

UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL COM ÊNFASE EM
PRODUTOS BIOATIVOS

JOÃO PEDRO TERRA PRADO BORGES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa*) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-
CONGELAMENTO**

Umuarama
2025

JOÃO PEDRO TERRA PRADO BORGES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa*) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-
CONGELAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal com área de concentração em Saúde Única.

Orientação: Prof. Dr. Ranulfo Piau Junior

Umuarama
2025

Ficha Catalográfica

B732a Borges, João Pedro Terra Prado.

Avaliação da ação do extrato aquoso da polpa do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) na viabilidade do sêmen bovino pós-congelamento / João Pedro Terra Prado Borges. – Umuarama: Universidade Paranaense – UNIPAR, 2025.

59 f.

Orientador: Dr. Ranulfo Piau Júnior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense – UNIPAR.

1. Bioativos. 2. Criopreservação. 3. Extrato vegetal. 4. Reprodução animal. I. Universidade Paranaense – UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 636.2

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Reprodução Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense e na Unidade de Umuarama da Universidade Paranaense como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos – Área de Concentração Saúde Única, sob orientação do Prof. Dr. Ranulfo Piau Junior.

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa*) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-
CONGELAMENTO**

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionadas:

1 CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

2 CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

JOÃO PEDRO TERRA PRADO BORGES

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa*) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-
CONGELAMENTO**

Trabalho de conclusão do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos aprovado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos pela Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

Dr. Ranulfo Piau Junior

Doutor em biomedicina – Universidad de León - Espanha

Docente da Universidade Paranaense - UNIPAR (orientador)

Dr. André Giarola Boscarato

Doutor em Ciência Animal – Universidade Paranaense - UNIPAR

Docente da Universidade Paranaense – UNIPAR (banca interna)

Dra. Camila Bizarro da Silva

Doutora em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina

Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC-PR (banca externa)

Umuarama, 27 de agosto de 2025.

AGRADECIMENTOS

Com os primeiros agradecimentos apontados a Deus, por possibilitar esta trajetória e nos guiar e iluminar com o Espírito Santo e Seus Anjos e Santos, gostaria de agradecer a todos os envolvidos neste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos professores que me ajudaram e compartilharam seus conhecimentos com muita atenção e humildade, especialmente ao meu orientador Prof. Ranulfo Piau Junior, meu Co-orientador Prof. Denis Vinicius Bonato, Prof. André Giarola Boscarato e Profa. Zilda Cristiani Gazim.

Agradeço a Unipar e todo seu corpo docente pelo apoio, prestatividade e infraestrutura.

Meus agradecimentos aos colaboradores da Faz. Guarauna e do grupo agropecuário Zafaneli Silveira, em especial Edemilson Barros e Família.

Agradeço a minha Família por estarem sempre ao meu lado, me dando a oportunidade de continuar sonhando e realizando, sendo exemplo de dedicação e caráter.

Também agradeço aos meus colegas universitários e pós-graduandos, que tornaram possível a realização deste estudo com seu tempo e dedicação, especialmente Selma, Gregório e Letícia.

“E tudo quanto pedirem em oração, se crerem, vocês receberão”. (Mateus 21.22).

BORGES, João Pedro Terra Prado. **Avaliação da ação do extrato aquoso da polpa do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) na viabilidade do sêmen bovino pós-congelamento**. Orientador: Ranulfo Piau Junior. 2025. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2025.

Resumo

A criopreservação de sêmen é uma das ferramentas da reprodução animal, sendo fundamental no cenário atual da pecuária. Apesar de sua capacidade de conservação, sabe-se que este processo também impacta negativamente a integridade dos espermatozoides, devido às mudanças drásticas de temperatura e manipulação, dessa forma o objetivo de pesquisas e inovações tecnológicas é minimizar tais impactos e conferir melhores condições de preservação. Com isso, são continuamente desenvolvidas formas de atenuar os efeitos prejudiciais da congelação e da degradação natural, como a formulação de diluentes crioprotetores. Este trabalho objetivou avaliar a capacidade do extrato aquoso de polpa de Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) de conferir proteção antioxidante ao sêmen bovino, quando adicionado ao diluente comercial previamente ao processo de congelação. O estudo comparou de forma inédita a qualidade do sêmen congelado em diluente comercial Botubov® em sua fórmula padrão, com grupos contendo diferentes concentrações do extrato aquoso da polpa de Jatobá adicionado ao diluente. Foram utilizados 5 touros da raça Nelore, com idade média de 5 anos. Para o estudo foram obtidos dois ejaculados de cada um dos cinco touros, no intervalo de uma semana cada coleta, pelo método de eletroejaculação, totalizando dez partidas de sêmen criopreservadas. Os ejaculados foram divididos em 3 grupos: grupo controle (C): ejaculado diluído em meio comercial, grupo 1 ejaculado diluído em meio comercial acrescido com 0,5% de extrato aquoso da polpa do jatobá, grupo 2 ejaculado diluído em meio comercial acrescido com 1% de extrato aquoso da polpa do jatobá. As amostras foram diluídas numa concentração de 100 milhões/mL e posteriormente acondicionadas em palhetas de 0,5 mL. O congelamento das amostras teve início com o resfriamento, onde as palhetas foram mantidas por 4 horas a 5°C e posteriormente, mantidas por 20 minutos em vapor de nitrogênio líquido (N2L) em caixa isotérmica e em seguida, mergulhadas em N2L e armazenadas em botijão criogênico. Para as análises pós-descongelação, as palhetas foram descongeladas a 36°C por 20 segundos. Foram avaliados os parâmetros de cinética e cinemática espermática pelo sistema computadorizado (CASA - Computer-Assisted Semen Analysis). Com relação a cinética espermática da primeira coleta os resultados da motilidade total (%), motilidade progressiva (%), motilidade rápida foram estatisticamente superiores no grupo controle em relação ao grupo com 1% de extrato aquoso de polpa de jatobá e não diferiu do grupo com 0,5% de extrato. Não se observou

diferença significativa entre os grupos na motilidade lenta (%), motilidade circular (%) e motilidade local (%). Os espermatozoides imóveis foram menores no grupo controle quando comparado com o grupo com 1% de extrato. Na segunda coleta não se observou diferenças significativas entre os grupos com relação às motilidades: total, progressiva, rápida, lenta e local. A motilidade circular foi maior no grupo controle e os espermatozoides imóveis foram menores no grupo com 1% de extrato de jatobá. Com relação a cinemática espermática da primeira e segunda coleta não se observou diferenças significativas entre os grupos. Contudo, o presente estudo revelou que a adição da polpa de extrato de jatobá a 0,5 e 1% não melhorou os parâmetros de cinética espermática. O extrato de jatobá a 1% diminuiu os valores de motilidade total progressiva, motilidade rápida e aumento do percentual de espermatozoides imóveis. Ressalta-se, no entanto, a necessidade de novos estudos utilizando novas concentrações do extrato, novos métodos de integração e diluentes diferentes.

Palavras-chave: Bioativos. Criopreservação. Extrato vegetal. Reprodução animal.

BORGES, João Pedro Terra Prado. **Evaluation of the action of the aqueous extract of jatobá pulp (*Hymenaea stigonocarpa*) on the viability of post-freezing bovine semen.** Advisor: Ranulfo Piau Junior. 2025. 61f. Dissertation (Master's in Animal Science with Emphasis on Bioactive Products) - Universidade Paranaense, Umuarama, 2024.

Abstract

Semen cryopreservation is one of the tools used in animal reproduction and is essential in the current livestock industry. Despite its preservation capabilities, this process also negatively impacts sperm integrity due to drastic changes in temperature and handling. Therefore, research and technological innovations aim to minimize these impacts and provide better preservation conditions. Therefore, new approaches to mitigate the harmful effects of freezing and natural degradation are continually being developed, such as the formulation of cryoprotective extenders. This study aimed to evaluate the ability of aqueous extract of Jatobá pulp (*Hymenaea stigonocarpa*) to provide antioxidant protection to bovine semen when added to a commercial extender prior to the freezing process. The study compared, for the first time ever, the quality of semen frozen in Botubov® commercial extender, using its standard formula, with groups containing different concentrations of aqueous extract of Jatobá pulp added to the extender. Five Nelore bulls with an average age of 5 years were used. Two ejaculates from each of the five bulls were obtained one week apart by electroejaculation, totaling ten cryopreserved semen batches. The ejaculates were divided into three groups: control group (C): ejaculate diluted in commercial medium; group 1: ejaculate diluted in commercial medium supplemented with 0.5% aqueous extract of jatobá pulp; and group 2: ejaculate diluted in commercial medium supplemented with 1% aqueous extract of jatobá pulp. The samples were diluted to a concentration of 100 million/mL and subsequently stored in 0.5 mL straws. Sample freezing began with cooling, where the straws were kept for 4 hours at 5°C and subsequently kept for 20 minutes in liquid nitrogen vapor (N₂L) in an isothermal box, then immersed in N₂L and stored in a cryogenic cylinder. For post-thawing analyses, the straws were thawed at 36°C for 20 seconds. Sperm kinetics and kinematics parameters were evaluated by the computerized system (CASA - Computer-Assisted Semen Analysis). Regarding sperm kinetics of the first collection, the results of total motility (%), progressive motility (%), and fast motility were statistically higher in the control group compared to the group with 1% aqueous extract of jatobá pulp and did not differ from the group with 0.5% extract. No significant differences were observed between the groups in slow motility (%), circular motility (%), and local motility (%). Nonmotile sperm were smaller in the control group compared with the 1% extract group. In the

second collection, no significant differences were observed between the groups regarding total, progressive, rapid, slow, and local motility. Circular motility was greater in the control group, and nonmotile sperm were smaller in the 1% jatobá extract group. Regarding sperm kinematics, no significant differences were observed between the groups in the first and second collections. The present study revealed that the addition of 0.5% and 1% jatobá extract pulp did not improve sperm kinetic parameters. The 1% jatobá extract decreased total progressive motility, rapid motility, and increased the percentage of nonmotile sperm. However, the need for further studies using new extract concentrations, new integration methods, and different diluents is emphasized.

Keywords: Animal Reproduction. Bioactive. Cytoprotective. Plant extract.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - ARTIGO

Artigo 1 - AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ (*Hymenaea stigonocarpa*) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-CONGELAMENTO

Tabela 1 – A atividade antioxidante do extrato aquoso de jatobá foi verificada pelo sistema e co-oxidação β -caroteno betacaroteno/ácido linoleico do extrato.

Tabela 2 – A avaliação do sêmen (volume, motilidade, vigor e turbilhonamento) da primeira coleta utilizando o aparelho Androscope CASA system 12500/3000, minitube.

Tabela 3 – A avaliação do sêmen (volume, motilidade, vigor e turbilhonamento) da segunda coleta utilizando o aparelho Androscope CASA system 12500/3000, minitube.

