

ERICK FONSECA DE CASTILHO

**USO DA PRÓPOLIS E DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DO 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
2008

ERICK FONSECA DE CASTILHO

**USO DA PRÓPOLIS E DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DO 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: 21 de fevereiro de 2008.

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Co-orientador)

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Profa. Simone Eliza F. Guimarães

Prof. Cláudio Borela Espescht

Prof. José Domingos Guimarães
(Orientador)

Na vida, o importante não é ser, ter ou parecer.

O importante é fazer, construir e desenvolver.”

(Autor desconhecido)

Dedico esta obra à Deus!

*Aos três amores da minha vida: minha Santa Mãe, **Ruth de Castilho**; minha vida, **Ariane Ribeiro de Lacerda**; e ao meu Grande Pai, **Roberto de Figueiredo Castilho**.*

Ao meu Avô, Osvaldo, e à minha Avó, Creuza (“in memoriam”), pois me incentivam espiritualmente e emocionalmente, para que seja um profissional correto e tenha amor pelos animais e pela ciência.

AMO TODOS VOCÊS!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Ser Supremo, pela vida e oportunidade de ser uma pessoa honesta em um mundo que pouco se conhece a dignidade, o amor, a paz e a justiça.

Aos meus pais, Ruth de Castilho e Roberto de Figueiredo Castilho, pessoas indispensáveis na minha vida, dando a mim amor, educação, dignidade e honestidade, troféus que levarei comigo até a morte. **AMO VOCÊS!**

À minha amiga, companheira e esposa, Ariane Ribeiro de Lacerda, por ter me dado um novo horizonte em minha vida quando tudo parecia fora de controle. Por me amar, fazer-me feliz e preenchido-me por completo. Por ser minha base nesses momentos decisivos desta jornada. Você realmente é MARAVILHOSA! **TE AMO MEU AMOR!!!**

Ao meu Avô, Osvaldo, e à minha Avó, Creuza (*in memoriam*), como exemplo de simplicidade, paz e vontade de viver.

Ao meu Padrinho, Lázaro Lima, e à minha Madrinha, Raimunda Lima, como lição de carinho, orientação moral e compreensão.

Ao meu GRANDE AMIGO, ÍDOLO n° 1 e orientador, Prof. Djacy Barbosa Ribeiro, que não mediu esforços em me acolher de braços abertos quando estive desorientado em busca de novos horizontes, de novos conhecimentos, dentro da Medicina Veterinária. Fazendo-me “crescer” de forma surpreendente em pouco espaço de tempo, adquirindo conhecimento aplicado dentro da realidade da medicina de grandes animais, em especial, da clínica e reprodução equina.

À Mãe Profa. Maria das Dores Correia Palha (Dora) que acreditou na minha potência como aluno dando início a minha transformação acadêmica e científica, com ética, respeito, seriedade, responsabilidade e profissionalismo, e acima de tudo, amor à ciência.

À “irmã” Profa. Ana Sílvia Sardinha Ribeiro que me deu a chance de evoluir dentro e fora do Projeto Bio-Fauna contribuindo para o meu aperfeiçoamento moral e profissional.

Ao meu AMIGO, ÍDOLO nº 2 e orientador, Prof. José Domingos Guimarães pelos conhecimentos, amizade, bondade e extrema humildade de viver. Por acreditar que minha jornada em Viçosa só está começando. OBRIGADO, JEI!!!

Ao amigo-irmão Rogério Oliveira Pinho, fiel companheiro de várias jornadas a campo, e que muitas vezes foi meu ombro nos momentos difíceis. Obrigado pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos na universidade, fora dela e aqui em Viçosa. Te amo, amigo!

Aos companheiros do Grupo Gera, Leonardo, Jeanne, Morgana, Carol, Homer, Boca e Maurício, Bruno, José Carlos, João, Grazi, Eliza, Hugo e Pedro. Obrigado pelos momentos de alegria e troca de conhecimentos. Vocês são 1.000!!!

Ao amigo e companheiro, Rogério Dias. Obrigado pela fidelidade e pelos momentos de muita felicidade e alegria.

Ao Departamento de Zootecnia, na pessoa do Prof. Marcelo e ao Charles, por terem me auxiliado na realização desta obra.

Aos meus doze irmãos que contribuíram de forma indireta para a minha formação profissional, estimulando-me a sempre querer e aprender mais, fazendo-me acreditar de que nada se pode derrubar, quando se quer ficar em pé.

Aos todos os meus sobrinhos e meus afilhados, Ana Luisa, Yuri e Richard, assim como meus compadres e comadres, Wagner, Gelly, Simonne e Robert. Amo vocês!

Muitíssimo obrigado!

BIOGRAFIA

ERICK FONSECA DE CASTILHO, filho de Roberto de Figueiredo Castilho e Ruth de Castilho, nasceu em Belém-Pará, em 25 de setembro de 1981.

Em 2000, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-Pará, graduando-se em maio de 2005.

Em março de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), na área de Reprodução Animal, tendo defendido a dissertação de Mestrado em fevereiro de 2008.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Inseminação artificial em caprinos	3
2.2. Composição da membrana plasmática dos espermatozoides	3
2.3. Fundamentos da criopreservação	5
2.4. Criopreservação do sêmen	7
2.5. Antioxidantes	8
2.5.1. Ácido ascórbico	10
2.5.2. Própolis	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Animais, alimentação e sanidade	15
3.2. Avaliação física e morfológica do sêmen	15
3.3. Centrifugação, resfriamento e congelamento do sêmen	16
3.4. Testes complementares	18
3.4.1. Teste de termo-resistência (TTR)	18
3.4.2. Coloração supravital	18
3.4.3. Teste Hiposmótico	19
3.5. Análises estatísticas	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Sêmen <i>in natura</i>	21
4.2. Sêmen pós-descongelamento	25
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
APÊNDICE	47
APÊNDICE A	48

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Composição química do diluidor base (BIOXCELL® - IMV)	17
2 Distribuição dos tratamentos de acordo com a composição do diluente	17
3 Médias e desvios-padrão do percentual de espermatozóides não corados no teste supravital e aspectos físicos do sêmen <i>in natura</i> em bodes adultos, criados em regime intensivo	21
4 Médias e desvios-padrão de percentual de espermatozóides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozóides de bodes adultos criados em regime intensivo	21
5 Médias e desvios-padrão da concentração espermática, teste supravital e aspectos físicos do sêmen <i>in natura</i> em bodes adultos das raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo	23
6 Médias e desvios-padrão de espermatozóides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozóides de bodes adultos das raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo	23
7 Correlações Simples de Pearson entre os aspectos físicos e morfológicos dos espermatozóides e testes supravital e hiposmótico em sêmen <i>in natura</i> de bodes adultos das raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo	24
8 Médias e desvios-padrão na motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e percentual de espermatozóides não-corados nos teste supravital e reativos no teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento durante o teste de termo-resistência de acordo com o tratamento, em bodes adultos raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo	26
9 Médias e desvios-padrão do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento de acordo com o tratamento, em bodes adultos raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo	27
10 Médias gerais e desvios-padrão da motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e teste supravital, teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo	28
11 Médias gerais e desvios-padrão do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento (TTR) de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo	30

12	Correlações Simples de Pearson entre as médias gerais nos testes supravital e hiposmótico, motilidade e vigor espermático do sêmen pós-descongelado às 0 hora do TTR, de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo	32
13	Correlações simples de Pearson entre a média geral no teste hiposmótico, teste supravital e motilidade espermática do sêmen <i>in natura</i> e as médias gerais da motilidade espermática do sêmen pós-descongelado às 0 hora e 3 horas do TTR, de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo	33

RESUMO

CASTILHO, Erick Fonseca de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino.** Orientador: José Domingos Guimarães. Co-orientadores: Tarcízio Antônio Rego de Paula e Ciro Alexandre Alves Torres.

Os objetivos deste estudo foram verificar se a própolis e o ácido ascórbico têm efeito sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides de caprinos, bem como, investigar o potencial destes antioxidantes no uso de meios diluidores de criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados cinco bodes adultos das raças Alpina (n = 2) e Saanen (n = 3). Para as coletas de sêmen, utilizou-se a vagina artificial, onde se obteve cinco ejaculados por animal. Após a coleta, fez-se o exame físico do sêmen e morfológico dos espermatozóides, teste supravital e teste hiposmótico. Em seguida, o sêmen *in natura* foi diluído, homogeneizado, dividido em cinco alíquotas iguais e centrifugados. O sobrenadante foi desprezado e cada *pellet* de espermatozóides foi ressuscitado com diluente, de acordo com os tratamentos: T1 (BIOXCELL® - CONTROLE); T2 (BIOXCELL® + 0,25% de extrato liofilizado de própolis); T3 (BIOXCELL® + 0,5% de extrato liofilizado de própolis); T4 (BIOXCELL® + 0,05% de ácido ascórbico; e T5 (BIOXCELL® + 0,25% de ácido ascórbico). Após as diluições finais, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático de cada tratamento, e posterior envase. As palhetas foram resfriadas a 4 - 5 °C, durante 35 minutos em refil de plástico contendo álcool metílico, e posteriormente, 25 minutos fora do mesmo. O pré-congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, durante 14 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento final do sêmen. As doses foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, e acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL e homogeneizados para análise imediata de motilidade e vigor espermático, teste supravital, teste hiposmótico e teste de termo-resistência. No sêmen *in natura*, os aspectos físicos e morfológicos, teste supravital e teste hiposmótico não diferiram (P>0,05) entre os animais e entre raças. Não houve correlação do aspecto e do turbilhonamento com as demais variáveis. Houve correlação média e negativa (r = -0,46) entre o volume e o teste hiposmótico. A motilidade espermática apresentou correlação média e positiva com vigor (r = 0,52) e o teste supravital (r = 0,55). Houve correlação alta e positiva (r = 0,73 e 0,69) entre defeitos espermáticos maiores e menores com os defeitos totais. Houve relação média e negativa (r = -0,40) entre os defeitos espermáticos maiores e o

teste hiposmótico, não sendo observado com os defeitos menores. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as médias da motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento), em todos os tratamentos, porém, as médias do vigor espermático do sêmen diluído apresentaram diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos, onde o T1 e T3 foram diferentes do T4 e iguais aos T2 e T5. As médias gerais da motilidade e do vigor espermático nos tratamentos logo após o descongelamento e após três horas de TTR diferiram entre si ($P < 0,05$), onde T4, T5 e T1 foram similares e superiores aos T2 e T3. Os valores médios gerais observados no teste supravital e no teste hiposmótico pós-descongelamento diferiram ($P < 0,05$) entre os tratamentos, em que T4, T5 e T1 foram similares e superiores ao T2 e ao T3. Os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação alta e positiva com a motilidade espermática, em todos os tratamentos. Nos T1, T4 e T5 houve correlação alta e positiva ($r = 0,63$; $r = 0,64$; $r = 0,71$; respectivamente) entre os valores registrados nos testes supravital e hiposmótico. Os valores observados no teste hiposmótico e a motilidade espermática apresentaram correlação alta e positiva nos T1 ($r = 0,78$) e T5 ($r = 0,65$) e correlação média e positiva no T4 ($r = 0,44$). Tanto no momento do descongelamento (0 hora) quanto ao final do TTR (3 horas), o teste supravital e a motilidade espermática do sêmen *in natura* não apresentaram correlação com as motilidades espermáticas dos tratamentos deste estudo. Porém, no momento do descongelamento, os valores médios observados no teste hiposmótico do sêmen *in natura* apresentaram correlação média e positiva com a motilidade espermática do T1 e T2, e correlação alta e positiva com a motilidade espermática do T5. Da mesma forma, às 3 horas de TTR, verificou-se correlação média e positiva com a motilidade espermática do T1, T4 e T5. Concluiu-se que: o ácido ascórbico manteve a integridade estrutural da membrana dos espermatozóides durante o processo de criopreservação, bem como sua viabilidade após o teste de termo-resistência, podendo ser uma alternativa na composição de diluentes para criopreservação de sêmen caprino; a própolis não se mostrou eficaz na manutenção da integridade e viabilidade espermática pós-descongelamento, mostrando ser tóxica aos espermatozóides nas concentrações de 0,25 e 0,5 %; o teste hiposmótico realizado no sêmen *in natura* se mostrou eficaz em prever a congelabilidade da amostra de sêmen, bem como, sua viabilidade ao final do teste de termo-resistência de três horas.

ABSTRACT

CASTILHO, Erick Fonseca de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2008. **Use of propolis and ascorbic acid on goat semen cryopreservation.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-Advisers: Tarcízio Antônio Rego de Paula and Ciro Alexandre Alves Torres.

