1 Avaliação do sêmen in natura

Após a coleta, o sêmen foi avaliado e após a diluição na proporção de 1:1 (sêmen x diluente) determinou-se a concentração espermática.

Uma alíquota do sêmen foi acondicionada em formol salino tamponado (HANCOK, 1959) para avaliação dos defeitos espermáticos em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x, e óleo de imersão. Após realizadas as avaliações iniciais e cálculo da concentração espermática, os sêmens foram adicionados aos diluidores contendo ou não a



antocianina, posteriormente reavaliados pós-diluição quanto as mesmas características seminais.

### 3.5.2 Avaliação do sêmen resfriado e congelado

Após a diluição, o sêmen já envasado ( $2 \times 10^6$  espermatozoides / mL) foi submetido ao processo de resfriamento e congelamento; onde o processo de resfriamento se deu a partir de uma curva de regressão a  $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$  até alcançar a temperatura de equilíbrio de  $5^\circ\text{C}$  em geladeira própria para resfriamento de sêmen, permanecendo durante três horas nessa temperatura. Posteriormente, o sêmen foi colocado em contato com o vapor de nitrogênio a 5 cm da altura da lâmina de nitrogênio líquido, em uma rampa de armazenamento de sêmen inserida em uma caixa isotérmica (isopor) de 50x50 cm contendo nitrogênio, por um período de quinze minutos, e em seguida submerso em nitrogênio líquido a  $-196^\circ\text{C}$ , as palhetas foram raqueadas e devidamente estocadas em bancos de sêmen.

Após sete dias, as partidas foram descongeladas em banho - Maria a  $37^\circ\text{C}$  durante trinta segundos, e foram colocadas em lâminas encobertas por lamínulas para avaliação do sêmen pós descongelamento (motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático).

Posteriormente, as amostras de sêmen foram submetidas ao teste de termo resistência (TTR), sendo que a motilidade espermática progressiva retilínea foi avaliada com o tempo de 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos de incubação em banho-maria a  $38^\circ\text{C}$  (VOGLER et al., 1991). Conforme descrito pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) o sêmen descongelado também foi avaliado em preparação úmida, analisando o percentual de defeitos espermáticos presentes em 100 células, utilizando – se a microscopia em contraste de fase, em aumento de 1000x, sendo classificados em defeitos maiores, menores e totais, como preconizado por BLOM (1973). As amostras foram classificadas como aprovadas quando apresentaram valores mínimos de 30% e 3 para motilidade e vigor espermático, respectivamente, como preconizado pelo CBRA (1998) para sêmen congelado/descongelado.

### 3.5.3 Testes Complementares

Foi avaliada a integridade da membrana espermática com a utilização dos seguintes testes complementares:

### 3.5.3.1. Teste Hiposmótico (HOST)

Uma amostra de 20  $\mu$ L de sêmen pós-congelamento foi incubada com 1 mL de solução hiposmótica (1000 mL de água deionizada, 9 g de frutose e 4,9 g de citrato trissódico) com osmolaridade de 100 mOsmol (REVELL e MRODE, 1994) em banho-Maria a 37°C por 30 minutos, em seguida, uma amostra de 20  $\mu$ L foi colocada entre lamina/lamínula e avaliada em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x, um total de 100 células foram analisadas, e o número de células espermáticas com edema e dobramento de cauda, foram avaliados (Figura 5) (REVELL e MRODE, 1994). Posteriormente foi calculado o percentual de células reativas ao teste, empregando a fórmula preconizada por Melo e Henry (1999) subtraindo o total de caudas dobradas após o teste hiposmótico.

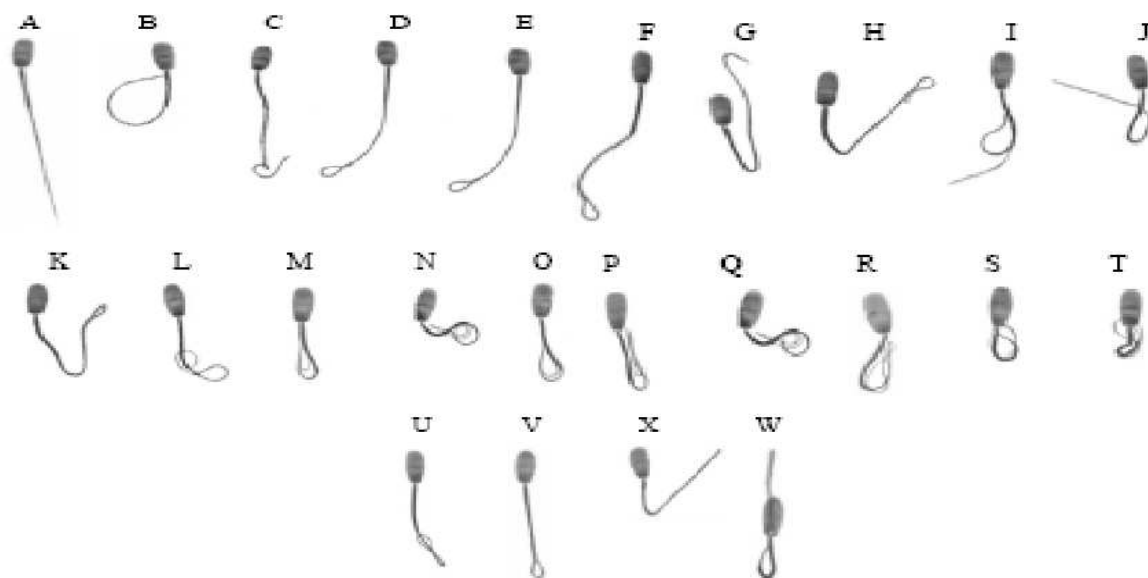


Figura 5: diferentes formas de dobramento da cauda dos espermatozóides caprinos submetidos ao teste hiposmótico (microscópio de contraste de fases, 1000x). (A) indica espermatozoide sem dobramento de cauda (lesado), (B-J) espermatozóides com a cauda dobrada (íntegro) e (K-W) espermatozóides com a cauda fortemente dobrada (íntegro). Adaptado de Fonseca et al. (2005).