Tabela 4.- Média e respectivos erros padrão das variáveis relacionadas com a cinética espermática das amostras de sêmen criopreservadas com adição de extrato de Jatobá, dívida entre a primeira e segunda coleta de sêmen.

Tabela 5. Médias e respectivos erros padrão das variáveis relacionadas com a cinemática espermática das amostras de sêmen criopreservadas com adição de extrato de Jatobá.

LISTA DE SIGLAS

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

COPG Coordenadoria de Pós-Graduação

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Introdução.....	18
1.2 Revisão da literatura	19
1.2.1 Célula espermática	20
1.2.2 Plasma seminal	21
1.2.3 Criopreservação	22
1.2.4 Diluição.....	24
1.2.5 Peroxidação lipídica	25
1.2.6 Atividade antioxidante dos espermatozoides criopreservados	26
1.2.7 Potencial antioxidante de extratos de frutos da flora brasileira.....	27
1.2.8 Atividades biológicas) do Extrato de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>.....	28
1.3 Conclusão.....	29
1.4 Referencias.....	29
1.5 Objetivo.....	35
2 CAPÍTULO 2- ARTIGO.....	36
2.1 ARTIGO 1- AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ (<i>Hymenaea stigonocarpa</i>) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-CONGELAMENTO	37
Resumo	37
Abstract	38
Introdução.....	39

Materiais e Métodos.....	40
Resultados e Discussão.....	44
Conclusão	49
Referências	50
3.CONCLUSÃO.....	52
ANEXOS.....	53
ANEXO 1 - Normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	54
ANEXO 2 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEA)	59

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO E O USO DE BIOATIVOS COMO ANTIOXIDANTES

O capítulo 1 foi editado de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT.

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO E O USO DE BIOATIVOS COMO ANTIOXIDANTES

Resumo

A criopreservação de sêmen é uma importante biotecnologia da reprodução animal, sendo fundamental para a pecuária atual, esta técnica mantém as células sob temperaturas criogênicas, inibindo ou reduzindo o efeito de processos degradantes ocorrentes em temperatura ambiente, como a oxidação, preservando os espermatozoides e seu potencial de fecundação. Apesar de sua capacidade de conservação, sabe-se que a criopreservação também impacta negativamente a integridade dos espermatozoides, através das mudanças drásticas de temperatura e manipulação, dessa forma o objetivo de pesquisas e inovações tecnológicas é minimizar tais impactos e conferir melhores condições de preservação, almejando alcançar níveis de qualidade próximos aos do sêmen *in natura*. Com isso, são continuamente desenvolvidas formas de atenuar os efeitos prejudiciais da congelação e da degradação natural, como métodos de resfriamento e congelamento, técnicas de manipulação e formulações de diluentes crioprotetores. Este trabalho objetiva reunir as principais informações para a compreensão básica do processo e do estado da arte da criopreservação de sêmen bovino e a importância de estudos relacionados aos efeitos nocivos aos espermatozoides provocados por esta técnica, sobretudo quanto ao estresse oxidativo e a possibilidade de incorporação de bioativos aos diluidores. Espera-se que seja possível a utilização de extratos naturais, em especial de espécies nativas do Brasil, como a *Hymenaea stigonocarpa* de forma inédita, e que estes possam melhorar a qualidade espermática do sêmen pós-congelamento e refrigeração, atuando principalmente como atenuadores do processo oxidativo.

Palavras-chave: Congelamento; espermatozoides; extrato vegetal; produtos bioativos; Reprodução animal.

Abstract

Semen cryopreservation is an important biotechnology for animal reproduction and is fundamental to modern livestock farming. This technique maintains cells at cryogenic temperatures, inhibiting or reducing the effects of degrading processes that occur at room temperature, such as oxidation, thus preserving sperm and their fertilization potential. Despite its preservation capabilities, cryopreservation also negatively impacts sperm integrity through drastic changes in temperature and handling. Therefore, the goal of research and technological innovation is to minimize these impacts and provide better preservation conditions, aiming to achieve quality levels close to those of raw semen. Therefore, ways to mitigate the harmful effects of freezing and natural degradation are continually being developed, such as cooling and freezing methods, handling techniques, and cryoprotective diluent formulations. This work aims to gather key information for a basic understanding of the process and state-of-the-art of bovine semen cryopreservation and the importance of studies related to the harmful effects of this technique on sperm, particularly regarding oxidative stress and the possibility of incorporating bioactives into extenders. It is hoped that it will be possible to use natural extracts, especially from species native to Brazil, such as *Hymenaea stigonocarpa*, in an unprecedented way, and that these extracts may improve sperm quality after freezing and refrigeration, primarily by mitigating the oxidative process.

Keywords: Freezing; sperm; plant extract; bioactive products; animal reproduction.

1.1 Introdução

Com o passar do tempo e a evolução científica, só aumentam as situações que justificam, possibilitam ou necessitam de biotecnologias de reprodução, especialmente a inseminação artificial (IA). Atualmente esta técnica é amplamente difundida no âmbito da pecuária, impulsionada pela necessidade de melhoramento genético e otimização de processos produtivos, principalmente para satisfazer as demandas do grande avanço no setor de exportação (Alves, Contini, Gasques, *et al.*, 2008). O incremento no uso da IA muito se deu pelo desenvolvimento de tecnologias como o método de inseminação artificial em tempo fixo, caracterizado pela mimetização da endocrinologia reprodutiva, utilizando fármacos exógenos para a sincronização do estro e/ou da ovulação, e formas cada vez mais eficazes de manutenção da qualidade do sêmen bovino criopreservado (ASBIA, 2021).

Desde 1678, quando espermatozoides foram descritos pela primeira vez pelo holandês Antoni van Leeuwenhoek, cientistas de diversas áreas de atuação contribuíram para a história da inseminação artificial (Ombelet; Van Robays, 2015). Sua primeira aplicação bem-sucedida e descrita na literatura foi realizada em 1784 pelo sacerdote católico e fisiologista italiano Lazzaro Spallanzani (Spallanzani, 1789), a quem também se atribui a autoria da primeira descrição dos efeitos do resfriamento do sêmen em espermatozoides, ao arrefecer sêmen humano à temperatura da neve e relatar a seção dos movimentos das células espermáticas (Ombelet; Van Robays, 2015). Sendo a criopreservação (preservação pelo frio) o principal método de conservação de sêmen até os dias atuais (Grotter *et al.*, 2019), pesquisas como esta, relacionadas à interação entre refrigeração e a viabilidade espermática, viriam a ser replicadas, em diferentes níveis de complexidade, por toda a história da técnica.

A criopreservação mantém as células sob temperaturas criogênicas, inibindo ou reduzindo o efeito de processos degradantes ocorrentes em temperatura ambiente, como a oxidação (Treulen *et al.*, 2018). No entanto, o congelamento ou refrigeração do sêmen resulta em alterações permanentes nas estruturas das membranas, na integridade do DNA e na cinética espermática (Celeghini *et al.*, 2008; Amidi *et al.*, 2016). Tais alterações são determinantes para a capacidade de fertilização do sêmen e podem estar relacionadas ao estresse osmótico, formação de cristais intracelulares ou à liberação de radicais livres (Grotter *et al.*, 2019).

Por conseguinte, para a proteção das células, são utilizados meios diluentes compostos por diferentes substâncias protetoras relacionadas a cada um dos possíveis efeitos deletérios da criopreservação (Pinto *et al.*, 2020; Whaley *et al.*, 2021). Por exemplo, a gema de ovo, através da ação de moléculas de alto peso molecular, tem capacidade de preservar os espermatozoides

do choque térmico; frutose e glicose são adicionados para atuar como provedores de energia e o glicerol é uma importante salvaguarda contra alterações intracelulares (Oliveira *et al.*, 2018). É importante frisar que, apesar dos estudos e avanços na composição de tais diluidores e de métodos de manipulação e congelamento, a ciência ainda não foi capaz de alcançar com o sêmen criopreservado resultados de qualidade e fertilidade equivalentes aos do sêmen *in natura* (Watson, 2000; Bailey *et al.* 2003; Nagy *et al.*, 2004; Tatone *et al.* 2010).

Entre os fatores que afetam a viabilidade espermática do sêmen, está o processo oxidativo. Neste contexto, há a hipótese de que a formação de radicais livres, fator primordial para a oxidação, pode ser aumentada pelas mudanças de temperatura. Isso ocorre principalmente a partir das respostas metabólicas de recuperação dos espermatozoides após o descongelamento do sêmen, danificando funções vitais das células espermáticas, sobretudo na integridade da membrana plasmática. Apesar da presença de citoprotetores e antioxidantes naturais no plasma seminal, estes não são eficazes para conferir resistência suficiente às células diante de situações extremas como a etapa de descongelamento e a exposição à temperatura ambiente (Nordberg e Árner, 2001; Pegg, 2002; Tatone *et al.*, 2010).

À luz do exposto, o presente trabalho tem o objetivo de reunir as principais informações para a compreensão básica do processo e do estado da arte da criopreservação de sêmen bovino e a importância de estudos relacionados aos efeitos nocivos aos espermatozoides provocados por esta técnica, sobretudo quanto ao estresse oxidativo e a possibilidade de incorporação de bioativos aos diluentes.

1.2 Revisão da literatura

A criopreservação de sêmen bovino é um procedimento fundamental na reprodução animal, mas está associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos significativos aos espermatozoides. Esses danos estão relacionados à infertilidade e à diminuição da qualidade espermática (Lustosa *et al.*, 2025). Na conservação seminal é necessária a utilização de diluentes que forneçam nutrientes e protejam as células espermáticas contra o choque térmico. Os aditivos de origem animal, como a gema de ovo e o leite, amplamente empregados na preservação do sêmen, representam um risco potencial de contaminação (Santos *et al.*, 2018).

Entre os fatores que afetam a viabilidade espermática do sêmen, está o processo oxidativo. Neste contexto, há a hipótese de que a formação de radicais livres, fator primordial para a oxidação, pode ser aumentada pelas mudanças de temperatura. Isso ocorre

principalmente a partir das respostas metabólicas de recuperação dos espermatozoides após o descongelamento do sêmen, danificando funções vitais das células espermáticas, sobretudo na integridade da membrana plasmática. Apesar da presença de citoprotetores e antioxidantes naturais no plasma seminal, estes não são eficazes para conferir resistência suficiente às células diante de situações extremas como a etapa de descongelamento e a exposição à temperatura ambiente (Nordberg; Árner, 2001; Pegg, 2002; Tatone *et al.* 2010). Com o intuito de diminuir tais contaminações, vêm-se desenvolvendo pesquisas biotecnológicas na área da reprodução animal, com a utilização de crioprotetores de origem vegetal (Santos *et al.*, 2018). Pesquisas com diluidores a base de *Aloe vera*, hibisco, água de coco, têm demonstrado bons resultados no processo de proteção da integridade espermática quando criopreservados (Santos *et al.*, 2020).