The objectives of this study were to verify if the propolis and ascorbic acid contain effect on plasmatic membrane integrity of goats spermatozoa as well as investigate the potential of these antioxidants on the use of goats spermatozoa cryopreservation extenders. Semen from five adults goats were used, totalizing 5 semen samples for each one. After semen collection, the evaluation consisted of physical and morphological exam, live and dead cells (supravital test) and hyposmotic swelling test. Afterwards, the fresh semen was diluted, homogenized, divided on 5 equal parts and centrifuged. The spermatozoa pellet was raised with respective treatment: T1 (BIOXCELL® - CONTROL); T2 (BIOXCELL® + 0,25% of propolis extract); T3 (BIOXCELL® + 0,5% of propolis extract); T4 (BIOXCELL® + 0,05% of ascorbic acid); e T5 (BIOXCELL® + 0,25% of ascorbic acid). After final dilutions, it was evaluated the sperm motility and vigor on each treatment, and posterior seal. The straws were cooled at 4 - 5 °C during 35 minutes in a plastic container containing methyl alcohol and 25 minutes out of container. The pre-freezing was done in liquid nitrogen vapour, during 14 minutes. Then, the straws were immersed in nitrogen. The thawing of the samples was made by immersion of the straws in a 37 °C water-bath for 30 minutes to evaluate the sperm motility and vigor, supravital test, hyposmotic swelling test and thermoresistence test. In fresh semen, the physical and morphological aspects, supravital test and hyposmotic swelling test not differ ($P>0,05$) between animals and between races. There was no correlation of appearance and whirlpool with other variables. There was mean and negative correlation ($r = -0,46$) between the volume and hyposmotic swelling test. The sperm motility showed average and positive correlation with sperm vigor ($r = 0,52$) and supravital test ($r = 0,55$). There was high and positive correlation ($r = 0,73$ and $0,69$) between major and minor defects sperm with defects totals. There was mean and negative correlation ($r = -0,40$) between major defects sperm and hyposmotic swelling test, not being seen with the minor defects. The average sperm motility of the diluted semen (pre-cooling) of all treatments, showed no difference between them ($P>0,05$), however, the averages of sperm vigor of diluted semen showed difference ($P<0,05$) among treatments, where the T1 and T3 were

different from T4 and equals to T2 and T5. The general average of motility and vigor sperm on treatments immediately after thawing and after three hours of thermoresistance test differed among themselves ($P < 0,05$), where the T4, T5 and T1 were similar and higher than T2 and T3. The general average values observed in supravital test and hyposmotic swelling test post-thawing differed ($P < 0,05$) among treatments, in which the T4, T5 and T1 were similar and higher than T2 and T3. The values observed on supravital test showed high and positive correlation with sperm motility in all treatments. In T1, T4 and T5 had high and positive correlation ($r = 0,63$; $r = 0,64$; $r = 0,71$; respectively) between the values in supravital test and hyposmotic test. The values observed in the hyposmotic test and sperm motility showed high and positive correlation in T1 ($r = 0,78$) and T5 ($r = 0,65$) and correlation mean and positive in T4 ($r = 0,44$). Both at the time of thawing (0 hour) as the end of the thermoresistance test (3 hours), the supravital test and sperm motility showed no correlation with the motility sperm of treatments this study. But at the time of thawing, the average values observed in hyposmotic test of fresh semen showed average and positive correlation with sperm motility of T1 and T2, and high and positive correlation with the T5 motility sperm. Similarly, at 3 hours of thermoresistance test, there was average and positive correlation with sperm motility of T1, T4 and T5. It was concluded that: the ascorbic acid maintained structure integrity of the spermatozoa membrane during cryopreservation process as well as its viability after thermoresistance test, and may be an alternative in the composition of extenders for cryopreservation of semen goats; the propolis was not effective in maintaining the integrity and viability sperm after thawing, showing to be toxic to spermatozoa at concentrations of 0,25 and 0,5%; and the hyposmotic test in fresh semen was effective in predicting the semen freeze, as well as, its viability in the end of the thermoresistance test of three hours.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do baixo nível tecnológico ainda presente em todo processo produtivo, a caprinocultura de corte e leite no Brasil tem apresentado resultados produtivos positivos que a coloca numa posição privilegiada no cenário do agronegócio. Isto está respaldado no incremento do consumo interno, em demandas concretas de exportação de carne e pele para diversos países, bem como, na percepção de oportunidade de negócio que a atividade oferece (SOUSA, 2007). Na região Nordeste, onde se concentra cerca de 90 % do efetivo de caprinos do Brasil, a maioria das explorações praticam sistemas de produção pouco tecnificados. Porém, nos últimos anos a procura pela carne caprina tem aumentado, bem como, a exigência por um produto de melhor qualidade (SOUSA et al., 1997).

O desenvolvimento da caprinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial. Esse crescimento foi intensificado nos últimos anos, sobretudo nos países em desenvolvimento que são os detentores dos maiores rebanhos. Projeta-se um crescimento da ordem de 5 vezes o rebanho atual nos próximos 20 anos, multiplicando o rebanho atual em mais de 50 milhões de cabeças (FONSECA, 2005). Dentro dessa perspectiva, há necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho para que possa haver um aproveitamento mais eficiente dos genótipos utilizados.

As técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA) e transferência de embriões foram introduzidas na caprinocultura com os objetivos principais de acelerar o ganho genético de animais superiores e de superar alguns obstáculos de eficiência reprodutiva (SMITH, 1986).

A inseminação artificial possui como vantagens: o melhoramento do rebanho em menor tempo e um baixo custo por meio da utilização de sêmen de reprodutores comprovadamente provados para a produção de leite e carne; o controle de doenças que pela monta natural poderiam ser transmitidas às cabras; a utilização de bodes com problemas adquiridos e impossibilitados de efetuarem a monta; a obtenção de maior número de descendentes de um reprodutor; a padronização do rebanho; o nascimento de filhos após a morte do pai, face à possibilidade de congelamento e estocagem de sêmen, entre outras.

O sêmen de boa qualidade é um dos fatores de fundamental importância para o sucesso da técnica, por isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição dos espermatozoides

viáveis por dose, sendo assim, ao diminuir ou cessar qualquer tipo de injúria que os comprometam, haverá a possibilidade de diminuir a concentração espermática por dose de sêmen congelado e talvez a chance de flexibilizar o horário da inseminação, além do aumento do retorno econômico tanto para os produtores como para as Centrais de Inseminação Artificial.

Adicionalmente, o estresse oxidativo é um fator associado com a diminuição da fertilidade durante a estocagem do sêmen. A geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) é consequência normal do metabolismo oxidativo, e parece estar envolvida nos danos dos espermatozóides em condições hipotérmicas de estocagem (MAXWELL e WATSON, 1996). O excesso de reação oxidativa possui efeito destrutivo na membrana espermática e no DNA dos espermatozóides. A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados (ZALATA e DEPUYDT, 1998), os quais se tornam altamente sensíveis a espécies reativas de oxigênio (COMHAIRE et al., 1999).

Embora os espermatozóides dos caprinos sofram facilmente peroxidação, quando comparados com os espermatozóides dos bovinos, o sêmen congelado e descongelado é mais susceptível a peroxidação lipídica do que o sêmen fresco (BILODEAU et al., 2000). Nesse contexto, a utilização de antioxidantes, como a própolis e o ácido ascórbico, surgem como potenciais constituintes alternativos para crioprotetores no processo de congelamento de sêmen de caprinos.

Tendo em vista este cenário, os objetivos deste estudo foram verificar se a própolis e o ácido ascórbico contêm efeito sobre a integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozóides de caprinos, bem como, verificar o potencial destes antioxidantes no uso de meios diluidores de criopreservação de sêmen caprino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inseminação artificial em caprinos

A inseminação artificial (IA) tem um importante papel na criação de caprinos, especialmente em sistemas intensivos de produção, facilitando o controle reprodutivo e aumentando a acurácia e reduzindo o tempo dos testes de progênie (LEBOEUF et al., 2000).

A utilização da IA associada ao congelamento de sêmen tem como principal justificativa o melhoramento genético dos rebanhos, por possibilitar maior número de descendentes por macho, como também, utilizar o sêmen em diversos pontos geográficos ao mesmo tempo (LEBOEUF et al., 1998). Além disso, possibilita a manipulação e o armazenamento de material genético por longos períodos (LEBOEUF et al., 2000).

Apesar do seu potencial no incremento à produtividade, a inseminação artificial nesta espécie ainda é pouco aplicada no Brasil (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995) devido a exigüidade de difusão desta biotecnologia, falta de informação técnica e apoio aos criadores por parte da deficiência de ânimo associativista, custo inicial obrigatório para a implantação de programas de inseminação artificial, deficiência da escrituração zootécnica em muitas propriedades, relutância de muitos criadores em submeter o rebanho a um manejo correto e racional em todas as etapas do seu processo, resultados ainda não totalmente satisfatórios com relação ao uso de sêmen congelado/descongelado e depositado no sistema vaginal da fêmea via transcervical (GONZALES et al., 2002).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas, visando avaliar a viabilidade do sêmen caprino, diluído, criopreservado ou não, para determinação do melhor diluidor e conseqüentemente, melhores índices de fertilidade. Vale destacar que um dos pré-requisitos para o sucesso da IA é o uso de um diluente capaz de manter a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (MORENO et al., 2001).

2.2. Composição da membrana plasmática dos espermatozóides

O espermatozóide pode ser dividido em duas partes funcionais e morfológicamente distintas: a cabeça e a cauda. A membrana plasmática da cabeça é subdividida em três segmentos, os quais cobrem o acrossoma, a região intermediária ou equatorial e a região pós-acrossômica. Da mesma maneira, a membrana da cauda possui um segmento que cobre a peça intermediária e outro, a peça principal (HOLT, 1984;

KOEHLER, 1985). Toda a estrutura básica da membrana do espermatozóide se forma durante a espermatogênese, período em que essas células possuem no citoplasma organelas essenciais à síntese protéica, como retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Durante o desenvolvimento da fase inicial de espermátide, formam-se duas estruturas especializadas da membrana, que são o anel nuclear ou anel posterior, que se forma na região do pescoço da célula e será o limite entre a cabeça e a peça intermediária, e o “annulus” que será o limite entre a peça intermediária e a peça principal (HOLT, 1984).

A membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos sofre mudanças na morfologia e na composição química durante a passagem e a maturação espermática no epidídimo. Isto torna a membrana menos resistente ao estresse, uma vez que espermatozoides coletados nos epidídimos de bovinos, suínos e ovinos são mais resistentes ao choque térmico que espermatozoides ejaculados destas mesmas espécies. O espermatozóide adquire ácido siálico em sua superfície durante sua passagem pelo epidídimo, o que o torna carregado negativamente, atraindo e absorvendo proteínas em regiões bem definidas da membrana. Há evidências de que durante o trânsito epididimário e a maturação espermática, há aumento da fluidez da membrana em decorrência da elevação do teor de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados e diminuição da concentração de colesterol (HOLT, 1984; AMANN e PICKETT, 1987).

A composição bioquímica da membrana espermática varia muito entre as espécies. A relação entre colesterol e fosfolipídios na espécie ovina é de 0,85 (HOLT e NORTH, 1985); 0,83 na espécie humana (MACK et al., 1986); 0,36 na equina (AMANN e GRAHAM, 1993); 0,20 na suína (PARKS e GRAHAM, 1992) e oscila entre 0,51 e 0,53 na bovina (PARKS et al., 1981).

Massanyi e Janisch (1993) estudando a região pós-acrossômica, descreveram três regiões distintas na membrana plasmática de espermatozoides de bovinos, ovinos e suínos e duas na de eqüinos. Estas regiões estão relacionadas com zonas de diferentes atividades metabólicas, assim como a atividade mecânica de conexão da cabeça à cauda.

Os carboidratos da superfície celular espermática são carregados negativamente, exercendo atração sobre proteínas e glicoproteínas do meio externo. Estes carboidratos formam verdadeiro glicocálice na superfície espermática, exercendo função primordial na interação entre esta célula e o ovócito (AMANN e PICKETT, 1987), sendo constituídos basicamente por ácido siálico (HOLT, 1984). Ashizawa et al. (1987) observaram variações nos teores de sódio, potássio, cloro, cálcio, fósforo,

magnésio, cobre, zinco, ferro e manganês na superfície de espermatozóides de touro, cão, galo e rato, bem como em regiões distintas da célula (cabeça, peça intermediária e cauda), porém o padrão de distribuição espacial foi similar entre as espécies estudadas.

2.3. Fundamentos da criopreservação

O processo de criopreservação representa a interrupção artificial do progresso de maturação do espermatozóide pós-ejaculação e na fertilização. O maior problema com relação a criopreservação de sêmen é que mesmo utilizando as melhores técnicas, o padrão de sobrevivência pós-descongelamento é restrito em cerca de 50 % da população espermática (WATSON, 1996).

As mudanças celulares que ocorrem durante o congelamento não estão associadas à sua habilidade de se armazenarem em temperaturas muito baixas, mas sim à sua letalidade numa zona de temperatura intermediária (- 15 °C a - 60 °C), que a célula espermática passa em duas ocasiões, uma durante o congelamento e uma outra no descongelamento. Nenhuma reação térmica ocorre num sistema aquoso à temperatura de nitrogênio líquido (- 196 °C), sendo que a explicação para isso é que não há estado de água líquida em torno de - 130 °C. O único estado físico que existe são os cristais e nesse estado, a viscosidade é alta e a difusão insignificante, portanto à - 196 °C não há energia térmica para reação química (CHIRINÉA, 2004).

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37 °C a 20 °C) o que parece não ocasionar danos aos espermatozóides quando este se encontra diluído em meio adequado (WILHELM et al., 1996). O estresse inicial se dá quando o espermatozóide passa da temperatura corporal para 5 °C (SQUIRES et al., 1999). Isto é devido à fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino, para o estado de gel (MEDEIROS et al., 2002).

Para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 °C a 8° C e pela adição de lipídeos ou lipoproteínas ao diluente, além do uso de curvas de resfriamento lentas (- 0,05 °C/min) (CUNHA, 2002). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, os espermatozóides sofrem um fenômeno conhecido como choque térmico. O termo “Estresse Térmico” ou “Choque Térmico” define um conjunto de alterações ocorridas nos espermatozóides dos mamíferos quando resfriados rapidamente da temperatura corpórea até temperaturas próximas a 5 °C, o qual induz a danos irreversíveis aos espermatozóides que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade, perda rápida de motilidade, danos do metabolismo,

da membrana plasmática e do acrossoma (SQUIRES et al., 1999), ocasionando também, a diminuição da taxa da glicólise, da respiração celular e da frutólise, aumento na degeneração do ácido desoxirribonucléico e liberação de material intracelular (CUNHA, 2002).

Na ocasião do 1º estresse térmico (19 – 8 °C), a membrana plasmática passa por uma fase de transição, do estado líquido cristalino para o de gel, podendo ocorrer perda de movimentos progressivos, alterações nas membranas plasmática e acrossomal, sendo este o primeiro desafio para estas células (WATSON, 1996).

Quando a temperatura do meio atinge entre – 5 °C e -10 °C, cristais de gelo se formam a partir da água pura no meio extracelular. Porém, protegido pela membrana plasmática, o meio intracelular não se congela (estado de super refrigeração). O ponto de congelamento de uma solução é determinado pela concentração de solutos que ela participa. Em decorrência, a água do interior da célula flui por osmose para o meio externo e também se congela. Os outros elementos do meio extracelular (sais, proteínas, gorduras), permanecem na porção não congelada (HOLT, 2000a). Com a temperatura diminuindo, mais moléculas de água se cristalizam, resultando em uma concentração maior de solutos na fração não congelada, que formarão os “canais não congelados”. O volume destes canais é importante, pois somente as células que estiverem neles irão sobreviver à criopreservação. Neste ponto, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS et al, 2002).

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

A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de se formarem grandes cristais de gelo dentro da célula que causariam danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (SQUIRES et al, 1999).

Chirinéa (2004) comparou as taxas de 0,8 °C/min e 3 °C/min entre 5 °C e – 15 °C, ambos seguidos de 5 °C/min entre – 15 °C e – 40 °C, e depois 10 °C/min de – 40

°C a -79 °C, e demonstrou que as curvas de congelamento mais lentas apresentavam sobrevivência espermática pós-descongelamento superior às curvas rápidas.

Quando se congela uma célula lentamente, existe tempo hábil para que grande quantidade de água migre da célula espermática para o meio extracelular, na tentativa de reverter os danos do “efeito soluto”. Neste caso, é imprescindível que a descongelamento se faça também lentamente, para que os volumes de água sejam reequilibrados antes da total descongelamento, evitando que grandes alterações do volume intracelular provoquem lesão da membrana espermática. Por outro lado, se o congelamento ocorre rapidamente, não há grande alteração no volume de água no interior da célula e microcristais de gelo serão ali formados. O descongelamento neste caso deve ser realizada também de maneira rápida, pois, se realizada de maneira lenta a água intracelular se descongela em um momento em que existe ainda temperatura baixa o suficiente para haver uma recristalização da água recém-descongelada. Se isto acontecer, grandes cristais, advindos da recristalização se formarão, expondo a célula ao risco de sofrer perfurações por estes grandes cristais de gelo (WATSON, 1996; HOLT, 2000b).