### 3.5.3.2 Supra Vital

Uma amostra de sêmen congelado/descongelado de cada partida foi submetida à avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides empregando-se eosina-nigrosina na proporção 1:1 (sêmen:corante), classificando-os em vivos

(não-corados) e mortos (corados de rosa – avermelhados) (Figura 6) (SMITH E MURRY, 1997) após 60 segundos de confecção da lâmina (MAYER et al., 1951; SWANSON E BEARDEN, 1951).

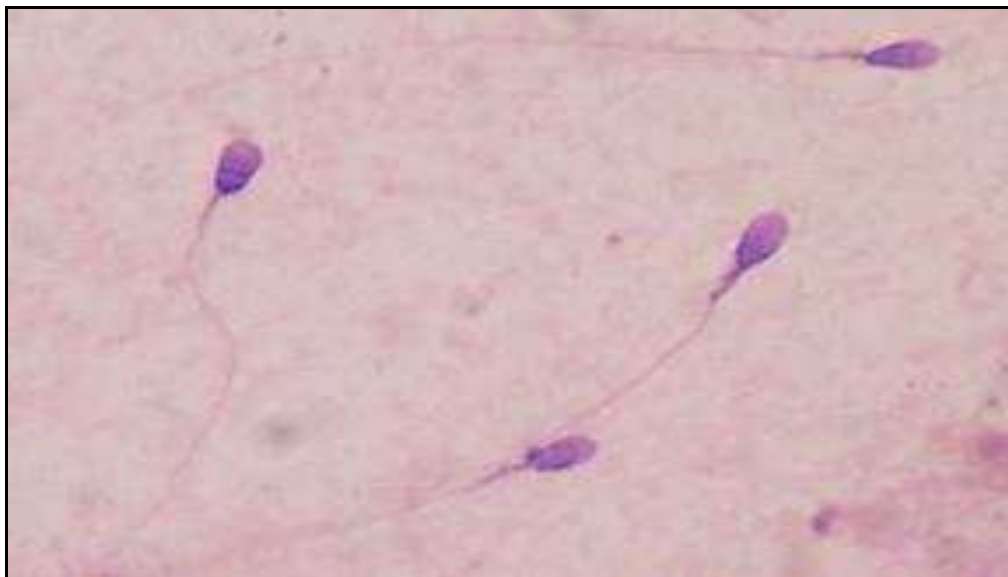


Figura 6: células espermáticas de caprinos coradas de rosa(mortos)

#### 3.5.3.3 Sondas Fluorescentes

Utilizou-se uma solução de Iodeto de propídeo (IP) (Sigma®, St. Louis, Mo, USA), diacetato de 6-carboxifluoresceína (DIC) (Molecular probes®, Inc., Eugene, Or, USA), 5,5',6,6'- tetrachloro -1,1',3,3' tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1) de acordo com o método descrito por Harrison e Vickers (1990), 20  $\mu$ L de sêmen pós descongelamento foram adicionados em 20  $\mu$ L de DIC + JC-1 + IP (Figura 07) e incubado em banho-Maria á 37°C por 8 minutos, alíquotas de 10  $\mu$ L do sêmen corado foram depositados entre lâmina/lamínula e observados sob microscópio epifluorescente (Fluorvet, Leitz, Germany) com aumento de 600x, as células espermáticas que se coraram em verde (DIC) ao longo de seu comprimento foram consideradas intactas, enquanto as outras, com diversos graus e /ou partes coradas foram classificadas como danificadas.

Os espermatozóides que se coraram em vermelho (IP) foram considerados lesados em sua membrana plasmática.

A utilização da sonda (JC-1) que permite a distinção entre espermatozoides com baixa e alta atividade mitocondrial (GADELA E HARRISON, 2002) é uma sonda fluorescente carboxcianina lipofílica catiônica que é internalizada pelo funcionamento das mitocôndrias. Quando em baixa função mitocondrial (baixo potencial de membrana mitocondrial) fluoresce em verde. Quando em alta função mitocondrial a concentração de JC-1 dentro das mitocôndrias aumenta e a coloração forma agregados que fluorescem em laranja (GILLIAN et al., 2005).