1.2.1. Célula espermática

A célula espermática é a unidade básica de estudo deste artigo e para a compreensão de sua composição e estrutura se faz necessário uma breve introdução acerca de sua formação. A gametogênese masculina ou espermatogênese se caracteriza pelos processos de diferenciação e divisão celular dos quais se originam os gametas masculinos ou espermatozoides (Staub, Johnson, 2018). Este processo conta com a participação das células de Sertoli e de Leydig, presentes no parênquima testicular, com funções relacionadas à espermiogênese e à produção de testosterona respectivamente (Kretser *et al.*, 1998).

A espermatogênese pode ser didaticamente dividida em três fases principais: espermatocitogênese, espermiogênese e espermição. No início da espermatocitogênese, as espermatogônias, derivadas de células germinativas presentes no testículo, se dividem primariamente por mitose e em seguida por meiose, formando células haploides que passarão por uma segunda meiose resultando na formação das espermátides. Estas, por sua vez, passam por transformações bioquímicas e morfológicas, caracterizando o início da espermiogênese, onde tais células adquirem o formato característico dos espermatozoides, com a cabeça alongada, peça intermediária e cauda. A espermição, fase final deste ciclo, é a liberação das células nos túbulos seminíferos. A partir desta fase os espermatozoides são armazenados e maturados ao longo do epidídimo (Chocu *et al.*, 2012).

A célula espermática possui uma forma hidrodinâmica importante para sua trajetória até o oócito e é formada por: cabeça, contendo o material genético a ser combinado com o material genético do oócito; acrossoma, constituído de enzimas hidrolíticas necessárias para interação

com o oócito; peça intermediária, onde se localizam as mitocôndrias, responsável por fornecer energia para a movimentação e a cauda (Cunningham, 2014).

Diante da importância da integridade da membrana para a viabilidade espermática e seu potencial de fertilização (Watson, 2000), é imprescindível a compreensão de sua composição estrutural. A membrana é constituída por uma cadeia lipídica de ácidos graxos insaturados agrupados em uma bicamada, com a presença de proteínas responsáveis pelo transporte de moléculas para o meio intracelular (Ding *et al.*, 2015).

Ao longo de sua formação a célula germinativa modifica seu arranjo de organelas e, como dito anteriormente, adquire a conformação espermática tradicionalmente conhecida. O conhecimento da espermatogênese é essencial para a avaliação espermática, fornecendo informações importantes para o diagnóstico da origem de deformidades encontradas (Schmidt-Hebbel, 2000; Brito *et al.*, 2004).

1.2.2 Plasma seminal

O plasma seminal é a porção líquida do sêmen, composto por diferentes frações provenientes do testículo, epidídimo e de cada uma das glândulas sexuais acessórias, nos bovinos essas glândulas são: ampolas, próstata, glândulas bulbouretrais e glândulas vesiculares. Além de transportar os espermatozoides, limpar a uretra e lubrificar o pênis e a vagina, também atua como fornecedor de substâncias nutritivas e como um agente tampão, regulando o pH do trato reprodutivo feminino (Frandsen, 2013).

A ejaculação acontece em três fases, em que a primeira porção do ejaculado, chamada de pré-seminal, possui teor aquoso, coloração translúcida e praticamente não há presença de espermatozoides, esta não é colhida em uma coleta de sêmen, o recomendável é que se espere pela segunda fase da ejaculação, cuja fração secretada apresenta um aspecto mais consistente leitoso ou cremoso e rica em células espermáticas. Entre os compostos mais específicos e relacionados à manutenção da viabilidade espermática, tem-se antioxidantes, proteínas, insulina, ácido cítrico, enzimas, açúcares, entre outros (Mann, 1981; Lee *et al.*, 2016).

Na composição do plasma seminal, há um equilíbrio entre o potencial antioxidante e espermatozoides com o propósito de controlar o estresse oxidativo, caracterizado neste caso pelo processo de peroxidação lipídica, uma das principais causas de degradação da membrana plasmática de diferentes tipos de células com envoltório lipídico, inclusive de espermatozoides. O sêmen conta com mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa contra a oxidação. Entre os mecanismos enzimáticos incluem-se: superóxido dismutase (SOD), catalase e glutiona

redutase e peroxidase; já como mecanismos não enzimáticos estão o urato, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, hipotaurina, carotenoides e piruvato (Stradaioli *et al.*, 2007; Whaley *et al.*, 2021).

As proteínas presentes no sêmen, por sua vez, ligam-se à parede da membrana atuando como reguladores da capacitação espermática, estimulando o efluxo de lipoproteínas e colesterol da membrana plasmática (Manjunath, 2002).

Já a insulina, secretada pelas células de Leydig e Sertoli, tem a função de auxiliar na espermatogênese e esteroidogênese (Lee *et al.*, 2016), além de desempenhar importante papel na manutenção da motilidade espermática e da integridade de membrana, como demonstrado em estudos com bovinos (Henricks *et al.*, 1998).

1.2.3 Criopreservação

A criopreservação de sêmen tem o objetivo de conservar o sêmen a temperaturas negativas mantendo sua capacidade de fertilização por indeterminado período de tempo (Pegg, 2015). Apesar da capacidade de conservação da técnica, sabe-se que está também impacta negativamente a integridade dos espermatozoides, dessa forma o objetivo de pesquisas e inovações tecnológicas é minimizar tais impactos e conferir melhores condições de preservação, almejando alcançar níveis de qualidade próximos aos do sêmen *in natura* (Watson, 2000; Grötter *et al.*, 2019). A desidratação ou estresse osmótico, também relacionado à formação de gelo, e o estresse oxidativo são os principais fatores de deterioração das células causadas pelo processo de preservação (Baumber *et al.*, 2005).

Em resumo, os passos da criopreservação são: 1) adição de crioprotetores ao esperma antes do resfriamento e subsequente congelamento quando for o caso, 2) refrigeração e estabilização possibilitando seu armazenamento em nitrogênio líquido sob temperaturas próximas a -196°C , 3) Reaquecimento do esperma congelado para sua utilização. O grande obstáculo não é a resistência ao congelamento em nitrogênio, mas sim a capacidade da célula resistir às alterações de temperatura, especialmente em torno de -10 e 5°C , intervalo em que acontecem importantes alterações osmóticas (Watson, 2000; Pegg, 2015; Grötter *et al.*, 2019). O estresse osmótico está principalmente relacionado à velocidade de redução da temperatura, as células podem ser danificadas por um resfriamento muito rápido ou muito lento (Grötter *et al.*, 2019). O resfriamento rápido demais causa a transformação da água remanescente dentro da célula em cristais de gelo, devido ao tempo insuficiente para desidratação total; já o resfriamento muito lento, por permitir uma desidratação prolongada, deforma a célula, o que a

reduz em volume danificando a membrana de forma severa, incapacitando a célula de recuperar seu volume e conformação normal na fase de descongelamento (Mazur 1984, Watson 1995, Mayers, 2005; Pegg, 2015; Whaley, 2021). Crioprotetores também são potenciais causadores de estresse osmótico, por isso sua incorporação ao sêmen deve ser realizada de forma gradual (Varışh, 2022).

O estresse oxidativo causa a redução da integridade funcional e estrutural dos espermatozoides devido a formação de grandes quantidades de ROS e radicais livres, que ocorrem durante a manipulação, exposição à luz e mudanças de temperatura. Além disso, a danificação das membranas durante a criopreservação resulta na saída de moléculas antioxidantes para o meio extracelular, reduzindo sua capacidade interna de proteção contra ROS (Bucak *et al.*, 2010; Varışh, 2022). Trata-se de um processo natural de degradação, que pode ser potencializado em consequência de alterações estruturais das células causadas pelo congelamento e pelas mudanças de temperatura (Watson, 2000; Baumber *et al.*, 2005).

Apesar das principais distinções quanto às características do sêmen estarem atreladas às diferenças entre espécies ou raças, podem haver variações entre indivíduos (Thurston *et al.*, 1999). Variações relacionadas à congelabilidade, por exemplo, são definidas por propriedades da membrana plasmática das células espermáticas, podendo estar ligadas ou não à fatores genéticos (Thurston *et al.*, 1999). Ademais, ejaculados de um mesmo indivíduo também podem se distinguir ao longo do tempo, de acordo com fatores internos e externos, como estado sanitário, idade, nutrição, condições climáticas, frequência de ejaculações, ambiente, luz solar, entre outros (Biniová *et al.*, 2017). Destaca-se também a presença de subpopulações com diferentes graus de vulnerabilidade à manipulação ou a congelação em um único ejaculado, determinado por variações morfológicas causadas por distúrbios na espermatogênese ou durante a maturação. (Thurston *et al.*, 1999).

Considerando os entraves previamente apresentados, são continuamente desenvolvidos métodos para atenuar seus efeitos prejudiciais, como métodos de resfriamento e congelamento, técnicas de manipulação e formulações de diluentes crioprotetores. Estes recursos otimizam o aproveitamento das amostras coletadas, porém quanto maior o nível de estresse térmico e tempo de manipulação, menor o potencial de fertilização. Ou seja, o sêmen fresco terá melhor qualidade em relação ao sêmen refrigerado, e este melhor qualidade em relação ao congelado (Watson, 2000; Bailey *et al.* 2003; Tatone *et al.*, 2010).

Para a congelação foram desenvolvidos padrões de cadência de refrigeração, já que a mudança abrupta de temperatura é altamente prejudicial às células (Grötter, 2019). São

comumente utilizadas geladeiras específicas ou caixas de isopor com design próprio a fim de proporcionar uma curva de resfriamento adequada. Quanto às etapas da criopreservação: previamente à congelação o sêmen é resfriado e estabilizado a temperaturas próximas a 0°C, logo depois é posto em contato com o vapor do nitrogênio líquido, onde ultrapassará os -100°C, somente em seguida o semen é envasado e mergulhado em nitrogênio líquido atingindo em torno de -196°C (Boscarato, 2016; Tvrđá, 2017; Sebastião, 2018; Patel, 2019; Whaley *et al.*, 2021).

Notavelmente na década de 70, uma pesquisa de Ahlquist et al. concluiu que as taxas de descongelação tinham maiores influências na sobrevivência celular pós-criopreservação que as taxas de congelação. Portanto, o descongelamento das palhetas de sêmen é realizado em banho maria, com aquecedores específicos, a uma temperatura de 37°C (Tvrđá, 2017; Whaley *et al.*, 2021); pelo menos um estudo demonstrou evidências de que a curva de aquecimento entre 2°C/min a 100°C/min não apresentaram diferenças na viabilidade espermática (Thorpe, 1976).