O descongelamento vai depender de como o sêmen foi congelado. Espermatozóides congelados em curvas moderadas necessitam de curvas adequadas de descongelamento. Neste caso, como o gelo extracelular descongela lentamente, diluirá lentamente o soluto das frações de água não-congeladas, o que permite que a água se difunda lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial. Se os espermatozóides são descongelados rapidamente, o gelo derrete rapidamente também, diluindo o soluto do meio e a água entrará muito rapidamente nos espermatozóides, o qual se encontra altamente concentrado, danificando os espermatozóides (WATSON, 1996; SQUIRES et al., 1999; HOLT, 2000b; GONÇALVES et al., 2002).

2.4. Criopreservação do sêmen

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado foi revolucionada por Polge e colaboradores em 1949, com a descoberta do glicerol como crioprotetor, o que permitiu que os espermatozóides fossem congelados e armazenados por longos períodos (HOLT, 2000a). Esta biotecnologia tem sido de grande importância em programas de melhoramento animal por viabilizar a preservação de material genético de animais em extinção, além de auxiliar a transpor barreiras da infertilidade masculina. No entanto, com exceção da espécie bovina, têm-se obtido baixas taxas de fertilidade com o

emprego de sêmen congelado (WATSON, 2000), uma vez que a viabilidade e a fertilidade do espermatozóide após descongelamento encontram-se reduzidas como consequência das injúrias durante o processo de congelamento, como lesões nas organelas e membranas dos espermatozóides, induzindo também, mudanças na capacitação espermática e reação acrossomal (WATSON, 1995; GARNER et al., 2001). Conseqüentemente, o intuito dos protocolos de congelamento visam minimizar esses efeitos deletérios aos espermatozóides (MEDEIROS et al., 2002; KUMAR et al., 2003).

Os eventos ocorridos durante a criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudanças na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana dos espermatozóides, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 1996 e 2000).

O resfriamento, quando efetuado de modo inadequado, causa um choque térmico o qual induz a danos parcialmente irreversíveis ao espermatozóide que se caracteriza por padrão anormal de movimento do espermatozóide (movimento circular ou retrógrado), rápida perda da motilidade, lesões no acrossoma, dano à membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intacelulares (OHATA et al., 2005).

Com relação à formação de cristais de gelo, estes se formam no espaço extracelular, criando um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução congelada extracelular que se encontra concentrada. Dependendo da velocidade de resfriamento, a água vai se mover através da membrana e se unir à fase congelada do meio extracelular ou irá se congelar, formando gelo no interior da célula. Na maioria dos casos, células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido à perda da integridade da membrana (HAFEZ e HAFEZ, 2004; RATH et al., 2004). A célula espermática também é sensível aos efeitos tóxicos dos crioprotetores, o que torna o uso de determinados componentes comumente utilizados para outras células inviáveis para a célula espermática (WATSON, 2000).

2.5. Antioxidantes

A literatura é escassa no que concerne a utilização de antioxidantes em meios diluidores nas biotecnologias da reprodução de caprinos, sendo estas substâncias

mais usuais em bovinos, mostrando resultados satisfatórios em programas de inseminação artificial.

Os processos atuais de criopreservação envolvem diferentes etapas que no seu transcorrer levam a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), dentre estas, destacam-se o radical livre superóxido e peróxido de hidrogênio. O ROS atua de diferentes maneiras na membrana plasmática celular, promovendo a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, o ROS aumenta a fragmentação do DNA, despolimerizando ácidos hialurônicos, modifica o citoesqueleto e inibe a fusão dos espermatozoides com o ovócito (OCHSENDORF, 1999; PEREIRA et al., 2002).

O processo de geração de ROS é um componente chave de processos como inflamação, isquemia, envelhecimento e carcinogêneses. Além disso, o desbalanço entre oxidante e antioxidante favorece a formação de peróxidos causando estresse oxidativo e consequentemente seqüelas patológicas (OCHSENDORF, 1999).

As ROS são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos, levando a concentrações fisiológicas necessárias para o funcionamento normal da célula, ou a quantidades excessivas, causando danos oxidativos à célula (NORDBERG e ARNER, 2001; IMAI e NAKAGAWA, 2003).

O uso fisiológico de ROS pelas células começa a ser demonstrado em áreas como a da sinalização intracelular e regulação redox. O radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídios podem regular a atividade de várias quinases e fatores de transcrição e o mecanismo da morte celular. Várias citocininas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores usam ROS como segundo mensageiro. As espécies oxigênio reativas podem também, contribuir para o envelhecimento e muitas doenças humanas como câncer, derrame cerebral, doenças neurodegenerativas e diabetes (IMAI e NAKAGAWA, 2003).

O efeito prejudicial das espécies oxigênio reativas, no espermatozoide, foi sugerido a mais de 50 anos atrás, demonstrando que a exposição do espermatozoide humano a altas concentrações de oxigênio resultava em toxicidade, com perda rápida da sua motilidade (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Estudos posteriores têm confirmado que o espermatozoide e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ROS e que a susceptibilidade do espermatozoide aos danos oxidativos causados pelos ROS decorrem da alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes na sua membrana plasmática. Estes ácidos graxos são altamente predispostos ao ataque dos radicais livres e consequentemente, a peroxidação dos lipídios. A acumulação de peróxidos de lipídios na superfície do

espermatozóide causa disfunção e morte celular (KRZYZOSIAK et al., 2000; BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002).

Visando diminuir os efeitos do ROS, existe nos espermatozoides e no plasma seminal um potente sistema (catalase, superóxido dismutase, vitamina E, ácido ascórbico, etc.) para prevenir a formação de radicais livres. Todavia, este sistema não é potente o suficiente para prevenir a peroxidação de lipídeos completamente, especialmente durante a estocagem *in vitro* (resfriamento e/ou congelamento), onde a produção de radicais livres é significativamente aumentada como resultado de mudanças metabólicas (PEREIRA et al., 2002).

2.5.1. Ácido ascórbico (Vitamina C)

As vitaminas antioxidantes protegem as membranas plasmáticas, reagindo e removendo os radicais livres, assim destruindo a cadeia de reações. Mantendo uma dieta que forneça níveis apropriados de vitaminas antioxidantes, especialmente, o ácido ascórbico e ocorreria a redução dos danos nas membranas celulares (MILLAR, 1992; NORDBERG e ÁRNER, 2001).

O ácido ascórbico ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. O ácido ascórbico reduz o α -tocoferol, peróxidos e ROS, como superóxidos e age também, prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (NORDBERG e ÁRNER, 2001). Porém, quando ingerida em dose elevada ou na presença de metais como ferro ou cobre, o ácido ascórbico pode agir como um pró-oxidante, levando a lipoperoxidação. *In vitro*, a mistura Cu-ascorbato ou Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos, levando a formação de radicais livres, os quais danificam o DNA, lipídios e proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Dawson et al. (1992) indicaram melhora na viabilidade do espermatozóide, diminuição na percentagem de anormalidades e aumento na motilidade espermática em experimento com homens fumantes de 25 anos de idade, que ingeriram 1,0 g/dia de ácido ascórbico. Luck et al. (1995) descreveram que o ascorbato poderia ser considerado como essencial para o processo reprodutivo humano.

O ácido ascórbico é um dos componentes não-enzimáticos que atuam como antioxidante e é essencial nas dietas de humanos e outros mamíferos e foi relacionado com a fertilidade (MILLAR, 1992). Alguns mamíferos como o homem, o porco-da-índia e os morcegos não sintetizam o ácido ascórbico por não sintetizarem a enzima L-gulonolactona oxidase, assim, os níveis de ácido ascórbico, nestes animais, diminuem

em períodos que ocorrem restrições alimentares (LEVINE e MORITA, 1985). Gonul e Kaplan (1999) verificaram que a restrição alimentar induzida causou a perda de peso de porcos-da-índia, mesmo tendo sido preservado os níveis ideais de ácido ascórbico, via suplementação. Contudo, os autores constataram que ao testarem a peroxidação oxidativa no plasma com o ácido tiobarbitúrico, os níveis de peroxidação se elevaram, mesmo tendo havido suplementação com ácido ascórbico, indicando a ausência de ação antioxidante no plasma sanguíneo, nesta condição de restrição alimentar.

Yousef et al. (2003) demonstraram, em coelhos machos, que a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi significativamente diminuída com a suplementação de ácido ascórbico e α -tocoferol. Resultados semelhantes foram encontrados em caprinos por Brzezinska-Slebozinska et al. (1995) e em humanos por Geva et al. (1996) ao descreverem que a suplementação de vitamina E e/ou ácido ascórbico reduziram as espécies reativas ao oxigênio, melhorando assim, a taxa de fertilização por reduzir a peroxidação lipídica. Fraga et al. (1992) demonstraram que o ácido ascórbico está presente em altas concentrações no plasma seminal humano comparado com o plasma sanguíneo (400 vs 60 μ M), presumivelmente, refletindo o importante papel fisiológico. Além disso, o ácido ascórbico é uma das defesas efetivas contra a peroxidação lipídica no plasma seminal, atuando na prevenção de danos oxidativos ao DNA. Portanto, o dano oxidativo no DNA do espermatozóide resultaria em infertilidade e defeitos congênitos nas proles.

A eficiência do ácido ascórbico como antioxidante também foi demonstrada em estudos onde a suplementação de ácido ascórbico teve efeitos benéficos sobre as características do sêmen e os níveis de testosterona em coelhos (SALEM et al., 2001). Foi sugerido por Thiele et al. (1995) que as concentrações de ácido ascórbico no plasma seminal humano estão correlacionadas, positivamente, com as porcentagens de espermatozoides morfolologicamente normais e também foi sugerido que esta vitamina é protetora do epidídimo, agindo como proteção antioxidante das membranas celulares. Chinoy et al. (1986) relataram que o ácido ascórbico é importante para a manutenção fisiológica da integridade dos testículos, epidídimo e glândulas acessórias e a deficiência de ácido ascórbico nas dietas causariam rápida degeneração do sistema reprodutivo como um todo, como foram demonstrados pelos autores nas espécies de porcos-da-índia.

Sonmez et al. (2005) investigaram os efeitos da suplementação de ácido ascórbico sobre a qualidade do sêmen, peroxidação lipídica e os níveis de testosterona no plasma sanguíneo de ratos Wistar. Os autores concluíram que a suplementação do

ácido ascórbico não aumentou o peso corporal, o peso dos testículos, epidídimo, vesículas seminais e próstata, mas a suplementação aumentou, significativamente, a concentração de ácido ascórbico nos testículos e plasma sanguíneo, diminuindo, consideravelmente, os níveis de peroxidação lipídica.

Altas concentrações de ácido ascórbico no sêmen de espécies como os homens e os peixes parecem ter um papel chave na manutenção da integridade genética das células espermáticas, prevenindo danos oxidativos ao DNA dos espermatozóides (FRAGA et al, 1992; DABROWSKI e CIERESZKO, 1996).

No sêmen equino, a vitamina C tem mostrado efeito protetor sobre a integridade de membrana dos espermatozóides armazenados a 5 °C (AURICH et al., 1997). Porém, quando a alteração na membrana está presente, não há melhora significativa na motilidade espermática (BALL et al., 2001).

Donoghue e Donoghue (1997) não observaram benefícios da utilização do ácido ascórbico sobre a integridade de membrana, viabilidade e motilidade espermática no sêmen criopreservado de perus.

Borges (2003), criopreservando sêmen de bovinos com diluente contendo ácido ascórbico, observou excelentes resultados na motilidade durante a hora 0 (75 %) e hora 3 (63 %) do teste de termo-resistência. Foote et al. (2002), avaliando a eficácia do ácido ascórbico em diferentes concentrações sobre o sêmen bovino refrigerado a 5 °C, observou motilidade espermática em 63 %, afirmando que este antioxidante surge como uma excelente alternativa na criopreservação de sêmen.

2.5.2. Própolis

A própolis é um antioxidante resinoso de coloração e consistência variada, coletado pelas abelhas de diferentes partes de plantas como brotos, botões florais, exsudatos resinosos, folhas, etc. É um dos produtos naturais mais utilizados durante séculos pela humanidade e administrados sob diversas formas. Seu emprego já era descrito na Idade Antiga pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (PEREIRA et al., 2002).

De acordo com Sforcin et al. (2002) e Pereira et al. (2002), a composição química da própolis varia de região para região, sendo que a proporção e tipos de substâncias nela encontrada se alteram dependendo do local de coleta, possuindo em média 55 % de resinas e bálsamos, 30 % de ceras, 10 % de óleos voláteis e 5 % de pólen.

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química, e este possivelmente é o maior problema para o seu uso, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região, clima, época da colheita, técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (grau de "africanização" da *Apis melífera*). No caso do Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país, podendo ser essa variação facilmente explicada pela grande biodiversidade botânica (PEREIRA et al., 2002).

Vários trabalhos têm sido publicados divulgando e revisando as propriedades biológicas da própolis como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoária, hepatoprotetoras, antitumoral, cicatrizante, antiinflamatória, antiviral, antioxidante, etc. (PEREIRA et al., 2002; SFORCIN et al. 2002).

Os principais constituintes da própolis se encontram distribuídos nas seguintes classes: ácidos graxos, ácidos fenólicos e seus ésteres, flavanóides, terpenos, β -esteróides, aldeídos aromáticos e álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados do estilbeno. Observou-se também a presença de vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, E e PP, minerais como Mn, Cu, Ca, Al, Si, V, Ni, Zn e Cr³⁻⁵ e mais recentemente, com a evolução das técnicas de análise, compostos de alta massa molecular e carboidratos como frutose, glicose, sacarose e maltose (PEREIRA et al., 2002).

Por meio de testes bioquímicos, confirmou-se a atividade antioxidante conferida aos constituintes da própolis. Matsushige et al. (1995) estudaram a atividade antioxidante em amostras de própolis do Brasil sobre os radicais livres DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) e os radicais ânion-superóxido (presentes nas reações xantina/xantina oxidase e dinucleotídeo α -nicotinamida-adenina/fenazina), comparando o extrato metanólico e o extrato aquoso, relatando que este último conferia efeitos antioxidantes mais fortes contra tais radicais. Os autores isolaram quatro derivados do ácido dicafeuoquinico de extratos de própolis aquoso os quais mostraram, em sistemas de ensaio, grande atividade antioxidante sobre os radicais DPPH e ânion superóxido. Estes compostos mostraram maior potência antioxidante quando comparados as vitamina C, vitamina E e ácido caféico (CAPE).