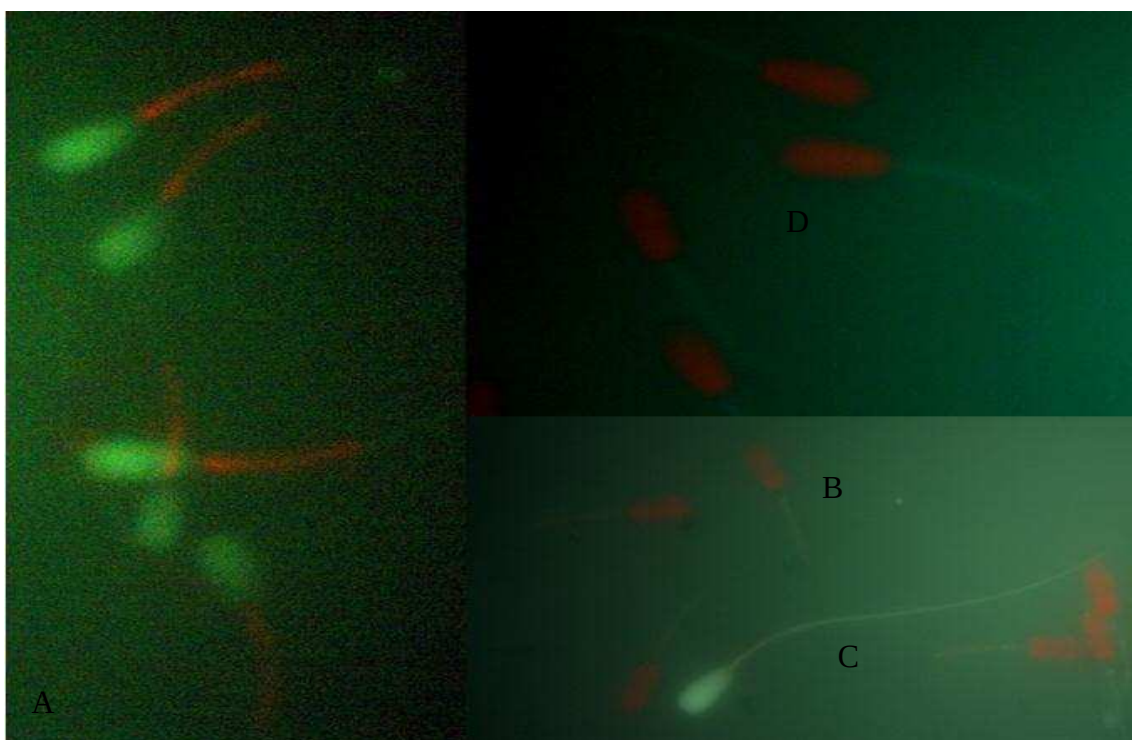


Figura 7- Classificação de células espermáticas após o teste de fluorescência com utilização de sondas DIC + IP + JC- 1: A - espermatozóide integro, B- espermatozoide semi – integro, C - espermatozoide semi – integro, D - espermatozoide lesado.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa SAS 9.1. Os dados de motilidade e vigor espermático, testes Hiposmótico, Supra – vital e Fluorescência foram gerados pela Análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores obtidos foram previamente submetidos aos testes de normalidade dos dados e homocidacidade das variâncias dos tratamentos pelos testes de Lillierfors e Bartlett, respectivamente, como premissa da ANOVA.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação de Motilidade e Vigor nos Tratamentos pós descongelamento

Os resultados de motilidade (MOT) e vigor espermático (VIG), respectivamente, estão representados na tabela 03 e tabela 04, onde houve uma diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos 1 ( $49,8 \pm 10,6\%$ ), 2 ( $50,2 \pm 12,1\%$ ) e o controle ( $40,7 \pm 12,4\%$ ), enquanto que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre o vigor, dos tratamentos 1 ( $3,5 \pm 0,4$ ), 2 ( $3,5 \pm 0,4$ ), e o controle ( $3,4 \pm 0,5$ ); houve diferença entre os tratamentos 1 ( $3,5 \pm 0,4$ ) e 2 ( $3,5 \pm 0,4$ ), onde o tratamento 2 apresentou vigor espermático melhor; essa melhora ocorreu pelo fato do tratamento 2 ser adicionado de ciclodextrina, um açúcar circular, capaz de incorporar lipídeo (colesterol) no centro de sua estrutura. O colesterol é carregado em um formato que permite prontamente a sua incorporação a membrana plasmática do espermatozoide; é um preciso e conveniente método para alterar o seu conteúdo na célula (OHVO et al., 1997; ATGER et al., 1997), e assim, com o antioxidante agindo paralelamente à ação da ciclodextrina, é possível inferir que enquanto a ciclodextrina carregava colesterol para a célula a antocianina agia contra a peroxidação lipídica.

Os valores de vigor espermático variaram de 3,2 a 3,5 bem superiores com a adição da antocianina aos resultados dos trabalhos relatados com adição de antioxidante, onde Santos et al. (2006) observaram em caprinos da raça Saanen valores de vigor espermático, no momento do descongelamento e ao final do teste de termorresistência de duas horas (vigor 2,8 e 2,1, respectivamente).

A adição de antocianina, afetou positivamente a motilidade do sêmen pós descongelamento, porém não causou nenhuma alteração na qualidade dos movimentos dos espermatozoides. No tratamento 2, entretanto, a adição da ciclodextrina (2,5%) ao diluente suplementado com antocianina levou a uma melhora da movimentação dos espermatozoides submetidos ao teste de termo resistência (0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos) em relação aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ), mas sem diferença ( $p > 0,05$ ) em relação aos valores médios do controle. A avaliação do sêmen descongelado envolve a determinação da motilidade progressiva retilínea e do vigor espermático. Para que taxas de prenhes satisfatórias sejam obtidas, é recomendável que o sêmen apresente uma motilidade mínima de pós – descongelamento de 30% (HENRY E NEVER, 1998). A motilidade é a mais importante característica de viabilidade espermática e capacidade fecundante do ejaculado

(JANUSKAUSKAS et al., 1999); o vigor espermático é um parâmetro, normalmente, avaliado em conjunto com a motilidade e é definido como a intensidade ou velocidade do movimento exibido pelos espermatozóides móveis (JOHNSTON et al., 2001).

O movimento espermático pode ser influenciado por fatores como: temperatura de análise, processamento do sêmen, concentração espermática e defeitos quanto a sua morfologia (GRAVANCE et al., 1998). A motilidade progressiva é importante, pois fornece uma avaliação aproximada da vitalidade do sêmen (BALL E PETERS, 2006), podendo ser correlacionada positivamente com a fertilidade (CORTELL, 1981).

Tabela 3– Motilidade espermática progressiva retilínea de sêmen caprino diluído e congelado/descongelado em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão):