1.2.4 Diluição

O plasma seminal não é constituído de forma a prover proteção suficiente aos espermatozoides contra processos oxidativos decorrentes da exposição ao ambiente externo, dessa forma o sêmen é rapidamente diluído para que permaneça o mínimo possível sem ação de agentes protetores. Entre os componentes com resultados mais expressivos estão a gema de ovo ou leite utilizados como base do meio, o glicerol, antibióticos e antioxidantes (Beconi *et al.*, 1993; Pegg, 2002; Tvrđá, 2017; Whaley *et al.*, 2021).

A capacidade criopreservante da gema de ovo e sua aplicação na indústria bovina foi descoberta por Paul Phillips e Henry Lardy, em 1940; em 1949, Polge et al. (1949), descobriu a utilização do glicerol como protetor celular. Posteriormente, foi descoberta a possibilidade da adição de antibióticos e sódio citrato (o citrato atua como tamponante para a manutenção do pH próximo da neutralidade (6,8 a 7,1) ao meio diluente para aumentar a quantidade de células sobreviventes após o descongelamento. Fornecedores de energia também são utilizados, como a insulina e diferentes carboidratos (Henricks, 1998; Whaley *et al.*, 2021; Pinto, 2023).

A gema de ovo em combinação com o TRIS (hidroximetil aminometano) e o citrato é a formulação mais utilizada. Devido a dificuldade de padronização de produtos a base de matéria prima de origem animal, foi sugerida a substituição destes por componentes sintéticos ou de origem vegetal, porém estudos demonstraram melhores resultados na avaliação espermática pós

descongelamento com a utilização de TRIS e gema de ovo. (De Leeuw, 2000; Thun, 2002; Niasari-Naslaji, 2006).

A presença de proteínas conhecidas como *bovine seminal plasma* (BSP), responsáveis pela capacitação espermática no plasma seminal, se torna uma das barreiras para a conservação do sêmen. Este processo é essencial para a funcionalidade dos espermatozoides no momento da fecundação já no trato reprodutivo feminino, porém a ação dessas proteínas causa a capacitação precoce do espermatozoide a ser preservado. As BSP se ligam aos fosfolípidos da membrana espermática e atuam como reguladores da capacitação, estimulando o efluxo de lipoproteínas e colesterol da membrana plasmática, tornando as células mais vulneráveis aos danos da criopreservação. Para minimizar tal efeito são utilizados crioprotetores extracelulares como a gema do ovo, as lipoproteínas de baixa densidade presentes nessas substâncias se ligam de forma estável às BSP impedindo sua ação sobre a membrana dos espermatozoides (Manjunath *et al.*, 2002).

Sendo necessário que o número de espermatozoides funcionais seja maior que o número considerado mínimo para atingir alta probabilidade de fecundação – $20 \times 10^6/\text{ml}$ – (Watson, 2000). Considerando espermatozoides congelados e as perdas decorrentes da congelamento, é necessária uma concentração oito vezes maior para alcançar uma taxa de fecundação equivalente à do sêmen in natura (Shannon, 1995).

A dose inseminante é calculada de acordo com as características do sêmen coletado, a avaliação feita definirá a quantidade de espermatozoides funcionais e partir deste resultado o sêmen será considerado apto para a utilização ou será descartado. O manual de exame andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) traz alguns parâmetros a serem considerados para a seleção do sêmen. Quanto à motilidade, seleciona-se o ejaculado que apresentar resultado acima de 70%, e anormalidades morfológicas totais abaixo de 20% (CBRA, 2013).

Como apresentado anteriormente, logo após a coleta o sêmen deve ser imediatamente diluído em proporção 1:1, esta etapa é feita antes mesmo dos cálculos de diluição. Em relação aos cálculos, estes são realizados a partir da avaliação da concentração espermática, considerando o volume do ejaculado e a dose inseminante adotada. A relação entre esses valores será a base do cálculo para se chegar à quantidade de diluidor a ser incorporada ao ejaculado e à quantidade de doses a serem envasadas (EMBRAPA, 2017).

1.2.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um processo de degradação oxidativa em que a cadeia lipídica perde moléculas de hidrogênio para radicais livres dispersos no meio (Silva, 1999; Voet, 2004). Os radicais livres, responsáveis por desencadear a peroxidação, são liberados naturalmente pela interação com oxigênio, exposição à luz e em consequência da manipulação. Esses radicais livres são moléculas de oxigênio instáveis, que se estabilizam através de ligações com hidrogênio. Com a perda dos elétrons presentes no hidrogênio, a cadeia se enfraquece e com o decorrer do tempo a membrana composta por estas cadeias pode perder sua conformação, romper-se e perder sua funcionalidade (Buettner, 1993; Voet, 2004).

1.2.6 Atividade antioxidante em espermatozoides criopreservados

Os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações reduzem ou impedem a oxidação de determinado substrato, no caso em questão protegendo a membrana plasmática dos espermatozoides criopreservados, já que sua estrutura consiste de uma bicamada lipídica formada por ácidos graxos insaturados, a constituição lipídica mais vulnerável à peroxidação; dessa forma os antioxidantes mantêm a atividade metabólica e viabilidade das células espermáticas (Beconi *et al.*, 1993). Seu mecanismo de ação é caracterizado pelo fornecimento da molécula de hidrogênio necessária para a estabilização dos radicais livres, ou seja, os radicais livres se estabilizam a partir do recrutamento do hidrogênio proveniente da substância antioxidante e não da molécula de hidrogênio das cadeias lipídicas da membrana (Buettner, 1993; Voet, 2004).

As propriedades ideais de um antioxidante são, baixa capacidade de perder elétrons, capacidade reagir com o oxigênio, manifestar atividade antioxidante mesmo em pequenas quantidades, passível de ser reciclada direta ou indiretamente por sistemas enzimáticos e apresentar menor energia de ativação que as moléculas oxidáveis (Buettner, 1993).

1.2.7 Potencial antioxidante de extratos de frutos da flora brasileira

Com a crescente demanda por tratamentos naturais e diminuição de aditivos sintéticos, compostos bioativos têm sido objeto de estudo de inúmeras pesquisas em diferentes áreas. Frutos com potencial antioxidante e antimicrobiano estão presentes em todos os biomas do Brasil e com o empenho de pesquisadores e incentivo governamental o país tem potencial para se tornar referência em inovações com compostos bioativos de frutos tropicais (Funari e Ferro, 2005; Silva, 2020).

Os extratos dos frutos a serem analisados são obtidos através de soluções alcoólicas ou

aquosas e são feitas a partir dele, a determinação de atividade antioxidante, determinação de ácido ascórbico (vitamina C) e determinação de compostos fenólicos. As pesquisas são engendradas a fim de testar os efeitos dos extratos em situações específicas e controladas para o desenvolvimento de novos produtos e fármacos (Silva, 2020).

O cerrado é bastante diversificado, concentrando um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna global, onde se encontram diversas espécies vegetais de interesse científico, principalmente devido às substâncias de potencial medicinal presentes em frutos típicos (Souza *et al.*, 2007). Frutos como: Pequi (*Caryocar brasiliense*); Buriti (*Mauritia vinifera*); Murici (*Byrsonima verbascifolia*); Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*); Cajuí (*Anacardium humile*); Mangaba (*Hancornia speciosa*), Cagaita (*Eugenia dysenterica*), espécies do gênero *Anacardium* (Caju), Guapeva (*P. gardneriana*) e Pitanga-do-cerrado (*E. calcyna*).

Os frutos citados se destacam pela alta concentração de compostos fenólicos, ácido ascórbico (vitamina C) com proporções variadas entre as espécies, conferindo a eles atividade antioxidante cujo grau também varia entre elas (Rocha *et al.*, 2011, Silva, 2020). A ação antioxidante dessas espécies é conhecida de forma empírica pelas comunidades locais e faz parte do conhecimento tradicional (Avidos; Ferreira, 2003).

Compostos fenólicos funcionam como sequestradores de radicais – processo antioxidante – e algumas vezes como quelantes de metais (Shahidi *et al.*, 1992; Soares, 2002), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, devido principalmente a sua toxicidade, conhecida por estudos para a indústria de alimentos (Shahidi *et al.*, 1992), é de suma importância o estudo da ação destas substâncias *in vivo*. Entre os principais compostos fenólicos presentes nos vegetais estão, taninos, flavonoides, tocoferóis (Soares, 2002, Rocha *et al.*, 2011; Freire, 2013).

O ácido ascórbico age impedindo a formação de hidroperóxido de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas, e desse modo, previne os possíveis danos oxidativos que afetam as células espermáticas (May, 1999; Nordberg e Árner, 2001). Já foram realizados estudos envolvendo a adição desta substância ao sêmen criopreservado de diversas espécies, os quais relatam que o ácido ascórbico não causa alterações na morfologia espermática, porém também não melhora a motilidade das células espermáticas após o processo de criopreservação – mesmo reduzindo danos oxidativos do processo – (Garcez, 2011).

No sêmen de coelhos demonstrou eficácia na redução das concentrações de substâncias reativas do oxigênio (Yousef *et al.*, 2007). Em bovinos, demonstrou-se que, tanto isolada quanto combinada com outro antioxidante enzimático, apresentou impactos positivos nas

células espermáticas, após o processo de criopreservação do sêmen (Hu *et al.*, 2010; Eidam, 2016).

1.2.8 Atividades biológicas do Extrato de *Hymenaea stigonocarpa*

A *Hymenaea stigonocarpa*, popularmente conhecida como Jatobá, é uma das espécies em foco de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos. Trata-se de uma árvore encontrada na floresta amazônica, mata atlântica, cerrado e pantanal brasileiro, atingindo até 20 metros de altura seu fruto é um legume seco, alongado e arredondado, sua cor varia do marrom-claro ao marrom-escuro e a frutificação ocorre no mês de agosto. A polpa do fruto é farinácea e comumente utilizada na confecção de alimentos (Carvalho, 2007).

O fruto e as folhas do Jatobá também são utilizados tradicionalmente para fins medicinais, de forma empírica foi constatada sua eficácia para o tratamento de cólica estomacal, afecções respiratórias, geniturinárias e hepáticas em geral, além de apresentar potencial vermífugo, cicatrizante, antipirético, antifúngico e antioxidante (Garcia, 2011).

Já foi demonstrada a presença de terpenoides, esteroides e flavonoides com o exame fitoquímico do alburno de *H. stigonocarpa* e avaliada sua capacidade antimicrobiana frente a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (Valentim, 2006). Ademais, a presença de compostos fenólicos e ácido ascórbico foi detectada e sua atividade antioxidante foi considerada relevante (Silva, 2020).

A capacidade antioxidante dos extratos também foi avaliada em sistema modelo de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, este método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Mattos *et al.*, 2009). Outras formas de avaliação da atividade antioxidante são o método de sequestro de radicais livres do DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) e o método de redução do ferro (Rufino *et al.*, 2006, 2007).