Basnet et al. (1997) isolaram outro potente antioxidante no extrato aquoso da própolis brasileiro sendo nomeado de propol, possuindo também maior atividade antioxidante comparada a vitamina E e vitamina C. Este inibiu a oxidação da LDL iniciada pelo cobre. Outros autores relataram novos e importantes antioxidantes na própolis como o CAPE, flavanóides, vitamina C e vitamina E (SFORCIN et al., 2002).

Sun et al. (2002) realizaram estudos sugerindo que alguns componentes da própolis são absorvidos pelo sangue atuando como antioxidantes hidrofílicos e conservando a vitamina C.

Russo et al. (2006) avaliaram a importância do extrato de própolis na composição de suplementos alimentares para homens sub-férteis. Os autores observaram que a própolis apresentou resultados excelentes no reestabelecimento do percentual de células espermáticas viáveis, diminuindo a ocorrência da peroxidação lipídica, ação de radicais livres e ROS.

Oliveira et al. (2007) estudaram o efeito da adição de própolis ao meio diluidor em diferentes concentrações (0,25 e 0,5 %) e suas influências nas características físicas do sêmen equino resfriado a 5 °C, concluindo que a própolis não demonstrou possuir efeitos benéficos sobre as características físicas do sêmen equino resfriado a 5° C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no mês de janeiro de 2008, no município de Viçosa, região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil. O município é localizado a 20°45'45" latitude Sul e 42°52'04" a Oeste de Greenwich, altitude média é de 690 m, temperatura média anual de 20,9 °C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo CWA (inverno seco e verão chuvoso) pela classificação de Köeppen.

3.1. Animais, alimentação e sanidade

Foram utilizados cinco reprodutores, sendo dois da raça Alpina e três da raça Saanen, com boa condição corporal, com aproximadamente cinco anos de idade, avaliados e aprovados para reprodução por meio de exame andrológico de acordo com os padrões de qualidade de sêmen *in natura* preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-CBRA (1998).

A alimentação foi feita duas vezes ao dia com silagem de milho e concentrado protéico (550 g/dia). Água e sal mineral fornecidos *ad libitum*.

O manejo sanitário empregado foi o mesmo utilizado para o rebanho da referida granja, com os animais mostrando-se negativos para artrite encefalite caprina, vacinações contra clostridioses e vermifugados periodicamente para endo e ectoparasitas.

3.2. Avaliação física e morfológica do sêmen

Foram utilizadas fêmeas em estro induzido com cipionato de estradiol (E.C.P.® - Pharmacia Brasil Ltda.), como manequim, contidas em tronco de coleta. Os ejaculados foram obtidos por meio de vagina artificial, com temperatura da água em torno de 42 a 44 °C, no momento da coleta e pressão de 40 a 60 mm Hg, onde se obteve 1 ejaculado/animal a cada 3 dias durante duas semanas, totalizando 5 ejaculados/animal.

Os ejaculados coletados foram armazenados em tubos graduados protegidos de luz solar com papel laminado e posteriormente colocado em banho-maria a 37 °C.

Na avaliação física do sêmen *in natura*, foram analisados os seguintes aspectos: volume (mL), aspecto (aquoso, opalescente, leitoso e cremoso), turbilhonamento (0-5), motilidade espermática progressiva retilínea (%), vigor (0-5) e concentração espermática (sptz/mL). Uma gota de sêmen de cada ejaculado foi colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37 °C. Em aumento microscópico de 100 X, foi avaliado o tubilhonamento (movimento espermático em massa). Posteriormente, colocou-se uma lamínula previamente aquecida a 37 °C sobre a gota de sêmen, e em

aumento de 400 X foram avaliados a motilidade espermática progressiva retilínea (0 – 100%) e o vigor espermático (0 – 5) de acordo com o preconizado pelo CBRA (1998).

Em tubo plástico de 1,5 mL contendo 1 mL de formol-salino tamponado (HANCOCK, 1957) foram acondicionadas alíquotas do sêmen suficiente para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozóides por meio de preparação úmida e com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1250 X (sob uma gota de óleo de imersão). Foram contabilizadas 400 células por ejaculado e mensurados em percentagem os defeitos espermáticos segundo os critérios estabelecidos por Blomm (1973) e preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-CBRA (1998).

Foram considerados ejaculados ideais para este estudo, aqueles que apresentaram padrões físicos mínimos de volume total de 0,8 mL, vigor espermático 3 e motilidade espermática total 70 %, e padrões morfológicos máximos de 30 % de defeitos totais e 10 % de defeitos maiores (CBRA, 1998).

3.3. Centrifugação, resfriamento e congelamento do sêmen

Após o exame físico, o sêmen *in natura* foi diluído na proporção 1:9 com solução de Ringer com Lactato a 37 °C, homogeneizado, dividido em 5 alíquotas iguais em tubos graduados e centrifugados a 600 G por 10 minutos (DELL'AQUA JUNIOR e PAPA, 2001). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Cada *pellet* de espermatozóides formado foi ressuspenso até completar 1 mL com diluente, de acordo com os tratamentos (Tabela 2). Em seguida, uma alíquota de 10 µL de sêmen diluído de cada tratamento foi colocada em 2 mL de solução formol-salina tamponada (HANCOCK, 1957) para determinação da concentração espermática/mL (método hematocitométrico), cálculo do número de doses e do volume final de diluente a ser adicionado.

O diluidor empregado foi o meio a base de TRIS (BIOXCELL® - IMV) e sua confecção de acordo com o exposto na tabela 1. A tabela 2 mostra a distribuição dos tratamentos utilizados neste estudo.

TABELA 1. Composição química do diluidor base (BIOXCELL® - IMV).

COMPONENTES	g/L
Tris	2,3
Citrato de sódio	6,2
Cloreto de potássio	0,8
Frutose	1,2
Lactose monohidratada	0,8
Glicina	0,2
Glicose anidra	0,5
Taurina	0,005
Sulfato de gentamicina	0,24
Tartrato de tilosina	0,33
Lincospectina 100	0,383
Glicerol	40,2
Hidrato de lactato de cálcio	0,7
Lecitina de soja	1,5
Ácido cítrico monohidratado	2,5
Água ultra pura q.s.p.	1000 mL

FONTE: IMV® - BRASIL.

TABELA 2. Distribuição dos tratamentos de acordo com a composição do diluente.

TRAMENTOS	COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES
Tratamento 1 (T1)	BIOXCELL® - IMV (CONTROLE)
Tratamento 2 (T2)	BIOXCELL® + 0,25% de extrato liofilizado de própolis (OLIVEIRA et al., 2007)
Tratamento 3 (T3)	BIOXCELL® + 0,5% de extrato liofilizado de própolis (OLIVEIRA et al., 2007)
Tratamento 4 (T4)	BIOXCELL® + 0,05% de ácido ascórbico (FOOTE et al., 2002)
Tratamento 5 (T5)	BIOXCELL® + 0,25% de ácido ascórbico (FOOTE et al., 2002)

Após as diluições finais das amostras foram avaliadas quanto a motilidade e o vigor espermático, tal como nas avaliações no sêmen *in natura*, e posterior envase em palhetas de 0,25 mL (modelo francês; concentração total de 50 milhões de espermatozoides/dose; 200 milhões/mL), em temperatura ambiente. Estas palhetas foram colocadas em um tubo de ensaio de 20 mL revestido por um refil (saco plástico) e colocado dentro de um recipiente de plástico com capacidade de 240 mL contendo 120 mL de álcool metílico absoluto. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira, com temperatura interna de 4 - 5 °C, durante 35 minutos. Após este período, o tubo de ensaio contendo as palhetas foi retirado do recipiente plástico e mantido na temperatura da geladeira por mais 25 minutos (FURST, 2002; BISPO, 2005).

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas sobre um suporte de aço inox, a uma altura de 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, acondicionado em uma caixa de isopor com 40 cm comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, contendo uma lâmina de 5 cm de altura de nitrogênio em seu interior, e pré-congeladas durante 14 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento final do sêmen, sendo, em seguida, raqueadas e devidamente identificadas e estocadas em botijão com nitrogênio para análises posteriores.

As doses congeladas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, e acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL (Eppendorf) e homogeneizados para análise imediata de motilidade e vigor espermático, por meio de microscopia com contraste de fase, em aumento de 200 X ou 400 X (CBRA, 1998).

3.4. Testes complementares

3.4.1. Teste de termo-resistência (TTR)

Este teste consiste em avaliar a qualidade do sêmen por meio da motilidade espermática progressiva retilínea a cada 0, 60, 120 e 180 minutos até o final de três horas de incubação em banho-maria a 38 °C (DIMITROPOULOS, 1967; VOGLER et al., 1991). Quanto maior for o percentual de espermatozoides com motilidade progressiva pós-descongelamento no final do TTR, maior será a probabilidade da amostra ser viável no programa de inseminação artificial (JONDET e RABADEUX, 1976; CASAGRANDE et al., 1979).

3.4.2. Coloração supravital

Este método de coloração avalia diretamente a integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides, classificando-os em vivos (não-corados) e mortos (corados de rosa – avermelhados) (SMITH e MURRY, 1997).

Alíquotas de 10 µL do sêmen *in natura* e congelado/descongelado foram homogeneizadas na proporção de 1:1 com solução de eosina-nigrosina em lâmina previamente aquecida a 37 °C. Posteriormente, foi feito o esfregaço e avaliou-se a percentagem de espermatozoides vivos (não-corados), após 60 segundos de confecção da lâmina (MAYER et al., 1951; SWANSON e BEARDEN, 1951).

3.4.3. Teste Hiposmótico

Este teste foi efetuado para verificar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides, sendo que os normais responderam ao teste (reativos) enrolando a cauda após a adição da solução hiposmótica de 100 mOsm/kg (9 g de frutose, 4,9 g de citrato trissódico e 1000 mL de água destilada) (REVELL e MRODE, 1994). A osmolaridade de 100mOsm/kg foi utilizada por SOUSA et al. (2000) e FONSECA et al. (2001), que concluíram que esta osmolaridade é a indicada para viabilizar o teste hiposmótico em sêmen caprino *in natura*. Foi efetuado o teste hiposmótico no sêmen *in natura* e pós-descongelamento para verificar as alterações de membrana ocasionadas pelo processo de congelamento.

Uma alíquota de 10 µL da amostra de sêmen foi adicionada em 1 mL de solução hiposmótica. Após a homogeneização, foi incubada em banho-maria a 37 °C durante uma hora. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em 0,5 mL de solução de formol salina tamponada para fixação da mesma. Em seguida, foram montadas entre lâmina e lamínula e analisadas em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1250 X, e foram avaliados, de acordo com o tratamento, 400 espermatozóides por dose descongelada.

3.5. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico S.A.E.G - versão 9.1 (UFV, 2007). Para análise, seguiu-se um delineamento inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 2 (raças Saanen e Alpina) por 5 (tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5 – diluentes), sendo analisados separadamente por não haver interação entre os fatores.

Para todas as características estudadas realizou-se a estatística descritiva (médias, desvios padrão e coeficiente de variação).

Para os valores quantitativos, realizou-se teste de Lilliefors e Cochran-Bartlett para verificar, respectivamente, a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, e quando necessário, foi efetuado a conversão pertinente dos dados e novamente analisados pelos referidos testes, e quando não atenderam as premissas da ANOVA, os dados foram analisados por análise não-paramétrica (Kruskal Wallis).

Para as características quantitativas foi empregada a ANOVA e aquelas que se apresentaram significativas no teste F, foram submetidas a comparação de médias pelo teste de Tukey, com probabilidade de erro de 5 %.

Para o teste de TTR, os dados obtidos nas amostras de cada tratamento, foram analisados pela análise de regressão, para verificar o comportamento dos mesmos durante o tempo de 3 horas de incubação e também pela ANOVA.

A correlação simples de Pearson foi testada entre todas as variáveis para verificar possíveis relações entre as mesmas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sêmen *in natura*

As médias e os desvios-padrão do teste supravital e aspectos físicos do sêmen *in natura* dos animais, durante o período experimental, estão sumariados na tabela 3, e na tabela 4, estão sumariados as médias e os desvios-padrão do teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozóides dos bodes estudados.

TABELA 3. Médias e desvios-padrão do percentual de espermatozóides não corados no teste supravital e aspectos físicos do sêmen *in natura* em bodes adultos, criados em regime intensivo.

BODE	ASP	VOL	TURB	MOT	VIG	SUPVIT
53	3,6 ± 0,5 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	3,8 ± 0,7 ^{ab}	92,0 ± 4,4 ^a	3,9 ± 0,4 ^a	89,0 ± 6,0 ^a
58	3,6 ± 0,5 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	3,7 ± 0,6 ^b	88,0 ± 5,7 ^a	3,9 ± 0,2 ^a	87,2 ± 5,6 ^a
59	4,0 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,5 ^a	4,0 ± 0,3 ^{ab}	91,0 ± 2,2 ^a	4,2 ± 0,2 ^a	88,2 ± 6,2 ^a
60	4,0 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	4,8 ± 0,2 ^a	91,0 ± 6,5 ^a	4,3 ± 0,4 ^a	90,6 ± 6,6 ^a
62	3,8 ± 0,4 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	3,8 ± 0,4 ^{ab}	90,0 ± 3,5 ^a	4,2 ± 0,4 ^a	88,0 ± 3,3 ^a
GERAL	3,8 ± 0,4	0,9 ± 0,3	4,0 ± 0,6	90,4 ± 4,5	4,1 ± 0,3	88,6 ± 5,3

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste Tukey; ASP = aspecto (0 – 4); VOL = volume em mL; TURB = turbilhonamento (0 – 5); MOT = motilidade espermática progressiva em %; VIG = vigor espermático (0 – 5); SUPVIT = teste supravital em %.

TABELA 4. Médias e desvios-padrão de percentual de espermatozóides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozóides de bodes adultos criados em regime intensivo.

BODE	DFM	DFMEN	DFT	HOST
53	10,6 ± 2,5 ^a	9,8 ± 2,5 ^a	20,4 ± 1,8 ^a	69,4 ± 11,8 ^a
58	7,4 ± 1,8 ^a	7,8 ± 1,2 ^a	15,2 ± 2,1 ^b	78,4 ± 19,0 ^a
59	7,4 ± 2,4 ^a	6,9 ± 1,5 ^a	14,1 ± 2,6 ^b	59,2 ± 29,2 ^a
60	7,6 ± 1,7 ^a	6,9 ± 2,3 ^a	14,5 ± 2,2 ^b	84,4 ± 11,5 ^a
62	8,2 ± 1,3 ^a	7,5 ± 1,7 ^a	15,7 ± 2,1 ^b	59,8 ± 18,9 ^a
GERAL	8,2 ± 2,2	7,7 ± 2,0	16,0 ± 3,0	70,2 ± 20,3

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey; DFM = defeitos espermáticos maiores em %; DFMEN = defeitos espermáticos menores em %; DFT = defeitos espermáticos totais em %; HOST = teste hiposmótico em %.