| TRATAMENTO                                  | Tempo em segundo       |                         |                        |                        |                        |                        |                        |
|---------------------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                                             | TTR 0                  | TTR 30                  | TTR 60                 | TTR 90                 | TTR 120                | TTR 180                | TOTAL                  |
| 1 - BOVIMIX + ACYS                          | 57,1±8,0 <sup>a</sup>  | 53,5±9,1 <sup>ab</sup>  | 52,3±9,9 <sup>a</sup>  | 48,3±10,5 <sup>a</sup> | 45,0±9,3 <sup>a</sup>  | 42,5±9,4 <sup>a</sup>  | 49,8±10,6 <sup>a</sup> |
| 2 - BOVIMIX + ACYS 2,5% + CCC 2,5%          | 56,1±12,2 <sup>a</sup> | 55,0±12,4 <sup>a</sup>  | 51,1±11,0 <sup>a</sup> | 49,9±11,5 <sup>a</sup> | 45,9±10,4 <sup>a</sup> | 43,0±9,7 <sup>a</sup>  | 50,2±12,1 <sup>a</sup> |
| 3 - BOVIMIX + ACYS 2,5%+ CCC 2,5% atomizado | 49,6±10,8 <sup>b</sup> | 47,5±11,2 <sup>bc</sup> | 42,4±10,5 <sup>b</sup> | 40,6±11,8 <sup>b</sup> | 36,6±11,3 <sup>b</sup> | 33,8±11,0 <sup>b</sup> | 41,8±12,3 <sup>b</sup> |
| Controle - BOVIMIX                          | 47,8±12,6 <sup>b</sup> | 45,6±11,8 <sup>c</sup>  | 41,8±10,3 <sup>b</sup> | 40,1±11,2 <sup>b</sup> | 36,4±11,8 <sup>b</sup> | 32,6±10,6 <sup>b</sup> | 40,7±12,4 <sup>b</sup> |

Médias seguidas pela mesma letra subscritas, na mesma coluna não diferem pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4: Vigor espermático de sêmen caprino diluído e congelado/descongelado em diferentes meios de criopreservação (Média  $\pm$  erro-padrão):

| TRATAMENTO                                        | Tempo em segundo             |                              |                             |                              |                              |                              | TOTAL                        |
|---------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                                   | TTR 0                        | TTR 30                       | TTR 60                      | TTR 90                       | TTR 120                      | TTR 180                      |                              |
| 1 - BOVIMIX + ACYS                                | 3,5 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup> | 3,3 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup> | 3,3 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup> | 3,2 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup> | 3,1 $\pm$ 0,47 <sup>ab</sup> | 3,0 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup> | 3,5 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>  |
| 2 - BOVIMIX + ACYS<br>2,5% + CCC 2,5%             | 3,5 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>  | 3,5 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>  | 3,4 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup> | 3,4 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>  | 3,3 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>  | 3,2 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>  | 3,5 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>  |
| 3 - BOVIMIX + ACYS<br>2,5%+ CCC 2,5%<br>atomizado | 3,2 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>  | 3,2 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>  | 3,2 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup> | 3,1 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>  | 2,9 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>  | 2,9 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>  | 3,2 $\pm$ 0,59 <sup>c</sup>  |
| Controle - BOVIMIX                                | 3,4 $\pm$ 0,47 <sup>ab</sup> | 3,4 $\pm$ 0,47 <sup>ab</sup> | 3,3 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup> | 3,3 $\pm$ 0,53 <sup>ab</sup> | 3,2 $\pm$ 0,56 <sup>ab</sup> | 3,1 $\pm$ 0,60 <sup>ab</sup> | 3,4 $\pm$ 0,53 <sup>ab</sup> |

Médias seguidas pela mesma letra subscritas, na mesma coluna não diferem pelo teste de tukey a 5% de probabilidade .

## 5.2. Porcentagens de Espermatozóides Viáveis (teste supra vital)

Os valores do teste supra vital estão apresentados na tabela 05. Os valores obtidos no teste supravital pós-descongelamento foram semelhantes aos observados por BISPO (2009) e muito próximos aos valores de motilidade espermática no sêmen descongelado, o que reflete acurácia do teste da avaliação espermática (que é um teste subjetivo), confirmando os estudos de Mayer et al. (1951) e Swanson e Bearden (1951), assim como na motilidade espermática, observou-se maior porcentagem de espermatozóides vivos entre os tratamentos 1 (44,8 $\pm$ 10,7%), 2 (45,8 $\pm$ 13,1%) e o controle (36,9 $\pm$ 13,3%), porém observa-se na tabela 5 que os valores médios do grupo controle (36,9 $\pm$ 13,3%) e o tratamento 3 (39,2 $\pm$ 12,8% ) não diferem entre si, sendo que o tratamento 3 ainda apresenta valores superiores em número absoluto em relação ao controle. Ressalta-se ainda que tal melhoria não foi observada no tratamento 3 (39,2 $\pm$ 12,8%), pois se utilizou antocianina atomizada, fato esse que se explica pela atividade antioxidante da antocianina atomizada de reduzir mais rápido (69,2 Mol 100g<sup>-1</sup>) do que a atividade antioxidante da antocianina em pasta (89,1 Mol 100g<sup>-1</sup>), reduzindo assim a ação antimutagênica da antocianina contra o peróxido de hidrogênio.

**Tabela 5**– Percentagem de células espermáticas de caprinos reativas ao Teste supra vital (SV) após diluídas e congeladas/descongeladas em diferentes meios de criopreservação (Média±erro-padrão):

| TRATAMENTO                                  | SV                       |
|---------------------------------------------|--------------------------|
| 1 - BOVIMIX + ACYS                          | 44,8 ± 10,7 <sup>a</sup> |
| 2 - BOVIMIX + ACYS 2,5% + CCC 2,5%          | 45,8 ± 13,1 <sup>a</sup> |
| 3 - BOVIMIX + ACYS 2,5%+ CCC 2,5% atomizado | 39,2 ± 12,8 <sup>b</sup> |
| Controle - BOVIMIX                          | 36,9 ± 13,3 <sup>b</sup> |

Médias seguidas pela mesma letra subscritas, na mesma coluna não diferem pelo teste de tukey a 5% de probabilidade .

### 5.3. Integridade Funcional da Membrana Plasmática de Espermatozóides (teste hiposmótico)

Na tabela 06, estão apresentadas os valores médios de células espermáticas pós descongelamento reativas ao teste hiposmótico (HOST) obtidas no presente estudo. O HOST tem por principio avaliar a integridade funcional da membrana biológica (transporte seletivo de moléculas), que apenas ocorre de maneira eficiente em células com membrana plasmática integra (JEYENDRAN et al., 1984). A membrana celular intacta deve ser vista como requisito essencial mínimo para os espermatozóides, quando se considera que, em contraste com outras células os mesmos não são capazes de restaurar a membrana plasmática lesionada, visto que, a fluidez da membrana é baixa e os espermatozóides possuem quantidade mínima de citoplasma com organelas ausentes, tornando falha essa capacidade de síntese. Jeyendran et al. (1984) descrevem que o influxo de água ocorre quando os espermatozóides são submetidos ao estresse osmótico, é mais facilmente observado na região da cauda que na cabeça, isso porque a membrana plasmática que envolve a cauda é mais maleável que ao redor da cabeça.