Os valores da atividade antioxidante do extrato aquoso de jatobá estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - A atividade antioxidante do extrato aquoso de jatobá pelo sistema e co-oxidação β -caroteno betacaroteno/ácido linoleico do extrato.

Concentração aquoso (mg/mL)	extrato	β -caroteno/ácido linoleico AA(%trolox 400 μ M)
5,00		68,04 \pm 3,04a
2,50		65,87 \pm 1,13a
1,00		66,08 \pm 0,39a

0,50

64,87±1,29a

 Fonte: Lopes, 2018.

De acordo com Rufino et al. (2010), estes resultados demonstram uma atividade antioxidante intermediária.

1.3 Conclusão

A técnica de criopreservação de sêmen é antiga e pouco mudou nas últimas décadas, porém percebe-se a partir desta revisão que há margem para o melhoramento e inovação, principalmente em relação às espécies cujo sêmen é mais vulnerável ao congelamento e à oxidação, como bovinos, equinos e suínos. Espera-se que seja possível a utilização de extratos naturais, em especial de espécies nativas do Brasil, e que estes possam melhorar a qualidade espermática do sêmen pós-congelamento e refrigeração, atuando principalmente como inibidores do processo oxidativo.

1.4 Referências

ALVES, E. R. de A.; CONTINI, E.; GASQUES, J. G. Evolução da produção e produtividade da agricultura brasileira. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. da (Ed.). Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, v.1, p.67, 2008.

AMIDI, F. et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank**, Dordrecht, v.17, p.745-756, 2016.

ÁVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos dos Cerrados – Preservação gera muitos frutos. **Biociência**, v.15, p. 36-41, 2000.

ASBIA, Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index Asbia, 1º semestre, p.1-37, 2021.

BAILEY, J.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. **Canadian journal of animal science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 393-401, 2003.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American journal of veterinary research**, Chicago, v.66, n. 5, p. 772-779, 2005.

BECONI, M. T. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 40, n. 4, p. 841-851, 1993.

BINIOVÁ, Z. et al. Effects of climatic conditions on bovine semen characteristics. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 65, n. 1, 2017.

BRITO L. F. C. et al. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, Los Altos, v.62, p.1198-1217, 2004.

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. Viçosa, 2003. Dissertação (mestrado em medicina veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

BOSCARATO, A. G. et al. Efeito da adição de ciclodextrina carregada com colesterol sobre a qualidade do sêmen congelado e descongelado de touros adultos da raça nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.3, p. 105-110, 2016.

BUCAK, M. N. et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.89, n. 1, p. 24-30, 2010.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v.300, n.2, p.535-543, 1993.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA. 3ed. Belo Horizonte, 2013, 104p.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.104, p.119-131, 2008.

CHOCU, S. et al. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. **Systems biology in reproductive medicine**, London, v. 58, n. 4, p. 179-190, 2012.

COUPLAND, J. N.; MCCLEMENTS, D. J. Lipid oxidation in food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 83-91, 1996.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Veterinary physiology**. Collingwood: Saunders, 2014.

DE LEEUW A. M. V. W. et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. **Theriogenology**, Los Altos, v.54, p. 57-67, 2000.

DE KRETZER, D.M. et al. Spermatogenesis. **Human reproduction**, Oxford, v. 13, p. 1-8, 1998.

DING, G. L. et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. **Asian J. Androl.**, Beijing, v.17, p.948-953, 2015.e

EIDAN, S. M. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 167, p. 1-7, 2016.

FRANDSON, R. D; LEE W. W.; FAILS A. D. **Anatomy and physiology of farm animals, 8th edition**. Hoboken: Wiley-Blackwell, p. 413-419, 2018.

- FREIRE, J. M. et al. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, p. 2291-2295, 2013.
- FUNARI, C. S. de; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 178-182, 2005.
- GARCEZ, M. E. S. **Efeito do resveratrol e do ácido ascórbico na criopreservação de sêmen humano**. 2011. 64f. Tese (doutorado em biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.
- GROTTER, L. G. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reprod. Domest. Anim.**, Hamburgo, v.54, p.655-665, 2019.
- HENRICKS, D. M. et al. Identification of insulin-like growth factor 1 in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.59, p. 330-337, 1998.
- HU, J. et al. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 72-77, 2010.
- LEE, H. S. et al. Serum and seminal plasma insulin-like growth factor-1 in male infertility. **Clin. Exp. Reprod. Med.**, Seoul, v.43, p.97-101, 2016.
- LOPES, G.F. **Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos aquoso e etanólico da polpa dos frutos de *Hymenaea stigonocarpa***. 2018. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Paranaense, Umuarama, 2018.
- LUSTOSA, M. D. S. C. et al. Potencial antioxidante dos ésteres de pequi (*Caryocar coriaceum*) na criopreservação de sêmen bovino e na fertilização in vitro. **Ciência Animal Brasileira**, 26, 80138E, 2025.
- MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol. Reprod.**, Champaign, v.67, p. 1250-8, 2002.
- MANN T., LUTWAK-MANN C. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. **Male Reproductive Function and Semen: Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology**. Berlin: Springer London, 1981. 1-37 p.
- MAY, J. M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? **The FASEB journal**, Rockville, v. 13, n. 9, p. 995-1006, 1999.
- MAYERS, S. A. Spermatozoal response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.89, p.57-64, 2005.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of physiology**, Washington, v.247, n.16, p.125-142, 1984.
- MEDEIROS C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better? **Theriogenology**, Los Altos, v.57, p. 327-34, 2002.

NAGY, S. et al. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 80, n. 3-4, p. 225-235, 2004.

NIASARI-NALAJI, A. et al. Effectiveness of a tris-based extender (SHOTOR diluent) for the preservation of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) semen. **Cryobiology**, San Diego, v.53, p.12-21, 2006.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, M. K. B. et al. Comparison of commercial diluents on motility, functionality and integrity of plasma membrane of bovine spermatozoa. **Rev. Bras. Cienc. Vet.**, Niterói, v.25, p.57-71, 2018.

OMBELET W., VAN ROBAYS J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. **Facts, views & vision in ObGyn**. Wetteren, Bélgica, v.7, n.2, p.137, 2015.

PATEL, T. M. et al. Influence of antioxidant sericin in tris extender on oxidative markers during cryopreservation (-196°C) of bovine semen. **Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 34-37, 2019.

PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in reproductive medicine**, New York, p. 005-014, 2002.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. Cryopreservation and freeze-drying protocols, New York: Springer. p. 3-19, 2015.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull sperm. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 23, p. 399-404, 1940.

PINTO, S. C. C. et al. Does supplementation of vitamin C, reduced glutathione or their association in semen extender reduce oxidative stress in bovine frozen semen? **Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.72, p.9-17, 2020.

PINTO, S. S. C. et al. Impact of adding different concentrations of IGF-I and insulin to the semen extender on bull sperm quality post-cryopreservation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.75, n.5, p.771-786, 2023.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, Londres, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 1215-1221, 2011.

RUFINO M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade Antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **EMBRAPA**. Fortaleza. 2006.

RUFINO M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **EMBRAPA**. Fortaleza, 2007

- SANTOS, B. M. B. et al. Congelação do sêmen de pequenos ruminantes sem uso de gema de ovo utilizando bases vegetais em substituição à gema de ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.42, n.(3-4), 96-100, 2018.
- SANTOS, W. G. S. et al. Estudo do potencial crioprotetor de extrato de algaroba (*Prosopis juliflora*) na refrigeração de espermatozoides epididimários bovino. **Brazilian Journal of Development**, v.6, (n.8, p.57234-57251, 2020.
- SCHMIDT-HEBBEL, J. et al. Características físicas e morfológicas de sêmen de touros jovens das raças Gir, Guzará, Nelore (*Bos taurus indicus*) e Caracu (*Bos taurus taurus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo horizonte, v.52, p.461-467, 2000.
- SEBASTIÃO, T. R. C. et al. Efeito de meios diluentes e sistemas de transporte no sêmen congelado analisado pelo método computacional CASA em touros Nelore. **Colloquium Agrariae**. v.14, n.4, p. 145-150. 2018.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **food science & nutrition**, Malden, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.
- SHANNON P., VISHNAWATH R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.30, p. 1-10, 1995.
- SILVA, D. X. Investigação de compostos bioativos e atividade antioxidante em frutos do cerrado tocantinense. **Revista Cereus**, Gurupi, v. 12, n. 1, p. 64-76, 2020.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de nutrição**, Campinas, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SPALLANZANI, L. **Dissertations relative to the natural history of animals and vegetables**. J. murray, 1789.
- STAUB, C; JOHNSON, L. Spermatogenesis in the bull. **Animals**, Basel, v. 12, n. s1, p. s27-s35, 2018.
- STRADAIOLI, G. et al. Decrease in glutathione (GSM) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, Los Altos, v.67, p. 1249-55, 2007.
- TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological endocrinology**, Carnforth, v. 26, n. 8, p. 563-567, 2010.
- THORPE, P.; KNIGHT, S. C.; FARRANT, J. Optimal conditions for the preservation of mouse lymph node cells in liquid nitrogen using cooling rate techniques. **Cryobiology**, San Diego, v.13, p. 126-133, 1976.
- THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, Los altos, v.57, p. 1087-94, 2002;
- THURSTON, L. M.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel

automated sperm morphology analysis system. **J. Reprod. Fertil.**, v.117, p. 271-280, 1999.

TREULEN, F. et al. Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. **Cryobiology**, San Diego, v. 83, p. 65-74, 2018.

TVRDÁ, E. et al. Antioxidant effects of lycopene on bovine sperm survival and oxidative profile following cryopreservation. **Veterinární medicína**, Praga, v. 62, n. 8, 2017.

VALENTIM, A. P. T. **Atividade Antimicrobiana, Estudo Fitoquímico e Identificação de Constituintes Apolares do Alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (Jatobá)**. Recife, 2006. Dissertação (Mestrado Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

VARIŞH, Ö. et al. Relationship between toxicity of cryoprotectants, osmotic and oxidative stresses in Awassi ram sperm. **Cryoletters**, Lewes, v.43:2, p. 120-8, 2022.

VOET, D., VOET J. G. **Biochemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. 2004. 845-852, 945-959p.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.60:61, p. 481-492, 2000.

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

WHALEY, D. et al. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. **Cell Transplantation**, Elmsford, v.30, p. 0963689721999617, 2021.

YOUSEF, M. I. et al. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants. **Toxicology**, Amsterdam, v.239, n.3, p. 213-223, 2007.