O aspecto, volume, motilidade espermática, vigor espermático, teste supravital, teste hiposmótico, defeitos espermáticos maiores e menores variaram entre os animais, porém não houve diferença entre os mesmos (P>0,05). No entanto, o turbilhonamento e os defeitos espermáticos totais apresentaram diferença entre os animais (P<0,05). Para o primeiro, os maiores valores foram obtidos pelo animal 60, valores intermediários pelos animais 53, 59 e 62, enquanto que os menores valores foram obtidos pelo animal 58. E para o segundo, o bode 53 apresentou valores superiores aos demais. Apesar destas diferenças, todos os parâmetros estão dentro da da

normalidade para a espécie caprina (CBRA, 1998). Os valores observados nestes parâmetros mostram que os bodes utilizados neste estudo se apresentaram excelentes e homogêneos quanto ao perfil seminal. Sendo os mesmos classificados como aptos à reprodução.

Os valores médios observados neste estudo para o aspecto físico do sêmen *in natura* são superiores aos padrões exigidos pelo CBRA (1998), onde os valores normais para a espécie caprina são de 0,8 mL de volume do ejaculado, aspecto 3 (leitoso), 70 % de motilidade e vigor espermático 3. Os valores de motilidade e vigor espermático deste estudo estão de acordo com os obtidos por Azerêdo et al. (2001) que obtiveram 85,4 % de motilidade e 4,5 de vigor espermático em sêmen *in natura* da espécie caprina. Da mesma forma, esses valores corroboram os estudos de Bittencourt et al. (2005) que observaram em sêmen *in natura* de bodes, motilidade de 86 % e 4,0 de vigor espermático e os de Palhão (2006) que observou no sêmen *in natura* de bodes mantidos nas mesmas condições deste estudo, média de 85 % para motilidade e 3,6 de vigor espermático.

O valor médio geral no teste supravital observado neste estudo estão de acordo com os valores observados por Bispo (2005), onde observou o valor médio no sêmen *in natura* de caprinos de 90,2 % espermatozóides não-corados (vivos).

Da mesma forma, a média geral dos defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais não ultrapassaram os valores normais para caprinos preconizados pelo CBRA (1998) em que animais não podem apresentar valores ≥ 10 % de defeitos maiores, ≥ 10 % de defeitos menores e ≥ 30 % de defeitos totais.

Para o teste hiposmótico, valores similares foram obtidos por Bittencourt et. (2005), onde 53,9 % dos espermatozóides no sêmen *in natura* de bodes, reagiram ao teste. Valores inferiores foram obtidos por Bispo (2005), onde o autor registrou 27% de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico no sêmen *in natura* de bodes das raças Alpina e Saanen.

Na tabela 5, têm-se as médias e desvios-padrão da concentração espermática, teste supravital e aspectos físicos do sêmen *in natura* e na tabela 6 estão sumariadas as médias e os desvios-padrão de espermatozóides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozóides de bodes adultos das raças Saanen e Alpina.

TABELA 5. Médias e desvios-padrão* da concentração espermática, teste supravital e aspectos físicos do sêmen *in natura* em bodes adultos das raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo.

RAÇA	ASP	VOL	TURB	MOT	VIG	SUPVIT	SPTZx10 ⁶ /mL**
Saanen	3,9 ± 0,3	0,9 ± 0,4	4,2 ± 0,6	91,3 ± 4,4	4,1 ± 0,4	89,3 ± 5,9	686,7 ± 286,1
Alpina	3,7 ± 0,5	1,0 ± 0,4	3,7 ± 0,5	89,0 ± 4,6	4,0 ± 0,4	87,6 ± 4,4	643,0 ± 295,4
GERAL	3,8 ± 0,4	0,9 ± 0,4	4,0 ± 0,6	90,4 ± 4,5	4,1 ± 0,4	88,6 ± 5,3	669,2 ± 284,5

*(P>0,05) pelo teste de Tukey; **Concentração espermática/mL/sêmen ressuscitado; ASP = aspecto (0 - 4); VOL = volume em mL; TURB = turbilhamento (0 - 5); MOT = motilidade espermática progressiva em %; VIG = vigor espermático (0 - 5); SUPVIT = teste supravital em %; SPTZx10⁶/mL = concentração espermática por mL.

TABELA 6. Médias e desvios-padrão* de espermatozóides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozóides de bodes adultos das raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo.

RAÇA	DFM	DFMEN	DFT	HOST
Saanen	8,5 ± 2,5	7,8 ± 2,7	16,4 ± 3,6	71,0 ± 20,9
Alpina	7,8 ± 1,5	7,6 ± 1,4	15,4 ± 2,0	69,1 ± 20,4
GERAL	8,2 ± 2,2	7,7 ± 2,0	16,0 ± 3,0	70,2 ± 20,3

*(P>0,05) pelo teste de Tukey; DFM = defeitos espermáticos maiores em %; DFMEN = defeitos espermáticos menores em %; DFT = defeitos espermáticos totais em %; HOST = teste hiposmótico em %.

A concentração espermática, o percentual de espermatozóides reativos no teste supravital e hiposmótico, defeitos espermáticos e os aspectos físicos do sêmen *in natura* não diferiram entre as raças (P>0,05), sendo classificados como normais para a espécie de acordo com os valores mínimos preconizados para a espécie pelo CBRA (1998). Os valores de motilidade espermática nas raças Saanen deste estudo são superiores aos valores registrados por Rovay (2006) que registrou 86 %. Porém, para a raça Alpina, os valores de motilidade espermática foram similares aos registrados pelo autor (84 %).

Os valores médios de espermatozóides reativos ao teste supravital para as raças Saanen e Alpina estão de acordo com os valores observados por Rovay (2006), onde se observou 89,8 e 92,6 %, respectivamente.

No teste hiposmótico, os valores são superiores aos observados por Santos et al. (2006) que observou na raça Saanen, 33 % de espermatozóides reativos ao teste e 39,8 % na raça Alpina, porém o autor utilizou solução hiposmótica de 60 mOsm/kg. Martins (2001) empregou o teste hiposmótico (100 mOsm/kg) em bodes da raça Alpina, observando valores inferiores (24,5 % de espermatozóides reativos) a este estudo. Fonseca et al. (2005) avaliaram várias concentrações de soluções hiposmóticas (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 mOsm) no sêmen *in natura* de caprinos e observaram que não houve diferença de espermatozóides reativos entre as soluções de 60 e 100 mOsm.

As qualidades das características físicas e morfológicas do sêmen *in natura* demonstram homogeneidade e confiabilidade dos animais utilizados neste estudo, ocorrendo pequenas variações entre os mesmos. Da mesma forma, os bodes já possuíam históricos reprodutivos satisfatórios nas estações de montas anteriores e isto, juntamente com as qualidades seminais estudadas no sêmen *in natura*, respaldaram a utilização dos mesmos nos estudos de criopreservação dos espermatozóides.

Observa-se na tabela 7, as correlações entre os aspectos físicos e morfológicos dos espermatozóides e testes supravital e hiposmótico em sêmen *in natura* dos bodes estudados.

TABELA 7. Correlações Simples de Pearson entre os aspectos físicos e morfológicos dos espermatozóides e testes supravital e hiposmótico em sêmen *in natura* de bodes adultos das raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo.

	ASP	VOL	TURB	MOT	VIG	SUPVIT	DFM	DFMEN	DFT	HOST
ASP	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VOL		1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	- 0,46
TURB			1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MOT				1	0,52	0,55	NS	NS	NS	NS
VIG					1	NS	NS	NS	NS	NS
SUPVIT						1	NS	NS	NS	NS
DFM							1	NS	0,73	- 0,40
DFMEN								1	0,69	NS
DT									1	NS
HOST										1

NS = não-significativo a $P > 0,05$; ASP = aspecto; VOL = volume; TURB = turbilhonamento; MOT = motilidade espermática progressiva; VIG = vigor espermático; SUPVIT = teste supravital; DFM = defeitos espermáticos maiores; DFMEN = defeitos espermáticos menores; DFT = defeitos espermáticos totais; HOST = teste hiposmótico.

Não houve correlação do aspecto e do turbilhonamento com as demais variáveis. Houve correlação média e negativa ($r = -0,46$) entre o volume e o teste hiposmótico, indicando que os maiores números de espermatozóides reativos foram aqueles presentes em ejaculados de menor volume. Provavelmente, os menores volumes dos ejaculados ocorreram pela frequência das coletas durante a metade final do experimento, conseqüentemente, menor tempo de estocagem na cauda do epidídimo, o que não ocorreu no início do estudo, onde os animais, apesar de terem sido submetidos a sessões de coletas para esgotar a reserva extra gonádica, vinham de um período de repouso sexual prolongado.

A motilidade espermática apresentou correlação média e positiva com vigor ($r = 0,52$) e o teste supravital ($r = 0,55$). Estes resultados demonstram de certo ponto, a acurácia na avaliação da motilidade espermática por meio de microscopia convencional, visto que os valores atribuídos para estes parâmetros foram semelhantes entre os procedimentos de avaliação, sendo em número absolutos pouco acima, indicando

grande percentual de espermatozoides vivos no sêmen *in natura*. Portanto, a avaliação da motilidade espermática, embora feita de forma subjetiva, quando feita por técnico previamente treinado, apresenta boa relação com a real qualidade seminal. Mayer et al. (1951) e Swanson e Bearden (1951) relatam que a utilização do teste supravital é indicado no sêmen *in natura* para avaliar a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides.

Houve correlação alta e positiva ($r = 0,73$ e $0,69$) entre defeitos espermáticos maiores e menores com os defeitos totais, indicando que tanto os defeitos espermáticos menores e maiores, estavam presentes nos ejaculados estudados. Houve relação média e negativa ($r = -0,40$) entre os defeitos espermáticos maiores e o teste hiposmótico, não sendo observado com os defeitos menores, o que é esperado, em função deste último parâmetro, representar principalmente os defeitos de cabeça, e que no teste hiposmótico, serem avaliados somente os dobramentos e enrolamentos de caudas. Já entre os defeitos maiores, são observados defeitos de cauda que são as principais anomalias espermáticas nesta classificação, e conseqüentemente, mostram-se pouco reativos ao teste hiposmótico por estarem relacionados a problemas de membrana plasmática.

4.2. Sêmen pós-descongelamento

Na tabela 8 estão sumariadas as médias e os desvios-padrão da motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e percentual de espermatozoides nos testes supravital e teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento (TTR) dos bodes estudados, de acordo com a raça.

A maioria dos estudos não abordam a relação dos testes complementares (teste hiposmótico e teste supravital) e dos aspectos físicos (motilidade e vigor espermático) no sêmen pós-descongelamento de acordo com a variação individual e racial (APÊNDICE A), restringindo apenas no sêmen *in natura*.

As médias da motilidade do sêmen diluído (pré-resfriamento) de todos os tratamentos em cada raça, não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$), mostrando que os diluentes contendo ácido ascórbico e a própolis mantiveram a viabilidade espermática após a diluição final.

Durante o TTR, em ambas as raças, o tratamento controle (T1) e os tratamentos contendo o ácido ascórbico (T4 e T5) mostraram valores médios de motilidade espermática superiores aos tratamentos contendo a própolis, porém o T1 manteve maior estabilidade da motilidade espermática que os T4 e T5 ao longo do teste

de termo-resistência. A própolis mostrou-se tóxica aos espermatozóides durante o processo de criopreservação e conseqüentemente no TTR.

TABELA 8. Médias e desvios-padrão na motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e percentual de espermatozóides não-corados nos teste supravital e reativos no teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento durante o teste de termo-resistência de acordo com o tratamento, em bodes adultos raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo.

T	MOT DIL	MOT 0 H	MOT 1 H	MOT 2 H	MOT 3 H	SUPVIT 0 H	HOST 0 H
Saanen							
1	83,6 ± 6,9 ^{a*}	43,6 ± 18,2 ^a	40,0 ± 16,6 ^a	36,6 ± 16,5 ^a	32,0 ± 14,6 ^a	24,8 ± 11,2 ^a	24,0 ± 8,8 ^{a*}
2	82,3 ± 7,5 ^{a*}	10,6 ± 9,0 ^{bc}	9,2 ± 9,4 ^{bc}	4,3 ± 5,6 ^{bc}	1,3 ± 2,2 ^{bc}	5,0 ± 7,8 ^{bc}	12,0 ± 5,8 ^{b*}
3	82,6 ± 5,3 ^{a*}	4,5 ± 4,8 ^{bce}	2,5 ± 4,1 ^{bce}	0,6 ± 1,7 ^{bce}	0 ^{bce}	2,4 ± 3,2 ^{bce}	11,4 ± 6,1 ^{b*}
4	83,6 ± 5,5 ^{a*}	42,0 ± 16,5 ^{adfg}	37,0 ± 15,6 ^{adfg}	31,6 ± 16,6 ^{adfg}	19,6 ± 14,0 ^{adfg}	28,0 ± 13,2 ^{adfg}	26,9 ± 11,7 ^{a*}
5	83,3 ± 5,8 ^{a*}	41,0 ± 17,7 ^{adfg}	36,6 ± 17,4 ^{adfg}	30,3 ± 18,6 ^{adfg}	15,3 ± 15,3 ^{acfg}	21,0 ± 14,7 ^{acfg}	23,5 ± 10,0 ^{a*}
Alpina							
1	83,5 ± 5,3 ^{a*}	39,0 ± 12,6 ^a	36,0 ± 12,2 ^a	33,5 ± 12,0 ^a	28,5 ± 8,1 ^a	21,6 ± 7,6 ^{a*}	21,3 ± 8,3 ^{ab}
2	84,5 ± 5,9 ^{a*}	10,5 ± 9,8 ^{bc}	7,0 ± 8,8 ^{bc}	3,5 ± 4,1 ^{bc}	0,5 ± 1,5 ^{bc}	4,0 ± 2,7 ^{b*}	11,8 ± 5,2 ^{bc}
3	82,5 ± 6,3 ^{a*}	2,7 ± 2,4 ^{bce}	1,5 ± 2,4 ^{bce}	0,2 ± 0,6 ^{bce}	0 ^{bce}	1,8 ± 3,7 ^{b*}	8,1 ± 4,3 ^c
4	83,5 ± 6,2 ^{a*}	32,5 ± 7,5 ^{acfg}	30,5 ± 7,2 ^{adfg}	26,5 ± 8,1 ^{adfg}	17,0 ± 10,3 ^{adfg}	15,1 ± 6,3 ^{a*}	22,2 ± 8,0 ^a
5	81,5 ± 6,6 ^{a*}	39,5 ± 16,4 ^{adfg}	32,5 ± 16,5 ^{adfg}	29,5 ± 16,0 ^{adfg}	17,5 ± 12,5 ^{adfg}	23,6 ± 3,9 ^{a*}	24,1 ± 11,5 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5 %; T = tratamentos; MOT DIL = motilidade espermática progressiva do sêmen diluído em %; MOT = motilidade espermática progressiva do sêmen pós-descongelado em %; SUPVIT = teste supravital em %; HOST = teste hiposmótico em %; H = hora do teste de termo-resistência.