Segundo Watson (2000), a permeabilidade da membrana plasmática varia de acordo com a região dos espermatozóides e o maior transporte de água é feito por meio da membrana da cauda dos espermatozóides, sendo essa membrana mais susceptível as alterações. Observa-se pelos valores médios obtidos nos tratamentos 1 (51,3±10,3%) e tratamento 2 (49,2±12,1%), que não há diferença entre si ( $p>0,05$ ), porém diferem ( $p<0,05$ ) do controle (42,4±12,1%).



Então é possível inferir pelo teste hiposmótico que a suplementação do diluente com antocianina melhora a integridade estrutural da membrana espermática e que a baixa resposta ao HOST após a criopreservação, provavelmente foi em decorrência dos danos sofridos pela cauda dos espermatozóides durante o processo de congelamento/descongelamento, o que diminui a capacidade dos espermatozóides reagirem com o aumento do volume celular, em resposta à baixa osmolaridade (HOSSAIN et al., 1998). Além disso, o próprio meio de congelamento pode acarretar ruptura da membrana, pois o estresse osmótico pode induzir, além de alterações nas estruturas das membranas, mudanças na microestruturas tubulares da cauda (CORREA E ZAVOS, 1994). No entanto, os valores médios obtidos no teste hiposmótico são bem próximos aos valores da motilidade e do teste supra vital, confirmando a acurácia das análises complementares quanto a viabilidade espermática.

Tabela 6– Percentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HOST) do sêmen caprino diluído e congelado/descongelado em diferentes meios de criopreservação (Média ± erro-padrão):

| TRATAMENTO                                  | HOST                      |
|---------------------------------------------|---------------------------|
| 1 - BOVIMIX + ACYS                          | 51,3 ± 10,3 <sup>a</sup>  |
| 2 - BOVIMIX + ACYS 2,5% + CCC 2,5%          | 49,2 ± 12,1 <sup>ab</sup> |
| 3 - BOVIMIX + ACYS 2,5%+ CCC 2,5% atomizado | 44,4 ± 11,8 <sup>bc</sup> |
| Controle - BOVIMIX                          | 42,4 ± 12,1 <sup>c</sup>  |

Médias seguidas pela mesma letra subscritas, na mesma coluna não diferem pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.4 Defeitos espermáticos

As características morfológicas do sêmen pós descongelamento (defeitos maiores, menores e totais) são apresentadas na tabela 07. Segundo o CBRA (1998) o sêmen caprino descongelado não deve ultrapassar 10 % dos defeitos maiores e 20 % dos defeitos totais. Todos os tratamentos se mantiveram dentro dos parâmetros aceitáveis para defeitos maiores e defeitos totais sendo, respectivamente: tratamento 1 (4,2±4,7; 15,3±13,0%); tratamento 2 (4,2±4,9; 17,6±15,2%); tratamento 3 (3,5±2,8; 19,4±13,1%) e controle (3,4±2,5; 19,0±18,2%), apresentando médias dentro dos valores preconizados. Segundo BORGES

(2003) muitos trabalhos não relataram diferenças na morfologia espermática entre os tratamentos no sêmen criopreservado. Sendo somente uma confirmação da aptidão dos animais à reprodução no início do ensaio.

Tabela 7– Características morfológicas (defeitos menores, maiores e totais) do sêmen congelado/descongelado de caprino da raça Alpina (Média ± Erro-padrão):

| TRATAMENTO                                  | DMA                    | DMEN                     | DEFT                     |
|---------------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 - BOVIMIX + ACYS                          | 4,2 ± 4,7 <sup>a</sup> | 11,1 ± 11,9 <sup>a</sup> | 15,3 ± 13,0 <sup>a</sup> |
| 2 - BOVIMIX + ACYS 2,5% + CCC 2,5%          | 4,2 ± 4,9 <sup>a</sup> | 13,4 ± 15,1 <sup>a</sup> | 17,6 ± 15,2 <sup>a</sup> |
| 3 - BOVIMIX + ACYS 2,5%+ CCC 2,5% atomizado | 3,5 ± 2,8 <sup>a</sup> | 16,0 ± 13,2 <sup>a</sup> | 19,4 ± 13,1 <sup>a</sup> |
| Controle - BOVIMIX                          | 3,4 ± 2,5 <sup>a</sup> | 15,7 ± 17,2 <sup>a</sup> | 19,0 ± 18,2 <sup>a</sup> |

DMA: defeito maior; DMEN: defeito menor; DEFT: defeitos totais; p>0,05 pelo teste de Tukey.

## 5.5 Integridades funcionais da membrana plasmática de espermatozóides (teste de fluorescência).

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 08. Dos quatro padrões gerados a partir da coloração simultânea das membranas, houve diferença para três padrões, entre os tratamentos e o grupo controle (p<0,05). No controle se observa a maior porcentagem de espermatozóides com baixa atividade mitocondrial e membrana íntegra (BAMI) ou membrana lesada (BAML), respectivamente (25,2±14,9%) e (50,2±16,1%) do que os tratamentos; 1 (11,3±11,2; 33,8±13,9%), 2 (15,3±11,5; 35,1±12,9%), 3 (17,6±11,7; 50,1±18,8%). Quanto aos padrões de alta atividade mitocondrial membrana íntegra (AAMI), o grupo controle (23,2±13,6%) obteve médias inferiores aos tratamentos 1 (51,3±18,6; 3,2±4,5%) e 2 (47,3±16,3; 2,3±4,3%). Porém nos padrões de alta atividade mitocôndrial e membrana lesada (AAML) não houve diferença (p>0,05) entre o controle (1,5±2,0) e os tratamentos; 1 (3,2±4,5), 2 (2,3±4,3) e 3 (1,8±3,9).