1.5 Objetivo

O objetivo do trabalho foi a avaliação da eficácia da adição de extrato aquoso da polpa do fruto de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) nas proporções de 0,5% e 1% em meio diluidor de sêmen bovino sobre os parâmetros de cinética e viabilidade espermática pós-descongelamento.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ
(*Hymenaea stigonocarpa*) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-
CONGELAMENTO**

2.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO JATOBÁ (*Hymenaea stigonocarpa*) NA VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS- CONGELAMENTO

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – ISSN 1678-4162,

Resumo:

Este trabalho objetivou avaliar a capacidade do extrato de polpa de Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) de conferir proteção antioxidante ao sêmen bovino, quando adicionado ao diluente comercial previamente ao processo de congelamento. O estudo comparou de forma inédita a qualidade do sêmen congelado em diluente comercial Botubov® em sua fórmula padrão, com grupos contendo diferentes concentrações do extrato aquoso da polpa de Jatobá adicionado ao diluente. Foram utilizados 5 touros zebuínos da raça Nelore, com idade média de 5 anos. Para o estudo foram obtidos dois ejaculados de cada um dos cinco touros, no intervalo de uma semana cada coleta, pelo método de eletroejaculação, totalizando dez partidas de sêmen criopreservadas. Os ejaculados foram divididos em 3 grupos de estudos: grupo controle (C): ejaculado diluído em meio comercial, grupo 1 ejaculado diluído em meio comercial acrescido com 0,5% de extrato aquoso da polpa do jatobá, grupo 2 ejaculado diluído em meio comercial acrescido com 1% de extrato aquoso da polpa do jatobá. As amostras foram diluídas numa concentração de 100 milhões/mL e posteriormente acondicionadas em palhetas de 0,5 mL. Foram mantidas por 4 horas a 5°C e posteriormente, mantidas por 20 minutos em vapor de nitrogênio líquido (N2L) em caixa isotérmica e em seguida, mergulhadas em N2L e armazenadas em botijão criogênico. Para as análises pós-descongelamento, as palhetas foram descongeladas a 36°C por 20 segundos. Foram avaliados os parâmetros de cinética e cinemática espermática pelo sistema computadorizado (CASA - Computer-Assisted Semen Analysis). Foi observado no grupo com 1% de extrato uma menor motilidade total, motilidade progressiva e motilidade rápida dos espermatozoides. Os espermatozoides imóveis foram maiores no grupo com 1% de extrato. Não se observou diferenças significativas na cinemática espermática entre os grupos. O presente estudo revelou que a adição da polpa de extrato de jatobá a 0,5 e 1% não melhorou os parâmetros de cinética espermática. O extrato a 1% diminuiu os valores de motilidade total progressiva, motilidade rápida e aumento do percentual de espermatozoides imóveis. Ressalta-se, no entanto, a necessidade de novos estudos utilizando novas concentrações do extrato, novos métodos de integração e diluentes diferentes.

Palavras-chave: Bioativos. Criopreservação. Extrato vegetal. Reprodução animal.

Abstract:

This study aimed to evaluate the ability of Jatobá pulp extract (*Hymenaea stigonocarpa*) to confer antioxidant protection to bovine semen when added to a commercial extender prior to freezing. The study compared in an unprecedented way the quality of semen frozen in Botubov's® standard commercial extender with groups containing different concentrations of Jatobá pulp aqueous extract added to the extender. Five Nellore Zebu bulls, with an average age of 5 years, were used. Two ejaculates (two collections) were obtained from each of the five bulls, one week apart, using the electroejaculation method, totaling ten cryopreserved semen batches. The ejaculates were divided into 3 study groups: control group (C): ejaculate diluted in commercial medium; group 1: ejaculate diluted in commercial medium added with 0.5% aqueous extract of jatobá pulp; and group 1: ejaculate diluted in commercial medium added with 1% aqueous extract of jatobá pulp. The samples were diluted to a concentration of 100 million/mL and subsequently stored in 0.5 mL straws. They were kept for 4 hours at 5°C and subsequently kept for 20 minutes in liquid nitrogen vapor (N2L) in an isothermal box and then immersed in N2L and stored in a cryogenic cylinder. For post-thaw analyses, the straws were thawed at 36°C for 20 seconds. Sperm kinetics and kinematics parameters were evaluated by the computerized system (CASA - Computer-Assisted Semen Analysis). Lower total motility, progressive motility, and rapid motility of sperm were observed in the 1% extract group. The number of non-motile sperm was higher in the 1% extract group. No significant differences in sperm kinematics were observed between the groups. The present study revealed that the addition of 0.5 and 1% jatobá pulp extract had a negative effect on sperm kinetics, decreasing total progressive motility and rapid motility values, and increasing the percentage of non-motile sperm. However, the need for further studies using new extract concentrations, new integration methods, and different diluents is emphasized.

Keywords: Animal Reproduction. Bioactive. Cytoprotective. Plant extract.

INTRODUÇÃO:

Com o passar do tempo e a evolução científica, só aumentam a aplicabilidade e necessidade das biotecnologias de reprodução. Atualmente a técnica de inseminação artificial (IA) é amplamente difundida no âmbito da pecuária, impulsionada pela necessidade de melhoramento genético e otimização de processos produtivos, principalmente para satisfazer as demandas do grande avanço no setor de exportação (Alves, Contini, Gasques, et al., 2008). O incremento no uso da IA muito se deu pelo desenvolvimento de tecnologias como o método de inseminação artificial em tempo fixo, caracterizado pela mimetização da endocrinologia reprodutiva, utilizando fármacos exógenos para a sincronização do estro e/ou da ovulação, e formas cada vez mais eficazes de manutenção da qualidade do sêmen bovino criopreservado (ASBIA, 2021).

Desde 1678, quando espermatozoides foram descritos pela primeira vez pelo holandês Antoni van Leeuwenhoek, cientistas de diversas áreas de atuação contribuíram para a história da inseminação artificial (Ombelet; Van Robays, 2015). Sua primeira aplicação bem sucedida e descrita na literatura foi realizada em 1784 pelo sacerdote católico e fisiologista italiano Lazzaro Spallanzani (Spallanzani, 1789), a quem também se atribui a autoria da primeira descrição dos efeitos do resfriamento do sêmen em espermatozoides, ao arrefecer sêmen humano à temperatura da neve e relatar a seção dos movimentos das células espermáticas (Ombelet; Van Robays, 2015). Sendo a criopreservação (preservação pelo frio) o principal método de conservação de sêmen até os dias atuais (Grotter et al., 2019), pesquisas como esta, relacionadas à interação entre refrigeração e a viabilidade espermática, viriam a ser replicadas, em diferentes níveis de complexidade, por toda a história da técnica.

A criopreservação, seja o congelamento ou refrigeração do sêmen, apesar de sua capacidade de conservação, resulta em alterações permanentes nas estruturas das membranas, na integridade do DNA e na cinética espermática (Celeghini et al., 2008; Amidi et al., 2016; Treulen et al., 2018). Tais alterações são determinantes para a capacidade de fertilização do sêmen e podem estar relacionadas ao estresse osmótico, formação de cristais intracelulares ou à liberação de radicais livres (Grotter et al., 2019). Por conseguinte, para a proteção das células, são utilizados meios diluentes compostos por diferentes substâncias protetoras relacionadas a cada um dos possíveis efeitos deletérios da criopreservação (Pinto et al., 2023; Whaley et al., 2021).

Entre os fatores que afetam a viabilidade espermática do sêmen, está o processo oxidativo. Neste contexto, há a hipótese de que a formação de radicais livres, fator primordial

para a oxidação, pode ser aumentada pelas mudanças de temperatura. Isso ocorre principalmente a partir das respostas metabólicas de recuperação dos espermatozoides após o descongelamento do sêmen, danificando funções vitais das células espermáticas, sobretudo na integridade da membrana plasmática. Apesar da presença de citoprotetores e antioxidantes produzidos pelo próprio organismo no plasma seminal, estes não são eficazes para conferir resistência suficiente às células diante de situações extremas como o congelamento, descongelamento e a exposição ao oxigênio (Nordberg e Árner, 2001; Pegg, 2002; Tatone et al. 2010; Souza, 2016).

Para solucionar esse entrave são adicionados ao sêmen aditivos citoprotetores, porém o uso destes aditivos pode aumentar consideravelmente o preço das doses de sêmen, enquanto o uso de substâncias naturais, como o extrato de plantas podem melhorar a viabilidade espermática com menor custo. (Tvardá et al., 2020)

Para este trabalho a espécie vegetal escolhida foi o Jatobá. Lopes (2018) em seu trabalho de pesquisa com a *H. stigonocarpa* obteve os seguintes resultados em uma pesquisa *in vitro* em relação a atividade antioxidante com o método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico os resultados para o extrato aquoso (1,0 mg/mL) foram de 66,08% de trolox 400 μ M, considerado atividade antioxidante intermediária.

Dessa forma, os estudos realizados por Lopes (2018), obtiveram resultados satisfatórios tanto para atividade antioxidante, porém ainda são necessários estudos para averiguar tal atividade *in vivo*, para assim atestar a viabilidade da utilização do extrato aquoso de *H. stigonocarpa* como uma alternativa de antioxidante para as técnicas de criopreservação de sêmen.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a capacidade do extrato de polpa de Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) de conferir proteção antioxidante ao sêmen bovino, quando adicionado ao diluente comercial previamente ao processo de congelação e contribuir com os avanços no conhecimento dos bioativos e seu potencial, em especial visando sua utilização como alternativa para proteção de células espermáticas no contexto das biotecnologias reprodutivas.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Obtenção do material vegetal

Hymenaea stigonocarpa (Jatobá) foi coletada no município de Umuarama, região noroeste do estado do Paraná, Brasil, nas coordenadas latitude 23° 47' 55" Sul e a longitude 53° 18' 48" Oeste". O acesso à espécie foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número AE4365B.

Obtenção dos extratos

Os frutos foram secos à temperatura ambiente, foram retiradas as polpas dos frutos e separadas das sementes, a polpa foi macerada em gral com pistilo, foi utilizado nitrogênio líquido para quebra de partículas maiores, e pulverizada a uma granulometria a 710 µm. Foi preparado o extrato aquoso, com adaptação de acordo com a metodologia de Arakaki (2015). Para o preparo do extrato aquoso, foi utilizado água purificada Miliq (2700 L) como solvente, para o extrato etanólico foi utilizado 700mL álcool absoluto 96° GL, e para o extrato hidro cetônico (20/80) foi utilizando 200 mL água purificada Miliq e 500 ml de acetona, foi utilizado 50 g da polpa pulverizada em ambos, foram mantida sob maceração dinâmica com renovação de solvente por 20 minutos, logo após foram filtradas , repetindo esse processo até o filtrado ficar mais claro. Em seguida os extratos foram concentrados, utilizando-se um evaporador rotativo (Tecnal TE-210) até completa evaporação do solvente, obtendo desta forma os extratos brutos aquoso, etanólico e hidro cetônico (20/80). Os extratos brutos foram liofilizados á uma temperatura de -42 °C.

Locais e processamento das amostras

As atividades de colheitas foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Universidade Paranaense (UNIPAR), localizado no município de Umuarama, Paraná, Brasil, e na Fazenda Três Minas, localizada no município de Xambê. Todos os procedimentos realizados durante o experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paranaense, sob protocolo nº 41405/2024.