De acordo com os valores de motilidade espermática mínima pós-descongelamento e após TTR de cinco minutos, preconizados pelo CBRA (1998) (30 %), o T1, T4 e T5 (ambas as raças) foram aprovados quanto sua viabilidade para o uso nos programas de inseminação artificial.

Santos et al. (2006), utilizando Tris-citrato-gema-glicerol e o TTR com duração de 2 horas, observaram na raça Saanen valores de motilidade espermática (início e final do TTR) inferiores (26,9 %; 18,9 %, respectivamente) ao T1, T4 e T5, e superiores ao T2 e T3. No teste hiposmótico (60 mOsm/kg), os autores observaram valores superiores ao T2 e T3, e similares ao T1, T4 e T5, para na raça Saanen, onde 33 % dos espermatozóides reagiram ao teste hiposmótico.

Na raça Alpina, Santos et al. (2006) observaram valores de motilidade espermática (início e final do TTR) similares (31,9 e 25 %, respectivamente) ao T1, T4 e T5, e superiores ao T2 e T3. No teste hiposmótico (60 mOsm/kg), os mesmos autores observaram valores superiores a todos os tratamentos deste estudo, onde 39,3 % dos espermatozóides reagiram ao teste hiposmótico.

As médias e os desvios-padrão do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento (TTR) dos bodes estudados, de acordo com a raça, estão sumariados na tabela 9.

TABELA 9. Médias e desvios-padrão do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento de acordo com o tratamento, em bodes adultos raças Saanen e Alpina, criados em regime intensivo.

T	VIG DIL	VIG 0 H	VIG 1 H	VIG 2 H	VIG 3 H
Saanen					
1	3,9 ± 0,4 ^{a*}	3,6 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,4 ^a	3,2 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,7 ^a
2	3,9 ± 0,4 ^{a*}	2,4 ± 0,9 ^{bc}	2,3 ± 0,8 ^{bc}	0,9 ± 0,9 ^{bc}	0,4 ± 0,7 ^{bc}
3	3,8 ± 0,4 ^{a*}	1,4 ± 1,2 ^{bce}	0,7 ± 0,9 ^{bce}	0,1 ± 0,2 ^{bce}	0 ^{bcd}
4	4,2 ± 0,4 ^{a*}	3,5 ± 0,4 ^{adfg}	3,4 ± 0,5 ^{adfg}	2,7 ± 0,9 ^{adfg}	1,7 ± 1,1 ^{acef}
5	4,0 ± 0,5 ^{a*}	3,5 ± 0,3 ^{adfg}	3,1 ± 0,4 ^{acfg}	2,5 ± 1,0 ^{adfg}	1,4 ± 1,1 ^{bcef}
Alpina					
1	3,6 ± 0,3 ^{b*}	3,4 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,4 ^a
2	3,8 ± 0,3 ^{ab*}	2,6 ± 0,7 ^{ac}	1,5 ± 1,1 ^{bc}	0,8 ± 0,8 ^{bc}	0,1 ± 0,3 ^{bc}
3	3,8 ± 0,2 ^{ab*}	1,4 ± 1,4 ^{bcd}	0,5 ± 0,8 ^{bce}	0,1 ± 0,3 ^{bce}	0 ^{bce}
4	4,1 ± 0,4 ^{ab*}	3,5 ± 0,4 ^{acef}	3,3 ± 0,4 ^{adfg}	3,0 ± 0,5 ^{adfg}	2,1 ± 1,0 ^{adfg}
5	4,0 ± 0,3 ^{a*}	3,5 ± 0,5 ^{acef}	3,3 ± 0,4 ^{adfg}	2,8 ± 0,5 ^{adfg}	1,9 ± 1,0 ^{acfg}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5 %; T = tratamentos; VIG DIL = vigor espermático do sêmen diluído (0 – 5); VIG = vigor espermático do sêmen pós-descongelado (0 – 5); H = hora do teste de termo-resistência.

As médias do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) na raça Saanen, não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Enquanto que na raça Alpina, houve diferença entre os tratamentos, onde somente o T1 e T5 foram diferentes entre si ($P < 0,05$). Apesar das diferenças, os valores são considerados normais para a espécie caprina (CBRA, 1998).

No TTR, em ambas as raças, o tratamento controle (T1) e os tratamentos contendo o ácido ascórbico (T4 e T5) mostraram valores médios de motilidade espermática superiores aos tratamentos contendo a própolis (T2 e T3). Diferentemente da motilidade espermática observada nas duas raças, o vigor no T1, T4 e T5 mostraram estabilidade similar entre si durante o TTR. A própolis, similarmente na motilidade espermática, mostrou-se tóxica aos espermatozóides durante o processo de criopreservação e conseqüentemente no TTR.

Segundo os valores mínimos de vigor espermático pós-descongelamento e após TTR de cinco 5 minutos, preconizados pelo CBRA (1998) (vigor 2), o T1, T4 e T5 (ambas as raças) estão dentro da normalidade para a espécie e podendo ser empregadas em programas de inseminação artificial.

Santos et al. (2006) observaram na raça Saanen valores de vigor espermático, no momento do descongelamento e ao final do TTR de duas horas (2,8 e

2,1, respectivamente), similares ao T1, T2, T4 e T5, e superiores ao T3. Na raça Alpina, observaram valores de vigor espermático, no momento do descongelamento (2,8), similares ao T1, T2, T4 e T5, e superiores ao T3. Já no final do TTR de duas horas, observaram valores similares (2,3) ao T1, T4 e T5, e superiores ao T2 e T3.

A tabela 10 sumaria as médias gerais e desvios-padrão da motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e teste supravital, teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento (TTR) dos bodes estudados.

TABELA 10. Médias gerais e desvios-padrão da motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e teste supravital, teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo.

T	MOT DIL	MOT 0 H	MOT 1 H	MOT 2 H	MOT 3 H	SUPVIT 0 H	HOST 0 H
1	83,6 ± 6,2 ^{a*}	41,8 ± 16,1 ^a	38,4 ± 14,9 ^a	35,4 ± 14,7 ^a	30,6 ± 12,3 ^a	23,5 ± 9,9 ^a	22,9 ± 8,6 ^a
2	83,2 ± 6,9 ^{a*}	10,6 ± 9,1 ^{bc}	8,3 ± 9,0 ^{bc}	4,0 ± 5,0 ^{bc}	1,0 ± 2,0 ^{bc}	4,6 ± 6,2 ^{bc}	11,9 ± 5,5 ^{bc}
3	82,6 ± 5,6 ^{a*}	3,8 ± 4,0 ^{bce}	2,1 ± 3,5 ^{bce}	0,4 ± 1,4 ^{bce}	0 ^{bce}	2,1 ± 3,4 ^{bce}	10,8 ± 5,6 ^{bce}
4	83,6 ± 5,6 ^{a*}	38,2 ± 14,2 ^{adfg}	34,4 ± 13,1 ^{adfg}	29,6 ± 13,9 ^{adfg}	18,2 ± 12,5 ^{adfg}	22,8 ± 12,6 ^{adfg}	25,0 ± 10,5 ^{adfg}
5	82,6 ± 6,1 ^{a*}	40,4 ± 16,8 ^{adfg}	35,0 ± 16,8 ^{adfg}	30,0 ± 17,3 ^{adfg}	16,0 ± 14,0 ^{adfg}	22,0 ± 14,1 ^{adfg}	23,7 ± 10,4 ^{adfg}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5 %; T = tratamentos; MOT DIL = motilidade espermática progressiva do sêmen diluído em %; MOT = motilidade espermática progressiva do sêmen pós-descongelado em %; SUPVIT = teste supravital em %; HOST = teste hiposmótico em %; H = hora do teste de termo-resistência.

As médias gerais da motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) de acordo com o tratamento, não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$), mostrando que o processo de centrifugação, remoção do plasma seminal e ressuspensão do *pellet* de espermatozoides de acordo com os tratamentos, foram eficazes na manutenção da motilidade espermática, viabilizando as amostras para o processo de resfriamento e congelamento.

Por meio dos testes supravital e hiposmótico, pode-se afirmar que o ácido ascórbico manteve a integridade estrutural da membrana e aumentou a viabilidade espermática em relação à própolis, embora não tenha se mostrado superior ao tratamento controle ($P > 0,05$). Esta manutenção pode ser explicada pela proteção da membrana espermática da peroxidação lipídica, reduzindo a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), e consequentemente a lesão espermática, tornando os espermatozoides inviáveis no programa de inseminação artificial (OCHSENDORF, 1999; PEREIRA et al., 2002).

A própolis não proporcionou estabilização estrutural da membrana espermática, em que se esperava melhores valores de motilidade espermática ao

descongelamento. Por outro lado, o ácido ascórbico manteve a estabilidade celular e a qualidade seminal durante o TTR.

De acordo com Nordberg e Árner (2001), o ácido ascórbico pode reduzir a ação de radicais livres, principalmente o superóxido e ROS sobre os espermatozóides, prevenindo a formação de hidroperóxidos de lipídios nas lipoproteínas celulares e mantendo a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação, protegendo as células dos danos oxidativos. Enquanto que a própolis, além de apresentar inúmeras substâncias em sua composição e em diferentes concentrações (PEREIRA et al., 2002; SFORCIN et al., 2002), torna-se difícil, neste trabalho, a explicação de sua verdadeira ação antioxidante *in vitro* sobre os espermatozóides. Apesar da baixa concentração nos diluentes, especula-se que alguma substância presente na própolis possa ter sido tóxica às células, de modo que a baixa viabilidade espermática foi verificada após o descongelamento com diluentes contendo a própolis. Em contrapartida, no sêmen diluído (pré-resfriamento) houve manutenção da viabilidade, motilidade espermática progressiva e vigor espermático, sugerindo que a própolis não seja tóxica aos espermatozóides de caprinos quando associada ao sêmen *in natura*. Watson (2000) afirma que o espermatozóide é sensível aos efeitos tóxicos dos crioprotetores e diluidores, o que torna o uso de determinados componentes comumente utilizados para outras células inviáveis para a célula espermática.

A avaliação da morfologia espermática não foi realizada no sêmen descongelado, visto que a maioria dos trabalhos mostra que não há diferença significativa após a criopreservação (BORGES, 2003). O processo de peroxidação lipídica induz alterações estruturais e metabólicas aos espermatozóides, resultando na perda irreversível da motilidade espermática e aumento da taxa de liberação de componentes intracelulares (JONES e MANN, 1977). Deste modo, a adição de antioxidantes em meios diluidores, não alteraria os testes complementares e a avaliação morfológica dos espermatozóides.

Os valores médios gerais da motilidade espermática, no momento do descongelamento, do T1, T4 e T5, observados neste estudo, estão de acordo com CBRA (1998) e Rovay (2006) que utilizou o diluente leite desnatado-gema na criopreservação do sêmen de bodes das raças Saanen e Alpina, observando no momento do descongelamento, 46,2 % de motilidade espermática. Porém, Rovay (2006) avaliou o TTR somente até as 2 horas pós-descongelamento, onde registrou no final deste teste, valores médios inferiores (4,4 %) a este estudo, quando comparados com o T1, T2 e T3, no mesmo momento de avaliação (2 horas). No entanto, foi similar aos observados no

T2 e T3. Barbosa (1999) também utilizando o diluente leite desnatado-gema, observou no momento do descongelamento valores de motilidade espermática superiores (60 %) a este estudo. Porém, após 3 horas de TTR, a motilidade espermática observada pela autora foi inferior às observadas no T1, T4 e T5, e superiores ao T2 e T3.

Valores inferiores ao T1, T4 e T5 foram observados por Azerêdo et al. (2001), utilizando diluente a base de TRIS no congelamento de sêmen caprino, onde a motilidade espermática pós-descongelamento foi de 18,64 %. Já, valores similares ao T1, T4 e T5, e superiores ao T2 e T3, também foram observados por Khalifa e El-Saidy (2005) utilizando diluente a base de TRIS, onde registraram motilidade espermática pós-descongelamento e após 1 hora de TTR, de 53,8 e 41,1 %, respectivamente. Bittencourt et al. (2006) criopreservando sêmen de bodes com diluente a base de gema de ovo e tempo de equilíbrio de 4 horas, observou motilidade espermática (45 %) pós-descongelamento similar ao T1, T4 e T5 e superior ao T2 e T3.

Os valores médios gerais observados no teste supravital (0 hora) diferiram ($P < 0,05$) entre os tratamentos, no qual o T1, T4 e T5 foram similares e superiores ao T2 e T3. Valores superiores foram observados por Rovay (2006) onde registrou 44,2 % de células vivas. No teste hiposmótico, as médias gerais diferiram ($P < 0,05$) entre os tratamentos, onde o T4, T5 e T1 foram similares e superiores ao T2 e T3. Valores superiores foram observados por Rovay (2006) onde registrou 44,1 % de células reativas ao teste. O balanço metabólico positivo entre oxidante e antioxidante pode ter evitado a formação de peróxidos causando estresse oxidativo, diminuindo as lesões celulares, e consequentemente a manutenção da motilidade espermática (OCHSENDORF, 1999).

Na tabela 11 estão sumariadas as médias gerais e desvios-padrão do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento (TTR) dos bodes estudados.

TABELA 11. Médias gerais e desvios-padrão do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento (TTR) de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo.

T	VIG DIL	VIG 0 H	VIG 1 H	VIG 2 H	VIG 3 H
1	3,8 ± 0,4 ^{b*}	3,5 ± 0,3 ^a	3,4 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,6 ^a
2	3,8 ± 0,4 ^{ab*}	2,5 ± 0,8 ^{bc}	2,0 ± 1,0 ^{bc}	0,8 ± 0,9 ^{bc}	0,2 ± 0,6 ^{bc}
3	3,8 ± 0,8 ^{b*}	1,4 ± 1,2 ^{bce}	0,6 ± 0,8 ^{bce}	0,1 ± 0,2 ^{bce}	0 ^{bce}
4	4,1 ± 0,4 ^{a*}	3,5 ± 0,4 ^{adfg}	3,4 ± 0,5 ^{adfg}	2,8 ± 0,8 ^{adfg}	1,8 ± 1,1 ^{adfg}
5	4,0 ± 0,4 ^{ab*}	3,5 ± 0,4 ^{adfg}	3,2 ± 0,4 ^{adfg}	2,6 ± 0,9 ^{adfg}	1,6 ± 1,1 ^{bdfg}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5 %; T = tratamentos; VIG DIL = vigor espermático do sêmen diluído (0 – 5); VIG = vigor espermático do sêmen pós-descongelado (0 – 5); H = hora.