A categoria que apresenta fluorescência verde ao longo de toda célula e que indica integridade das membranas está fundamentada nos achados de GARNER et al. (1986), quando propuseram o mecanismo de ação dos corantes fluorescentes, DIC e IP. Esses autores salientaram que o DIC, por ser um éster polar, não fluorescente, atravessa a membrana

plasmática e, dentro da célula, é hidrolisado por esterases inespecíficas, resultando na formação de um composto impermeável à membrana plasmática que fluoresce em verde, denominado de 6-carboxifluoresceína. Ao contrário, o IP possui forte afinidade pelos ácidos nucleicos, mostrando-se impermeável à membrana plasmática, fluorescendo em vermelho somente em células com membranas danificadas. A iluminação, com luz ultravioleta e utilização do filtro para fluoresceína, revelou espermatozóides fluorescentes de cor verde, indicando que o IP não atravessa a membrana íntegra.

Na segunda categoria, que apresentou fluorescência vermelha na cabeça e peça intermediária, segundo as observações do mecanismo de ação dos corantes semelhantes aos citados anteriormente, e considerando que a cabeça e a peça intermediária do gameta masculino contém DNA, espera-se a coloração vermelha. Lesões na membrana mitocondrial também são referidas como as principais injúrias induzidas pelo processamento de congelamento e pelo choque térmico causados às células durante a preparação para a inseminação. Se a célula espermática caprina for dependente do metabolismo respiratório durante a passagem cervical, esta injúria à membrana mitocondrial pode representar um fator de limitação da fertilidade em sêmen descongelado, como afirmam Windsor e White (1995) e Maxwell & Watson (1996).

A interpretação da terceira categoria, indicando espermatozóides que apresentavam fluorescência verde na peça intermediária, acúmulo de DIC, foi que as membranas das mitocôndrias estavam íntegras, resultado da atividade das esterases dentro das organelas. O acúmulo de IP na cabeça dos espermatozóides é indicativo da penetração do corante nas membranas plasmática e nuclear danificadas, o qual, unindo-se ao DNA do núcleo, produz uma fluorescência de coloração vermelha, revelada pela incidência da luz ultravioleta. Holt e North (1984 e 1986) relataram a ocorrência de alterações na organização lipídica das membranas no decorrer de diferentes fases térmicas, com modificação de sua permeabilidade. Fato semelhante foi constatado no presente experimento, utilizando sondas fluorescentes. Após a diluição do sêmen em cada tratamento (1, 2, 3) e no grupo controle e os procedimentos de criopreservação, aos quais as células espermáticas foram expostas, foi observado um incremento de células com lesões nas membranas plasmáticas principalmente no grupo controle ( $50,2 \pm 16,1\%$ ), além do efeito que o processo de congelamento exerce sobre as células espermáticas, aumentando a incidência de acrossomos danificados (KOVÁCS E

FOOTE, 1992), e mesmo aqueles espermatozóides morfologicamente considerados normais podem apresentar-se com a membrana plasmática lesada (HARRISON E VICKERS, 1990).

A melhor preservação das membranas espermáticas, verificada nas células criopreservadas com antocianina, pode ser explicada pela sua maior velocidade de penetração celular, diminuindo a concentração de sais no interior dos espermatozóides, atenuando os efeitos deletérios das estruturas espermáticas (MORAES, 1996). Meryman et al. (1977) destacam que a antocianina possui a propriedade de conferir maior estabilidade às estruturas lipídicas das membranas espermáticas, protegendo as células das alterações provocadas pelo estresse oxidativo.

Os baixos índices de fertilização via transcervical com sêmen congelado/descongelado, obtidos em caprinos, podem ser em consequência de alterações provocadas nas células espermáticas durante o congelamento do sêmen. Nesse experimento, foi constatado que o sêmen congelado com antocianina apresentou aumento na motilidade progressiva nos testes de termorresistência, considerado por Molinia et al. (1994) como sendo consequência de um aumento no metabolismo celular de espermatozóides submetidos ao congelamento e em decorrência da hiperatividade espermática. Houve também incremento no percentual de membranas espermáticas íntegras quando o sêmen foi congelado na presença de antocianina em relação ao BOVIMIX (controle), possivelmente ocorrido devido ao grande potencial antioxidante que essa molécula possui, e por sua ação antimutagênica contra o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), diminuindo o processo de peroxidação lipídica nas células espermáticas.

Não há estudos relatados, utilizando a antocianina como componente e aditivo do diluidor seminal dificultando a comparação destes resultados com outros estudos em criopreservação de sêmen caprino, porém, com os resultados satisfatórios da antocinina no sêmen verificados no presente estudo e por ser uma dissertação com seguimentos, na mesma linha, porém com novos delineamentos, novas pesquisas serão realizadas para avaliar o potencial oxidativo da antocianina no espermatozoide.

Tabela 8— Integridade da membrana plasmática (%) de espermatozoide caprino após congelamento/descongelamento por meio do teste de fluorescência com a utilização das sondas DIC+IP+JC-1 (Média ± Erro-padrão):

| TRATAMENTO                                        | AAMI                     | AAML                   | BAMI                     | BAML                     |
|---------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 - BOVIMIX + ACYS                                | 51,3 ± 18,6 <sup>a</sup> | 3,2 ± 4,5 <sup>a</sup> | 11,3 ± 11,2 <sup>b</sup> | 33,8 ± 13,9 <sup>b</sup> |
| 2 - BOVIMIX + ACYS<br>2,5% + CCC 2,5%             | 47,3 ± 16,3 <sup>a</sup> | 2,3 ± 4,3 <sup>a</sup> | 15,3 ± 11,5 <sup>b</sup> | 35,1 ± 12,9 <sup>b</sup> |
| 3 - BOVIMIX + ACYS<br>2,5%+ CCC 2,5%<br>atomizado | 29,3 ± 17,0 <sup>b</sup> | 1,8 ± 3,9 <sup>a</sup> | 17,6 ± 11,7 <sup>b</sup> | 50,1 ± 18,8 <sup>a</sup> |
| Controle - BOVIMIX                                | 23,2 ± 13,6 <sup>b</sup> | 1,5 ± 2,0 <sup>a</sup> | 25,2 ± 14,9 <sup>a</sup> | 50,2 ± 16,1 <sup>a</sup> |