Foram utilizados 5 touros zebuínos da raça Nelore, de escore corporal de 3 a 4., com idade média de 5 anos, criados de forma extensiva a pasto nas dependências da Fazenda Três Minas, com água e suplementação mineral disponíveis à vontade. Através de exame andrológico e exame físico os 5 touros foram considerados aptos à reprodução segundo parâmetros do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Para o estudo foram obtidos dois ejaculados (duas coletas) de cada um dos cinco touros, no intervalo de uma semana cada coleta, pelo método de eletroejaculação, totalizando dez partidas de sêmen criopreservadas.

Neste experimento foi utilizado um meio diluente comercial para sêmen de touro e pequenos ruminantes (Botubov®, Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, Brasil).

Os parâmetros estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) utilizados para a avaliação do sêmen foram volume, aspecto, coloração, turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor e concentração espermática. Considerando aptos à criopreservação somente ejaculados com aspecto leitoso, vigor mínimo 3 e com motilidade espermática acima de 70%.

A avaliação do sêmen (volume, motilidade, vigor e turbilhonamento) da primeira coleta está apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - A avaliação do sêmen (volume, motilidade, vigor e turbilhonamento) da primeira coleta utilizando o aparelho Androscope CASA system 12500/3000, minitube.

Touro	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Turbilhonamento (1-5)
4047	6	90	4	3
4053	5	80	3	1
4049	7	90	4	3
4045	6	70	3	1
4041	5,5	90	4	3

Fonte: O autor

A avaliação do sêmen (volume, motilidade, vigor e turbilhonamento) da segunda coleta está apresentada na tabela 3.

Tabela 3 - A avaliação do sêmen (volume, motilidade, vigor e turbilhonamento) da segunda coleta utilizando o aparelho Androscope CASA system 12500/3000, minitube.

Touro	Volume (ml)	Mototilidade (%)	Vigor (1-5)	Turbilhonamento (1-5)
4047	6,5	80	3	1
4053	4,5	70	3	2
4049	11	90	3	3
4045	15	80	3	2
4041	6	95	4	5

Fonte: O autor

Após a coleta e preparação das alíquotas de análise, os ejaculados foram subdivididos em mesma quantidade em três tubos, em cada um dos tubos o sêmen foi diluído em proporção 1:1, com o diluidor de sêmen Botubov® adicionados de diferentes concentrações do extrato da polpa de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*), enquanto as análises e cálculos e concentração eram realizados com o auxílio do sistema CASA do aparelho Androscope da Minitube.

Após a triagem inicial cada ejaculado foi alíquotado em 3 grupos de estudo:

- 1) Grupo controle: meio diluidor comercial;
- 2) Grupo tratamento 1: meio diluidor comercial e 0,5% de extrato aquoso da polpa de jatobá.
- 3) Grupo tratamento 2: meio diluidor comercial e 1% de extrato aquoso da polpa de jatobá.

Após a adição extrato de jatobá os tubos foram homogeneizados na proporção 1:1 e incubados em banho-maria a temperatura de 37°C pelo tempo de 10 minutos, foram realizadas as análises e determinação de diluição para a incorporação do agente antioxidante.

A diluição do sêmen foi determinada pelo resultado do cálculo de concentração, de forma que cada um dos três tubos resultasse em doze palhetas francesas de 0,5mL (IMV® Technologies L'Aigle Cedex, France) contendo 30 milhões de espermatozoides viáveis cada. Cada um destes tubos representa um dos grupos de avaliação apresentados acima.

As amostras passaram por uma incubação de 20 minutos antes de serem dispostas em uma caixa de isopor previamente refrigerada a 5°C e posteriormente congeladas de acordo com Crespilho et al. (2006). As palhetas foram armazenadas em um botijão de nitrogênio por 3 dias antes de serem expostas às análises.

As palhetas após preenchidas com determinada diluição, foram incubadas por 20 minutos, antes do processo de congelamento. Foram utilizadas caixas de isopor Botuflex para a etapa de refrigeração; este método estabiliza a temperatura das amostras a 5°C em um período de 4 horas. Em seguida as palhetas foram dispostas sobre vapor de nitrogênio por 20 minutos, nesta etapa ocorre a transição das amostras para -20°C que logo após são mergulhadas em nitrogênio líquido atingindo até -196°C. Para as análises as amostras foram descongeladas em descongelador WTA a 37°C, por 30 segundos e dispostas em lâminas e lamínulas pré-aquecidas na mesma temperatura.

Análises de sêmen assistidas por computador

A motilidade e a cinemática dos espermatozoides foram analisadas utilizando o método CASA (Fernandez-Novo et al. 2021). As amostras de sêmen em cada tratamento foram diluídas com o mesmo diluente até que a concentração de espermatozoides atingisse 6×10^6 células por

mL. As amostras de sêmen foram colocadas em um tubo de ensaio de 2 ml com tampa e aquecidas por dois a três minutos a 37 °C em uma unidade de aquecimento móvel (minitube). Após o preenchimento da câmara de contagem com três microlitros da amostra de sêmen, a câmara foi colocada dentro do Androscope (Androscope CASA system 12500/3000, minitube), previamente conectado a um computador. Após o foco, a cinemática e a motilidade dos espermatozoides foram examinadas. Pelo menos 8 campos aleatórios com um mínimo de 1.000 espermatozoides/amostra foram utilizados para análise. Os parâmetros de motilidade dos espermatozoides analisados incluíram motilidade total (%), motilidade progressiva (%), motilidade rápida (%), motilidade lenta (%), motilidade circular (%), motilidade local (%) e sem motilidade (%). Enquanto a cinemática dos espermatozoides incluiu velocidade em linha curva (VCL) em $\mu\text{m/s}$, velocidade em linha reta (VSL) em $\mu\text{m/s}$, velocidade média do trajeto (VAP) em $\mu\text{m/s}$, distância em linha da curva (DCL), distância em linha reta (DSL), Distância média do trajeto (DAP), amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH) em μm , frequência de batimento da cauda (BCF) em Hz, atividade da cabeça (HAC) em rad, linearidade (LIN) em % e retilineariedade (STR) em %.

Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e posteriormente foi feito o histograma para a avaliação visual da curva de normalidade. A homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Para a comparação entre os grupos foi realizada ANOVA para dados paramétricos e quando o valor de p foi menor que 0,05, foi realizado o *post hoc* com teste de Tukey para múltiplas comparações. As análises foram realizadas utilizando o software R versão 4.4.1, sendo considerado como significativo o valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Este trabalho traz de forma inédita os resultados do efeito da adição do extrato de Jatobá na viabilidade espermática pós-descongelamento do sêmen bovino, de modo que estes resultados, considerando a metodologia utilizada, podem indicar o caminho para o estudo deste extrato vegetal nesta seara. Os efeitos destacados foram negativos quanto a cinética espermática e não demonstraram nenhum efeito positivo quanto às variáveis de cinemática espermática obtidas por análise computadorizada do sêmen ($p > 0,05$).

Como demonstrado a seguir na tabela 4, com relação a cinética espermática, na primeira coleta os resultados da motilidade total (%), motilidade progressiva (%), motilidade rápida foram estatisticamente superiores no grupo controle em relação a grupo com 1% de extrato aquoso de polpa de jatobá e não diferiu do grupo com 0,5% de extrato. Não se observou diferença significativa entre os grupos na motilidade lenta (%), motilidade circular (%) e motilidade local (%). Os espermatozoides imóveis foram menores no grupo controle quando comparado com o grupo com 1% de extrato. Na segunda coleta não se observou diferenças significativas entre os grupos com relação às motilidades: total, progressiva, rápida, lenta e local. A motilidade circular foi maior no grupo controle e os espermatozoides imóveis foram menores no grupo com 1% de extrato de jatobá.

Tabela 4. Média e respectivos erros padrão das variáveis relacionadas com a cinética espermática das amostras de sêmen criopreservadas com adição de extrato de Jatobá, dívida entre a primeira e segunda coleta de sêmen.

1ª coleta				
Variáveis	Tratamentos			
	Pré- congelção	Controle	0,5%	1%
Motilidade total (%)	86,5 ± 4,5 ^a	52,7 ± 4,2 ^b	47,5 ± 3,1 ^{bc}	31,7 ± 4,7 ^c
Motilidade progressiva (%)	81,6 ± 5,5 ^a	40,8 ± 5,4 ^b	34,1 ± 4,9 ^{bc}	24,2 ± 6,2 ^c
Motilidade rápida (%)	63,5 ± 5,3 ^a	24,9 ± 4,9 ^b	21,4 ± 3,8 ^{bc}	14,4 ± 4 ^c
Motilidade lenta (%)	8,7 ± 1,6 ^a	13,6 ± 1,7 ^a	11,05 ± 1,6 ^a	9,1 ± 2 ^a
Motilidade circular (%)	9,3 ± 1,6 ^a	2,2 ± 0,8 ^b	1,4 ± 0,5 ^b	0,6 ± 0,1 ^b
Motilidade local (%)	4,8 ± 1,1 ^a	10,7 ± 1,4 ^b	10,6 ± 0,7 ^b	9,2 ± 1,1 ^b
Imóveis (%)	13,4 ± 4,5 ^c	47,1 ± 3,8 ^b	55,31 ± 4,2 ^{ab}	66,8 ± 6,2 ^a

2ª Coleta				
Tratamentos				

Variáveis	Pré-congelação	Controle	0,5%	1%
Motilidade total (%)	86,3 ± 3,7 ^a	44,2 ± 7,1 ^b	31,6 ± 3,8 ^b	28,1 ± 4,8 ^b
Motilidade progressiva (%)	81,5 ± 4,3 ^a	34,2 ± 6,8 ^b	21,8 ± 3,6 ^b	19,5 ± 4 ^b
Motilidade rápida (%)	63,4 ± 5,1 ^a	20,8 ± 5,2 ^b	13,5 ± 2,6 ^b	11,8 ± 2,9 ^b
Motilidade lenta (%)	8,7 ± 2,4 ^a	12 ± 1,7 ^a	8,1 ± 1,5 ^a	7,4 ± 1,5 ^a
*Motilidade circular (%)	9,2 ± 1,8 ^a	1,4 ± 0,5 ^a	0,76 ± 0,3 ^b	0,73 ± 0,2 ^b
Motilidade local (%)	4,8 ± 1,1 ^a	9,8 ± 0,9 ^b	9,5 ± 0,8 ^b	9 ± 1,1 ^b
Imóveis (%)	13,7 ± 3,7 ^a	55,8 ± 7,1 ^b	68,3 ± 3,8 ^b	71,9 ± 4,8 ^c

Diferentes letras subscritas na mesma linha representam significância estatística ($p \leq 0,05$) na comparação entre os grupos. * Variável não paramétrica

Apesar da comprovada atividade antioxidante do extrato da polpa de Jatobá (Lopes, 2018), sua adição ao diluidor de criopreservação não trouxe melhora nos parâmetros de cinética espermática relacionados à fertilidade do sêmen. ($p > 0,05$). Fato que discorda de achados em estudos anteriores com outros extratos vegetais que possuem substâncias em comum e atividade antioxidante semelhante com o extrato abordado na presente pesquisa.