As médias gerais do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) apresentaram diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos, onde o T1 e T3 foram diferentes do T4 e iguais aos T2 e T5.

As médias gerais do vigor espermático nos tratamentos logo após o descongelamento diferiram entre si ($P < 0,05$), onde o T1, T4 e T5 foram similares e superiores ao T2 e T3.

O T1, T4 e T5, no momento do descongelamento e no final do TTR, apresentaram vigor espermático superior aos preconizados pelo CBRA (1998) e aos observados por Rovay (2006), onde observou 2,4 e 0,4 de vigor espermático logo após o descongelamento e ao final do TTR (2 horas), respectivamente. Porém, o vigor espermático observado pelo autor, tanto no momento do descongelamento quanto no final do TTR, foi similar aos observados no T2 e T3. Azerêdo et al. (2001) e Bittencourt et al. (2006) observaram vigor espermático ($2,9 \pm 0,5$ e $3,42 \pm 0,7$, respectivamente) pós-descongelamento, similares a todos os tratamentos deste estudo.

Barbosa (1999) observou no momento do descongelamento valores de vigor espermático similar (3,5) ao T1, T2, T4 e T5 e superior ao T3. Entretanto, após 3 horas de TTR, o vigor espermático (1,5) observado pela autora foi inferior ao T1, similar ao T4 e T5, e superior ao T2 e T3.

Observa-se na tabela 12, as correlações entre os valores de motilidade e vigor espermático, teste supravital e teste hiposmótico no sêmen pós-descongelado à 0 hora do TTR, de acordo com o tratamento.

Os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação alta e positiva com a motilidade espermática, em todos os tratamentos.

No T1, T4 e T5 houve correlação alta e positiva ($r = 0,63$; $r = 0,64$; $r = 0,71$; respectivamente) entre os valores registrados nos testes supravital e hiposmótico.

Os valores observados no teste hiposmótico e a motilidade espermática apresentaram correlação alta e positiva no T1 ($r = 0,78$) e T5 ($r = 0,65$) e correlação média e positiva no tratamento 4 ($r = 0,44$).

Embora os valores de correlações obtidas neste estudo entre os valores médios registrados nos testes supravital e hiposmótico com a motilidade espermática, o parâmetro motilidade espermática parece não ser isoladamente eficaz em prever a viabilidade espermática de sêmen congelado para uso em programa de inseminação artificial, sendo necessário uso de testes complementares para que possam aumentar a acurácia em prever a fertilidade do sêmen e as relações dos mesmos com a taxa de não-retorno ao estro. Tais observações se respaldam no presente estudo, onde os valores

médios obtidos nos testes complementares foram inferiores aos da motilidade espermática, indicando menor concentração de espermatozóides viáveis e com potencial fecundante presentes em uma dose empregada na inseminação artificial.

TABELA 12. Correlações Simples de Pearson entre as médias gerais nos testes supravital e hiposmótico, motilidade e vigor espermático do sêmen pós-descongelado às 0 hora do TTR, de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo.

T1					T2				
	MOT	VIG	SUPVIT	HOST		MOT	VIG	SUPVIT	HOST
MOT	1	0,55	0,71	0,78	MOT	1	0,58	0,81	NS
VIG		1	NS	NS	VIG		1	NS	NS
SUPVIT			1	0,63	SUPVIT			1	NS
HOST				1	HOST				1

T3					T4				
	MOT	VIG	SUPVIT	HOST		MOT	VIG	SUPVIT	HOST
MOT	1	0,65	0,66	NS	MOT	1	0,60	0,74	0,44
VIG		1	0,46	NS	VIG		1	0,37	0,40
SUPVIT			1	0,42	SUPVIT			1	0,64
HOST				1	HOST				1

T5				
	MOT	VIG	SUPVIT	HOST
MOT	1	0,54	0,71	0,65
VIG		1	0,37	0,55
SUPVIT			1	0,71
HOST				1

NS = não-significativo a $P > 0,05$; MOT = motilidade espermática progressiva; VIG = vigor espermático; SUPVIT = teste supravital; HOST = teste hiposmótico; T = tratamento.

A tabela 13 sumaria as correlações entre os valores médios no teste hiposmótico, teste supravital e motilidade espermática do sêmen *in natura* e a motilidade espermática do sêmen pós-descongelado dos tratamentos estudados, de acordo com o horário de avaliação no TTR (0 hora e 3 horas).

Tanto no momento do descongelamento (0 hora) quanto ao final do TTR (3 horas), o teste supravital e a motilidade espermática não apresentaram correlação com as motilidades espermáticas dos tratamentos deste estudo. Porém, no momento do descongelamento (0 hora), os valores médios observados no teste hiposmótico do sêmen *in natura* apresentaram correlação média e positiva com a motilidade espermática do T1 e T2 e correlação alta e positiva com a motilidade espermática do T5. Da mesma forma, às 3 horas de TTR, verificou-se correlação média e positiva com a motilidade espermática do T1, T4 e T5.

Por meio destes valores, pode-se inferir que o teste hiposmótico do sêmen *in natura* é uma ferramenta excelente e confiável (42 % de probabilidade de acerto) na

predição de uma determinada amostra de sêmen no que se refere a sua congelabilidade e manutenção da viabilidade após o TTR.

TABELA 13. Correlações simples de Pearson entre a média geral no teste hiposmótico, teste supravital e motilidade espermática do sêmen *in natura* e as médias gerais da motilidade espermática do sêmen pós-descongelado às 0 hora e 3 horas do TTR, de acordo com o tratamento, em bodes adultos criados em regime intensivo.

	MOT T1	MOT T2	MOT T3	MOT T4	MOT T5
Teste hiposmótico do sêmen <i>in natura</i>					
0 HORA	0,47	0,35	NS	NS	0,68
3 HORAS	0,42	NS	NS	0,48	0,51
Teste supravital do sêmen <i>in natura</i>					
0 HORA	NS	NS	NS	NS	NS
3 HORAS	0,37	NS	NS	NS	NS
Motilidade espermática do sêmen <i>in natura</i>					
0 HORA	NS	NS	NS	NS	NS
3 HORAS	NS	NS	NS	NS	NS

NS = não-significativo a $P > 0,05$; HOST IN = teste hiposmótico do sêmen *in natura*; TTR = teste de termo-resistência; MOT = motilidade espermática no TTR (pós-descongelamento); T = tratamentos.

5. CONCLUSÕES

- O ácido ascórbico manteve a integridade estrutural da membrana dos espermatozóides durante o processo de criopreservação, bem como sua viabilidade após o teste de termo-resistência, podendo ser uma alternativa na composição de diluentes para criopreservação de sêmen caprino;

- A própolis não se mostrou eficaz na manutenção da integridade e viabilidade espermática pós-descongelamento, mostrando ser tóxica aos espermatozóides nas concentrações de 0,25 e 0,5 %.

- O teste hiposmótico realizado no sêmen *in natura* se mostrou eficaz em prever a congelabilidade da amostra de sêmen, bem como, sua viabilidade ao final do teste de termo-resistência de três horas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa, **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p. 145-173, 1987.

AMANN, R.P; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O; VOSS, J.L. (ed.). **Equine reproduction**. Malvern: Lea e Febiger, 1993. p.715-745.

ASHIZAWA, K; OZAWA, Y; OKAUCHI, K. Comparative studies of elemental composition on ejaculated fowl, bull, rat, dog and boar spermatozoa by electron probe X-ray microanalysis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 2, p. 269-272, 1987.

AURICH, J.E.; SCHÖNER, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.

AZERÊDO, G.A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257- 263, 2001.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v. 56, p. 577-589, 2001.

BARBOSA, L.P. **Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina**. Viçosa, 1999. 71 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa.

BASNET, P.; MATSUNO, T.; NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from brazilian propolis. **Journal of Biosciences**, v. 52, n. 11-12, p. 828-833, 1997.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, 2002.

BILODEAU, J.F.; SUVRO-CHATTERJEE, B.; SIRARD, M.A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.

BILODEAU, J.F.; et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p.1105-1122, 2002.

BISPO, C. A. S. **Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado a 5 °C em função de curvas de resfriamento e diluidores**. Viçosa, 2005. 79 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa.

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

BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R.; SANTOS, A.D.F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.G. G.; VASCONCELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES, J.D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciências Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 213-218, 2005.

BLOMM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinariaer Medicin**, v. 25, p. 383-392, 1973.

BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. Viçosa, 2003. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa.

BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v. 47, p. 69-74, 1995.

CASAGRANDE, J.F.; PINHEIRO, L.E.L.; ALMEIDA, C.A. et al. Influência da motilidade e velocidade sobre a fertilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 31-35, 1979.

CHINOY, N.J.; BUCH-NEE, R.P.; MELITA, R.R. et al. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. **International Journal of Fertility**, v. 31, p. 232-239, 1986.

CHIRINÉA, V.H. Efeito do meio de congelamento sobre as características morfofuncionais do sêmen canino. Botucatu, 2004. 60 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A. et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 393-398, 1999.

CUNHA, I.C.N. Criopreservação do sêmen de cães. Botucatu, 2002. 149 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. **Experientia**, v. 52, p. 97- 100, 1996.

DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C.; POWEL, L.C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. **Fertility and Sterility**, v. 58, n. 5, p. 1034–1039, 1992.

DELL'AQUA JÚNIOR, J.A.; PAPA F.O. Efeito de diluente e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelamento de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 460-462, 2001.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicin Veterinary**, v. 4, p. 215-224, 1967.

DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkeys sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. **Poultry Science**, v. 76, p. 1440-1445, 1997.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, Goiânia, 2005. **Anais...** Goiânia-GO; CBRA, 2005. CD-ROM.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction*, v. 2, n. 2, p. 139-144, 2005.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; SANTOS, A.D.F.; ROVAY, H. et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, p. 436-438, 2001.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 71, p. 13-23, 2002.

FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**, v. 88, p. 11003-11006, 1992.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade**. Viçosa, 2002. 46 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G.; et al. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 56, p. 31-40, 2001.

GEVA, E.; BARTOOV, B.; ZABLUDOVSKY, N. et al. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. **Fertility and Sterility**, v. 66, p. 430-434, 1996.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. 340 p.

GONUL, B.; KAPLAN, B. Effects of vitamin C supplementation on plasma antioxidant status in unfed periods. **General Pharmacology**, v. 32, p. 195-199, 1999.

GONZALES, I.M.; SOARES, A.T.; GOMES, M.G.G.; SOUSA, W.H.. **Reprodução assistida em caprinos**. Paraíba: EMEPA-PB, 2002, 42 p.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: New York, 1999. 936 p.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 76, p. 84-97, 1957.

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

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

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

HOLT, WV; NORTH, RD. Determination of lipid components and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 73, n. 1, p. 285-294, 1985.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.

JONDET, R.; RABADEUX, Y. L'épreuve de thermorésistance dans l'appréciation de la valeur du sperm bovin congelé. **Elevage et Insemination**, n. 156, p. 13-19, 1976.

JONES, R.; MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 50, n. 2, p. 255-260, 1977.

KHALIFA, T.A.A.; EL-SAIDY, B.E. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 3-4, p. 303-315, 2005.

KOEHLER, J.K. Sperm membranes: Segregated domains of structure and function. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF BOAR SEMEN, 1, 1985. **Proceedings...** 1985. p. 37-60.

KRZYZOSIAK, J. et al. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 6, p. 251-261, 2000.

KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v. 46, p. 24-53, 2003.

LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. **Livestock Production Science**, v. 55, p. 193-203, 1998.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LEVINE, M; MORITA, K. Ascorbic acid in endocrine systems. **Vitamins and Hormones**, v. 42, p. 1-64, 1985.

LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R.A. Minireview: ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 2, p. 262-266, 1995.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1-2, p. 61-72, 1995.

MACK, S.R.; EVERINGHAM, J.; ZANEVELD, L.J.D. Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 240, n. 1, p. 125-136, 1986.

MARTINS, L.F. **Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça Parda Alpina**. Viçosa, 2001. 84 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa.

MASSANYL, L; JANISCH, R. Molecular organization of the plasma membrane in the post- acrosomal region of some farm animals. **Andrologia**, v. 25, n. 2, p. 83-87, 1993.

MATSUSHIGE, K.; KUSUMOTO, I.T.; YAMAMOTO, Y.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Quality evaluation of propolis I. A comparative study on radical scavenging effects of propolis and *Vespae Nidus*. **Journal of Traditional Medicines**, v. 12, p. 45-53, 1995.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 55-65, 1996.

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

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

MILLAR, J. Vitamin C: the primate fertility factor?. **Medical Hypotheses**, v. 38, p. 292–295, 1992.

MORENO, F.A.B.; BISPO, C.A.S.; GUERRA, M.M.P.; TENÓRIO FILHO, F.; OLIVEIRA, R.R.; ALVES, L.C.; WISCHARAL, A. Motilidade, vigor e dosagem de aspartato amino transferase no sêmen caprino diluído em leite desnatado e Fiser. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 460-462, 2001.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 399-420, 1999.

OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; REIS, G.R.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, L. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 69-74, 2005.

OLIVEIRA, R.R.; GUIMARÃES, J.D.; CHAVES, K.A.; CARVALHO, G.R.; MARTINS, L.F.; MESSAGE, D. Efeito da adição de própolis ao meio diluidor e suas influências nas características físicas do sêmen equino resfriado a 5 °C. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18, 2007, Viçosa. **Anais...** Viçosa-MG: UFV, 2007. CD-ROM.

PALHÃO, M. P. **Avaliação do sêmen caprino diluído em citrato-gema, resfriado e armazenado a 5 °C por 24 horas**. Viçosa, 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa.

PARKS, J.E; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209- 222, 1992.

PARKS, J.E; MEACHAM, T.N; SAACKE, R.G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES- buffered diluent for evaluating the effect of egg yolk lipoproteins on sperm cholesterol and phospholipids. **Biology of Reproduction**, v. 24, n. 2, p. 393- 398, 1981.

PEREIRA, S.A.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, 2002.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S. After vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666 , 1949.

RATH, L.C.; TARNEJA, R.; SINGH, M.S. Effect of cryopreservation on semen sample. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 60, p. 42-44, 2004.

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

ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempo de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozóides de caprinos**. Viçosa, 2006. 56 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa.

RUSSO, N.T.; TRONCOSO, N.; SANCHEZ, F.; GARBARINO, J.A.; VANELLA, A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo-alfa-pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sciences*, v. 78, p. 1401-1406, 2006.