AAMI: alta atividade mitocondrial, membrana integra; AAML: alta atividade mitocondrial, membrana lesada; BAMI: baixa atividade mitocondrial, membrana integra; BAML: baixa atividade mitocondrial, membrana lesada; Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

## **6. CONCLUSÃO**

Considerando os resultados obtidos, a adição de antocianina proveniente do açaí ao diluente contribuiu para melhorar a preservação da integridade das membranas na congelação do sêmen Caprino. Sua associação com a ciclodextrina em pasta foi bastante benéfica, pois ajudou a manter a integridade da membrana, porém sua associação com ciclodextrina atomizada não alcançou o efeito esperado, pois o processo de atomização reduziu a atividade antioxidante da antocianina. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a antocianina pode ser adicionada ao diluente de criopreservação.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; NALLELA, K.P.; ALLAMANENI, S.S.R. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive BioMedicine Online**, Cleveland, v. 8, p. 616-627, 2004.
- AGARWAL A, SALEH R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urology Clinical North America** 2002;29(4):817-27.
- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, 3(3): 169-73, 1997.
- AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L(Eds.), **Equine Reproduction**, Malvern: Lea e Febiger, p. 715-745, 1993.
- ANUALPEC 2011 – FNP. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e comércio,V.11; P.5-360, 2011.
- ASBIA, **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Resultado da comercialização em doses em 2006, acesso em : <<http://www.asbia.org.br>>. Acesso em 20/12/2009.
- ATGER, V.M; DELA LLERA MOYA M.; STOUDE, G.W.; RODRIGUES, W.V.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Cyclodextrins as catalysts for the remove of cholesterol from macrophage foam cells. **Journal Clinical Investigation**. 99:773-780, 1997.
- AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H. Seminal plasma effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 46, p. 791- 797, 1996.
- BAKER, H.W., BRINDLE, J., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. **Fertility and Sterility**. v.65, p.411–419, 1996.
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em bovinos**. 3ªed. São Paulo: Roca,p.27-37, 2006.
- BEDFORD, S. J.; MIRANDA, P. V.; VISCONTI, P. E. Media requirements for stallion sperm capacitation. In: **Proceedings of a Work Shop on Transporting Gametes and embryos**, v.12, p.50-52 , Brewster – Massachusetts, 2003.
- BENDER, D. A. **Nutritional Biochemistry of the Vitamins**. 2ª ed. University of Cambridge Press. Cambridge UK., 541p. BILODEAU, 2003.
- BISPO, C. A. S. Fertilidade Do Sêmen Caprino Resfriado Ou Congelado Em Diferentes Concentrações De Gema-De-Ovo No Diluente. 2009. 109 f. **Tese (Doutorado em Zootecnia)**, UFV. Viçosa, 2009.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nor. Veterinary e Medicine.**, 25 (77/8):383-91, 1973.

BORGES, J.C. **Utilização de Antioxidantes Associados ou não a Emulsificante na Criopreservação do Sêmen Bovino.** 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), UFV, Viçosa, 2003.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. Ed. Belo Horizonte- MG, p. 49, 1998.

CARVALHO, O.F., FERREIRA, J.D.J., SILVEIRA, N.A., FRENEAU, G.E. Efeito Oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Journal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial** vol.38 no.1 Rio de Janeiro Jan,2002.

COLENBRANDER, B.; BROWERS, J. F. H. M.; NEILD, D. M. Capacitation dependent lipid rearrangements in the plasma membrane of equine sperm. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p.341-345, 2002.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The Hyposmotic swelling test: its employment as assay to frozen – thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994.

CORTELL, J. M. **Colletion, processing and artificial insemination of goat semen.** Nouzilly – Fance: INRA, 28p. 1981.

DIEBER-ROTHENEDER, M.; PUHL, H.; WAEG, G. Effect of oral supplementation with d- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. **Journal Lipid Reviews.**, v.32, p.1325-1332, 1991.

DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Enviromental Mutagenesis Society**, New York, v. 14, n. 5, p. 505-511, 1999.

DUTHIE, Garry G.; DUTHIE, Susan J.; KYLE, Janet A.M. Plant polyphenol in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, vol. 13, 79-106, 2000

Embrapa Amazônia Oriental. Sistema de Produção. Versão Eletrônica: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai/index.htm>, acesso em 28/11/2009.

FASTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**,v. 42, p. 251-260, 1996.

FLESCHE, F.M. e GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysic**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FLESCHE, F. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; NIEVELSTEIN, P. F. E. M. et al. Bicarbonate stimulated phospholipids scrambling induces cholesterol redistribution and enables



cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. **Journal Cell Science**, v.114, n.19, p. 3543-3555, 2001.

FOURNIER-DELPECH, S., THIBAUT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability: epididymal maturation, accessory glands and capacitation. In: **Reproduction in Mammals and Man**. Eds: Thibault C., Levasseur M.-C., Hunter R.H.F., Elipses, Paris, pp 257-280, 1993.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M. et al. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n.3-4, p. 249-265, 2001.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 340-350, 2002.

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: **Proceedings of a Work shop on Transporting Gametes and Embryos**, 12, Brewster – Massachusetts, p. 43-48, 2003.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

GILLAN L, EVANS G, MAXWELL WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnica aplicada à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 15-23; 57-65; 111-23, cap. 2, 4 e 7, 2001.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GRAVANCE, C. G.; CHAMPION, Z. J.; CASEY, P. J. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.49, p.1219-1230, 1998.

GUNZEL, A.R. Tiefgefrierkonservierung von wasserbuffelsperma. **Zuchthygiene**, v.14, p.181-184, 1979.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1806-1811, 2002.

HANCOCK, G.L. **The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility**. Int. J. Fert., 4:347-59, 1959.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HATANI, T.; ISHIGURO, N.; CHIHARA, K.; OGI, K.; NAKASHIMA, K.; SADA, K.; HORI-TAMURA, N. Inhibitory Effect of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp on IgE-mediated Mast Cell Activation. **Journal of Agricultural and food chemistry**. P. 3 – 30. April, 2011.

HEINONEN, M.; MEYER, A.S.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol. 46, 4107-4112, 1998.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. CBRA, 2ª ed. Belo Horizonte, 1998.

HOLT, W.V., NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal of Experimental Zoology**, v. 230, p. 473-483, 1984.

HOLT, W.V., NORTH, R.D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 78, p. 447-457, 1986.

HOSSAIN, A.M; RIZK, B.; BARIK, S. Time course of hypo – osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Human Reproduction*, V.13, p.1578 – 1583, 1998.

IRITANI, A., NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, V. 50, p. 119-121, 1977.

JANUSKAUSKAKAS, A.; RODRIGUES – MARTINRZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen thawed bull semen. **Acta Veterinária Scandinavica**, v.36, p.571 – 574, 1999.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JOHNSTON SD, KUSTRITZ MVR, OLSON PNS. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.

JONES, R., MANN , T., Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, V.50. p. 255-260, 1977.

KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T.; SCITA, G. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 385-397, 1992.

KOVÁCS, A., FOOTE, R.H. Viability and acrossome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic Histochemistry**, v. 67, n. 3, p. 119-124, 1992.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier. 4ed. São Paulo, 2005.

LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: **Anais: Annual Convention of American Association of Equine Practitioners**, 38., 1992, Orlando: AAEP, p. 629-647, 1992.

LUCHESE, C., PINTON, P., NOGUEIRA, C.W. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of an organoselenium compound. **Pharmacology**, 59, 194 – 201, 2009.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, p. 55-65, 1996.

MAYER, D.T.; SQUIERS, C.D.; BOGART, R. et al. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. **Journal of Animal Science**, v.10, p.206-235, 1951.

MCDOWELL, L.R. **Vitamins in animal and human nutrition**. Iowa University Press, p.93, 2000.

McKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinary Journal**, v. 14, p. 156-175, 1996.

MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N.; GIRÃO, E. S.; PIMENTEL, J. C. M. **Caprinos: Princípios básicos para sua exploração**. Teresina: Embrapa-CPAMN/SPI, 1994, p. 63-78.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.

MERYMAN, H.T., WILLIAMS, R.J., DOUGLAS, M.St. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryopreservation. **Cryobiology**, v. 14, p. 287-302, 1977.

MOLINIA, F.C., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Effect of polyols on the post-thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, p. 15-23, 1994.

MONTAGNER, M.M. **Produção in vitro de embriões bovinos com meios congelados, HEPES e retinol**. Santa Maria. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), p.68, 1999.

MORAES, C.N. **Métodos alternativos para congelação, descongelação e avaliação do sêmen ovino em pellets**. Santa Maria- RS, 1996. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução).

NUNES, J.F.; FERNÁNDEZ, D.R.P. **Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina**. Fortaleza: 2M. 2001, 105p.

OHVO, H., OLSIO, C., SLOTTE, J.P. Effects of sphingomyelin e phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin – mediated cholesterol effect in cultured fibroblast. **Biochimica Acta**. 1349: 131 – 141, 1997.

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

POULOSE, S. M.; FISHER, D. R.; Larson, J.; BIELINSKI, D. F.; RIMANDO, A. M.; CAREY, A. N.; SCHAUSS, A. G.; SHUKITT-HALE, B. Anthocyanin-rich Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Pulp Fractions Attenuate Inflammatory Stress Signaling in Mouse Brain BV-2 Microglial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. P .1084 – 1093. January. 2012.

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. P .1539 – 1545. 52. 2004.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.77-86, 1994.

SCHAUSS, A.G., WU, X., PRIOR, R.L., OU, B., HUANG, D., OWENS, J., AGARWAL, A., JENSEN, G.S., HART, A.N. SHANBROM, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (açaí). **Journal of Agriculture and Food Chemical**, 54:8604-10, 2006.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.1934-1942, 2006.

SATUE-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N; Anthocyanins as antioxidant on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**; IN PRESS, 1997.

SENGER, P. L. Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation & fertilization. In: **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ª ed. Moscow: Current Conceptions, Inc., Cap. 12, p. 266-283. 2003.

SINCLAIR, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. **Alternative Medicine Review**. v.5, p.28–38, 2000.

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

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impaires the developmental competence of the embryo after first cleavage. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 609-619, 2007.

SILVA, S.R. **Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de Maria - Pretinha (*Solanum americanum*. Mili.)**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 76 p. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)

SMITH, J.F.; MURRY, G.R. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.57, p.246-250, 1997.

SPADA, P.D.S. Antioxidant, mutagenic and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, v.11, p.144-151, 2008. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/pdf/10.1089/jmf.2007.598>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

SWANSON, E.W.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.10, p.981-987, 1951.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n. 1, p. 47-53, 2007.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology Reproduction**, v. 59, n. 1, p. 1-6, 1998.

VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H. et al. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3827-3835, 1991.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, p. 189. 1981.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.481-92, 2000.

WINDSOR, D.P., WHITE, I.G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. **Animal Reproduction Science**, v. 40, n. 1-2, p. 43-58, 1995.

WU, T.W.; HASHIMOTO, N.; AU, J.X. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. **Hepatology**, v.13, p.575-580, 1991.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, 2(4): 371-2, 1994.

ZINI A, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation "in vitro". **Journal of Andrology** .16:424-31, 1995.