S.A.E.G. (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2007 (Versão 9.1).

SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEF, M.I. et al. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B1. **Toxicology**, v. 162, p. 209-218, 2001.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; et al. 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.

SFORCIN, J.M.; NOVELLI, E.L.B.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of brazilian propolis on seric biochemical variables. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 244-254, 2002.

SMITH, C. Use of embryo transfer in genetic improvements of sheep. **Animal Production**, v. 42, p. 81-88, 1986.

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.

SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. et al. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterona levels of male Wistar rats. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 2063-2072, 2005.

SOUSA, J.P.F., BARBAS, J.P., FERREIRA, G.M.B.C., HORTA, A.E.M. Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA - "PROGRESSOS ZOOTÉCNICOS NOS PAÍSES DE LÍNGUA PORTUGUESA", 10, 2000, Vale de Santarém. **Anais...** Vale de Santarém, 2000. p. 87.

SOUSA, W. H.; LEITE, R. M. H.; LEITE, P. R. de M. **Raça Boer: Caprino tipo carne**. João Pessoa: EMEPA-PB, 1997. 30 p.

SOUSA, W.H. O agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 51-58, 2007.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins-Colorado: Animal

Reproduction and Biotechnology Laboratory – College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences – Colorado State University, 1999. 82 p.

SUN F.; HAYAMI S.; HARUNA S.; OGIRI Y. et al. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and vitamin E and the level of lipid hydroperoxides in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1462-1465, 2002.

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

THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J. et al. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma : determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, p. 110-155, 1995.

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. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 135-140, 1996.

WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4 p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**, v. 46, p. 559-578, 1996.

YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effects of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 99-111, 2003.

ZALATA, A.A.; DEPUYDT, C.E. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 154-162, 1998.

APÊNDICE

APÊNDICE A

TABELA 1A. Médias e desvios-padrão da motilidade e vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e no teste supravital, teste hiposmótico, motilidade e vigor espermático pós-descongelamento em bodes adultos, criados em regime intensivo.

BODE	TRATAMENTO	MOT DIL*	MOT 0H	MOT 1 H	MOT 2 H	MOT 3 H	SUPVIT 0 H	HOST 0 H*
53	1	83,0 ± 8,3 ^a	42,0 ± 18,9 ^a	39,0 ± 19,1 ^a	36,0 ± 17,8 ^a	31,0 ± 16,7 ^a	28,6 ± 16,2 ^a	23,8 ± 8,9 ^a
	2	82,0 ± 7,5 ^a	9,8 ± 2,2 ^{ac}	7,6 ± 3,3 ^{ac}	2,0 ± 17,8 ^{ac}	0 ^{bc}	2,8 ± 2,9 ^{bc}	13,2 ± 8,2 ^a
	3	82,0 ± 4,4 ^a	4,0 ± 2,2 ^{bcd}	2,6 ± 2,5 ^{bcd}	0 ^{bcd}	0 ^{bcd}	3,4 ± 2,0 ^{ace}	14,60 ± 6,4 ^a
	4	85,0 ± 3,5 ^a	49,0 ± 10,8 ^{acef}	40,0 ± 10,6 ^{acef}	29,0 ± 16,7 ^{acde}	11,0 ± 12,4 ^{acde}	32,6 ± 8,4 ^{adfg}	30,2 ± 12,1 ^a
	5	85,0 ± 6,1 ^a	39,0 ± 16,7 ^{acef}	34,0 ± 15,9 ^{acef}	27,0 ± 18,5 ^{acde}	12,0 ± 16,4 ^{acde}	23,4 ± 10,0 ^{aceg}	25,8 ± 11,5 ^a
58	1	82,0 ± 5,7 ^a	42,0 ± 13,0 ^a	40,0 ± 13,6 ^a	36,0 ± 15,1 ^a	30,0 ± 10,0 ^a	25,8 ± 7,8 ^a	24,4 ± 10,1 ^{ab}
	2	80,0 ± 5,0 ^a	14,0 ± 13,4 ^{ac}	8,0 ± 13,6 ^{ac}	3,0 ± 4,4 ^{ac}	0 ^{bc}	3,8 ± 3,9 ^{ac}	12,6 ± 6,5 ^b
	3	78,0 ± 5,7 ^a	1,6 ± 2,3 ^{bcd}	0 ^{bcd}	0 ^{bce}	0 ^{bcd}	0 ^{bcd}	9,4 ± 4,5 ^b
	4	80,0 ± 7,0 ^a	32,0 ± 7,5 ^{acdf}	30,0 ± 7,9 ^{acdf}	28,0 ± 9,7 ^{aceg}	17,0 ± 10,9 ^{acde}	15,8 ± 5,4 ^{acdf}	26,2 ± 9,5 ^{ab}
	5	77,0 ± 5,7 ^a	43,0 ± 15,6 ^{acef}	40,0 ± 16,5 ^{acef}	38,0 ± 14,4 ^{adfg}	24,0 ± 13,4 ^{acde}	31,0 ± 15,4 ^{acef}	3,4 ± 11,9 ^a
59	1	80,0 ± 6,12 ^a	36,0 ± 19,4 ^a	31,0 ± 14,5 ^a	28,0 ± 17,1 ^a	25,0 ± 15,4 ^a	17,6 ± 6,6 ^a	19,2 ± 7,8 ^a
	2	78,0 ± 7,5 ^a	7,0 ± 5,7 ^{ac}	5,2 ± 5,7 ^{ac}	3,0 ± 4,4 ^{ac}	1,0 ± 2,2 ^{ac}	2,4 ± 1,8 ^{ac}	9,8 ± 4,8 ^a
	3	82,0 ± 5,7 ^a	2,0 ± 2,7 ^{bcd}	1,0 ± 2,2 ^{bcd}	0 ^{bcd}	0 ^{bcd}	0,4 ± 0,8 ^{bcd}	6,2 ± 2,7 ^a
	4	79,0 ± 4,1 ^a	35,0 ± 23,1 ^{acef}	30,0 ± 20,9 ^{acef}	28,0 ± 21,3 ^{acef}	17,2 ± 16,1 ^{acde}	17,6 ± 12,6 ^{acef}	18,4 ± 8,2 ^a
	5	79,0 ± 5,4 ^a	32,0 ± 19,5 ^{acef}	26,0 ± 18,17 ^{acef}	22,0 ± 18,9 ^{acdf}	7,4 ± 12,8 ^{acde}	9,6 ± 9,5 ^{acdf}	18,4 ± 9,21 ^a
60	1	88,0 ± 4,4 ^a	53,0 ± 15,6 ^a	50,0 ± 12,7 ^a	46,0 ± 11,9 ^a	40,0 ± 9,3 ^a	28,4 ± 6,1 ^a	29,2 ± 8,5 ^a
	2	87,0 ± 5,7 ^a	16,0 ± 13,8 ^{ac}	15,0 ± 14,1 ^{ac}	8,0 ± 7,5 ^{ac}	3,0 ± 2,7 ^{bc}	9,8 ± 12,6 ^{ab}	13,2 ± 4,3 ^b
	3	84,0 ± 6,5 ^a	7,6 ± 6,9 ^{bcd}	4,0 ± 6,5 ^{bcd}	2,0 ± 2,7 ^{bcd}	0 ^{bcd}	3,4 ± 4,9 ^{abc}	13,4 ± 5,2 ^b
	4	87,0 ± 5,7 ^a	42,0 ± 13,5 ^{acdf}	41,0 ± 14,7 ^{acdf}	38,0 ± 12,5 ^{acdf}	29,0 ± 8,2 ^{acef}	33,8 ± 13,4 ^{abde}	32,2 ± 11,3 ^a
	5	86,0 ± 4,1 ^a	52,0 ± 13,5 ^{acef}	50,0 ± 10,6 ^{acef}	42,0 ± 15,6 ^{acef}	26,0 ± 12,4 ^{acdf}	30,0 ± 17,2 ^{abce}	26,4 ± 9,0 ^{ab}
62	1	85,0 ± 5,0 ^a	36,0 ± 12,9 ^a	32,0 ± 10,3 ^a	31,0 ± 8,9 ^a	27,0 ± 6,7 ^a	17,4 ± 5,0 ^a	18,2 ± 5,4 ^a
	2	89,0 ± 2,2 ^a	7,0 ± 2,7 ^{ac}	6,0 ± 2,2 ^{ac}	4,0 ± 4,1 ^{bc}	1,0 ± 2,2 ^{bc}	4,2 ± 1,3 ^{ac}	11,0 ± 4,1 ^{ab}
	3	87,0 ± 2,7 ^a	3,8 ± 2,1 ^{bcd}	3,0 ± 2,7 ^{bcd}	0,4 ± 0,8 ^{bcd}	0 ^{bcd}	3,6 ± 4,9 ^{bcd}	6,8 ± 4,2 ^b
	4	87,0 ± 2,7 ^a	33,0 ± 8,3 ^{acef}	31,0 ± 7,4 ^{acef}	25,0 ± 7,0 ^{acef}	17,0 ± 10,9 ^{acde}	14,4 ± 7,8 ^{acde}	18,2 ± 3,4 ^a
	5	86,0 ± 4,1 ^a	36,0 ± 18,1 ^{acef}	25,0 ± 14,1 ^{acdf}	21,0 ± 13,8 ^{acdf}	11,0 ± 8,2 ^{acde}	16,2 ± 7,9 ^{acde}	17,8 ± 7,5 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Kruskal Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5 %; T = tratamentos; MOT DIL = motilidade espermática do sêmen diluído em %; MOT = motilidade espermática do sêmen pós-descongelado em %; VIG DIL = vigor espermático do sêmen diluído (0 – 5); VIG = vigor espermático do sêmen pós-descongelado (0 – 5); SUPVIT = teste supravital em %; HOST = teste hiposmótico em %; H = hora.

TABELA 2A. Médias e desvios-padrão do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) e pós-descongelamento de acordo com o tratamento, em bodes adultos, criados em regime intensivo.

BODE	TRATAMENTO	VIG DIL*	VIG 0 H	VIG 1 H	VIG 2 H	VIG 3 H
53	1	3,8 ± 0,4 ^a	3,6 ± 0,5 ^a	3,5 ± 0,6 ^a	3,1 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,6 ^a
	2	3,7 ± 0,2 ^a	2,5 ± 0,9 ^{ac}	2,1 ± 0,6 ^{ac}	0,4 ± 0,5 ^{bc}	0 ^{bc}
	3	3,8 ± 0,2 ^a	1,7 ± 1,2 ^{bcd}	1,0 ± 1,0 ^{bcd}	0 ^{bcd}	0 ^{bcd}
	4	4,3 ± 0,2 ^a	3,6 ± 0,4 ^{acef}	3,6 ± 0,4 ^{acef}	2,4 ± 0,8 ^{acde}	1,0 ± 1,0 ^{acde}
	5	4,1 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,4 ^{acdf}	3,1 ± 0,6 ^{acdf}	2,2 ± 1,4 ^{acde}	1,1 ± 1,1 ^{acde}
58	1	3,7 ± 0,4 ^a	3,4 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,5 ^a
	2	3,9 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,7 ^{ab}	1,1 ± 1,5 ^{ab}	0,5 ± 0,7 ^{bc}	0 ^{ac}
	3	3,8 ± 0,2 ^a	1,0 ± 1,4 ^{abc}	0 ^{abc}	0 ^{bcd}	0 ^{bcd}
	4	4,1 ± 0,4 ^a	3,6 ± 0,5 ^{abde}	3,4 ± 0,6 ^{abde}	3,1 ± 0,6 ^{acef}	2,0 ± 1,4 ^{acde}
	5	4,0 ± 0,3 ^a	3,7 ± 0,5 ^{abde}	3,6 ± 0,4 ^{abde}	3,0 ± 0,6 ^{acdf}	2,1 ± 1,0 ^{acde}
59	1	3,8 ± 0,4 ^a	3,6 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,4 ^a	3,3 ± 0,5 ^a	2,8 ± 1,0 ^a
	2	4,0 ± 0,5 ^a	2,2 ± 1,3 ^{ac}	2,2 ± 1,3 ^{ac}	0,9 ± 1,2 ^{ac}	0,3 ± 0,6 ^{ac}
	3	3,7 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,9 ^{bcd}	0,3 ± 0,6 ^{bcd}	0 ^{bcd}	0 ^{bcd}
	4	3,9 ± 0,6 ^a	3,5 ± 0,7 ^{acef}	3,3 ± 0,7 ^{acef}	2,5 ± 1,4 ^{acde}	1,6 ± 1,5 ^{acde}
	5	3,8 ± 0,5 ^a	3,6 ± 0,4 ^{acef}	3,0 ± 0,3 ^{acdf}	2,3 ± 1,0 ^{acde}	0,9 ± 1,0 ^{acde}
60	1	4,2 ± 0,5 ^a	3,6 ± 0,2 ^a	3,6 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,2 ^a
	2	4,1 ± 0,5 ^a	2,7 ± 0,4 ^{ac}	2,7 ± 0,4 ^{ac}	1,5 ± 0,8 ^{ac}	0,9 ± 0,8 ^{bc}
	3	4,0 ± 0,6 ^a	2,0 ± 1,2 ^{bcd}	0,8 ± 1,1 ^{bcd}	0,3 ± 0,4 ^{bcd}	0 ^{bcd}
	4	4,4 ± 0,4 ^a	3,6 ± 0,2 ^{acef}	3,5 ± 0,3 ^{acef}	3,2 ± 0,4 ^{acef}	2,5 ± 0,3 ^{acde}
	5	4,3 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,3 ^{acdf}	3,3 ± 0,2 ^{acdf}	3,0 ± 0,6 ^{acef}	2,2 ± 0,8 ^{acde}
62	1	3,6 ± 0,2 ^a	3,5 ± 0,3 ^{a*}	3,3 ± 0,4 ^a	3,2 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,2 ^a
	2	3,7 ± 0,2 ^a	2,2 ± 0,4 ^{a*}	2,0 ± 0 ^{ac}	1,1 ± 1,0 ^{bc}	0,2 ± 0,4 ^{bc}
	3	3,9 ± 0,2 ^a	1,9 ± 1,4 ^{a*}	1,0 ± 1,0 ^{bcd}	0,2 ± 0,4 ^{bcd}	0 ^{bcd}
	4	4,2 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,2 ^{a*}	3,2 ± 0,2 ^{acef}	2,9 ± 0,4 ^{acef}	2,3 ± 0,4 ^{acde}
	5	4,0 ± 0,3 ^a	3,4 ± 0,4 ^{a*}	3,0 ± 0,3 ^{acdf}	2,7 ± 0,4 ^{acdf}	1,7 ± 1,2 ^{acde}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5 %; VIG DIL = vigor espermático do sêmen diluído (0 – 5); VIG = vigor espermático do sêmen pós-descongelado (0 – 5); H = hora.