Podem ser citados estudos como o de Tvardá, et al. (2020) que demonstrou a eficácia das propriedades protetoras e antioxidantes do extrato de Omija (*Schisandra chinensis*) contra danos oxidativos aos espermatozoides bovinos, porém o que chama a atenção na comparação com este artigo é a utilização de concentrações significativamente mais baixas, obtendo melhores resultados com 0,005% do extrato avaliado. Isso pode sugerir uma alteração metodológica para futuros estudos com o Jatobá.

Utilizando concentrações similares em meio diluente básico, Merati e Farshad (2019) realizaram experimentos com extrato de gengibre, em que a análise através do CASA demonstrou condições de motilidade espermática superiores no sêmen descongelado em meio diluente adicionado de 1 e 2% do extrato de gengibre quando comparado com o grupo controle. No trabalho de Zhao et al. (2009) à medida que as concentrações do extrato aquoso de *Rhodiola Sacra* aumentam a motilidade espermática também aumenta, atingindo o pico de motilidade na

concentração de 4 e 6 mg/mL. Nestes dois casos, por se tratarem de pesquisas realizadas com sêmen ovino e de sêmen de Javali respectivamente, abre-se um precedente para o teste do extrato de Jatobá em sêmen de outras espécies com diferentes sensibilidades à oxidação devido a variação na composição seminal.

Já com relação a cinemática espermática da primeira e segunda coleta não se observou diferenças significativas entre os grupos, considerando a manutenção destes parâmetros relatados abaixo na tabela 5, pode se tratar de um indicativo favorável para o incentivo de novos estudos envolvendo o extrato em questão e o congelamento sêmen.

Tabela 5. Médias e respectivos erros padrão das variáveis relacionadas com a cinemática espermática das amostras de sêmen criopreservadas com adição de extrato de Jatobá.

1^a coleta				
Variáveis	Tratamentos			
	Pré-congelação	Controle	0,5%	1%
VCL	$192,6 \pm 14,1^a$	$106,4 \pm 11,2^b$	$106,7 \pm 9,8^b$	$95,3 \pm 6,4^b$
VSL	$83,5 \pm 7,7^a$	$41,4 \pm 5,4^b$	$37,5 \pm 4,4^b$	$31,7 \pm 1,9^b$
VAP	$97 \pm 7,7^a$	$50,7 \pm 6,7^b$	$48,1 \pm 5,4^b$	$41,8 \pm 2,6^b$
DCL	$50 \pm 2,6^a$	$35,5 \pm 2,8^b$	$34,3 \pm 2,6^b$	$31,1 \pm 2,1^b$
DSL	$21,1 \pm 1,9^a$	$13,5 \pm 1,7^b$	$11,7 \pm 1,4^b$	$9,9 \pm 0,7^b$
DAP	$25,1 \pm 1,7^a$	$16,8 \pm 1,8^b$	$15,2 \pm 1,4^b$	$13,3 \pm 0,8^b$
ALH	$3,9 \pm 0,2^a$	$2,6 \pm 0,3^b$	$2,6 \pm 0,2^b$	$2,45 \pm 0,2^b$
BCF	$14,4 \pm 1,3^a$	$12,1 \pm 0,8^{ab}$	11 ± 1^{ab}	$9,7 \pm 0,6^b$
HAC	$0,48 \pm 0,03^a$	$0,34 \pm 0,03^b$	$0,34 \pm 0,02^b$	$0,31 \pm 0,02^b$
LIN	$0,44 \pm 0,02^a$	$0,41 \pm 0,03^a$	$0,36 \pm 0,01^a$	$0,35 \pm 0,01^a$
STR	$0,75 \pm 0,05^a$	$0,76 \pm 0,03^a$	$0,74 \pm 0,02^a$	$0,73 \pm 0,01^a$

2ª Coleta

Variáveis	Tratamentos			
	Pré-congelação	Controle	0,5%	1%
VCL	200,6 ± 18,5 ^a	100,6 ± 6,9 ^b	94,3 ± 4,7 ^b	95,2 ± 6,7 ^b
VSL	82,2 ± 7,7 ^a	37,2 ± 3,9 ^b	31,6 ± 1,9 ^b	33,3 ± 2,7 ^b
VAP	97,4 ± 9,5 ^a	46 ± 3,8 ^b	40,1 ± 1,9 ^b	42,9 ± 3,1 ^b
DCL	51,4 ± 2,3 ^a	34,7 ± 2,4 ^b	31,2 ± 2,6 ^b	30,3 ± 1,7 ^b
DSL	20,6 ± 1,9 ^a	12,6 ± 1,4 ^b	9,9 ± 1,4 ^b	9,8 ± 0,6 ^b
DAP	24,9 ± 1,6 ^a	15,8 ± 1,4 ^b	13,2 ± 0,7 ^b	13,1 ± 0,7 ^b
ALH	4,1 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,08 ^b	2,3 ± 0,1 ^b	2,4 ± 0,1 ^b
BCF	14,08 ± 1 ^a	12,2 ± 0,9 ^{ab}	10,2 ± 0,4 ^{ab}	9,5 ± 0,4 ^b
HAC	0,52 ± 0,05 ^a	0,31 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,01 ^a	0,31 ± 0,02 ^a
LIN	0,43 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,02 ^{ab}	0,35 ± 0,01 ^b	0,36 ± 0,01 ^{ab}
STR	0,8 ± 0,03 ^a	0,77 ± 0,02 ^a	0,73 ± 0,01 ^a	0,74 ± 0,009 ^a

Legenda: VCL - Velocidade em linha curva- $\mu\text{m/s}$, VSL - Velocidade em linha reta- $\mu\text{m/s}$, VAP - Velocidade trajetória média- $\mu\text{m/s}$, DCL - Distância em linha curva, DSL - Distância em linha reta, DAP - Distância média do trajeto, ALH - Amplitude do deslocamento - μm , BCF - Frequência no cruzamento - Hz, HAC - Atividade da cabeça - rad, LIN - Linealidade, STR - integridade. Diferentes letras subscritas na mesma linha representam significância estatística ($p \leq 0,05$) na comparação entre os grupos.

Dentre os parâmetros comparados na tabela 5, o VAP (velocidade em trajetória média) é o parâmetro com maior relação com capacidade de fertilização do espermatozoide. Também com alta relevância diante da fertilidade espermática se encontra o VSL (velocidade em linha reta), ambos os parâmetros têm influência direta com a velocidade em que um determinado espermatozoide é capaz de chegar ao oócito (Nagy, 2015).

Outro ponto relevante da tabela 5 é o parâmetro DAP (distância trajetória média), que representa um importante aspecto para a fertilidade relacionando-se principalmente com a atividade mitocondrial espermática (Madeja, 2021; Blagojević, 2024), percebe-se que os grupos com maior presença do extrato mantiveram o percentual de vários indicadores em relação ao grupo controle. O que pode indicar que, com uma correção nos métodos de utilização do extrato estes parâmetros poderiam ser altamente beneficiados, melhorando a fertilidade o sêmen pós congelamento.

Dessa forma pode-se considerar como hipóteses quanto à ausência de resultados positivos do uso do extrato aquoso de polpa de jatobá, a concentração de extrato utilizada, que pode ser alterada para estudos futuros; o período de incubação do sêmen em contato com o diluente acrescido do extrato e o tempo de incubação do próprio extrato em contato com o diluente, assim como a forma e integração e um ao outro, estes podem estar relacionados tanto à capacidade de transferência das propriedades antioxidantes do extrato para o meio quanto do extrato para os próprios espermatozoides; e também o tipo e diluente comercial, cujo alguns componentes não levados em consideração podem interferir no resultado.

CONCLUSÃO:

O presente estudo revelou que a adição da polpa de extrato de jatobá a 0,5 e 1% não melhorou os parâmetros de cinética espermática. O extrato a 1%, diminuiu os valores de motilidade total progressiva, motilidade rápida e aumento do percentual de espermatozoides imóveis. Ressalta-se, no entanto, que apesar da ausência de resultados positivos, é promissor o estudo da utilização do extrato da polpa de jatobá, já que dentre a porcentagem remanescente de espermatozoides móveis os parâmetros de cinemática mais importantes relacionados à fertilidade individual de cada célula se mantiveram. Portanto há a necessidade de novos estudos utilizando novas concentrações do extrato, novos métodos de integração e diluentes diferentes.

REFERÊNCIAS:

- ALVES, E.R. de A.; CONTINI, E.; GASQUES, J.G. Evolução da produção e produtividade da agricultura brasileira. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. da (Ed.). Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, v.1, p.67, 2008.
- AMIDI, F. et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank**, Dordrecht, v.17, p.745-756, 2016.
- ARAKAKI, D. G. **Atividade antioxidante in vitro e in vivo da polpa do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.)** 2015. 63f. Dissertação (Mestrado em nutrição e metabolismo) – Universidade Federal de Mato Grosso do sul, Campo Grande, 2015.
- ASBIA -Associação Brasileira de Inseminação Artificial Index Asbia 2021. 2021.
- BLAGOJEVIĆ, J. et al. Impact of Supplemented Nutrition on Semen Quality, Epigenetic-Related Gene Expression, and Oxidative Status in Boars. **Animals**, v. 14, n. 22, p. 3297, 2024.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA. 3ed. Belo Horizonte, 2013, 104p.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.104, p.119-131, 2008.
- CRESPILHO, A. M. et al. Effect of adding taurine to a TRIS-based egg yolk extender on the viability of bull semen cooled at 5°C. **In: International Ruminant Reproduction Symposium**, 8, 2010, Anchorage, Abstract... Anchorage, USA: 2010.
- FERNANDEZ-NOVO, A. et al. Effect of extender, storage time and temperature on kinetic parameters (CASA) on bull semen samples. **Biology**, v.10, 806, 2021.
- GROTTER, L. G. et al. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reprod. Domest. Anim.**, Hamburgo, v.54, p.655-665, 2019.
- LOPES, G. F. **Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos aquoso e etanólico da polpa dos frutos de *Hymenaea stigonocarpa***. 2018. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Paranaense, Umuarama, 2018.
- NAGY, Á. et al. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, n. 3, p. 370-381, 2015.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- MADEJA, Z. E. et al. Mitochondria content and activity are crucial parameters for bull sperm quality evaluation. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1204, 2021.

- MERATI, Z.; FARSHAD, A. Ginger and echinacea extracts improve the quality and fertility potential of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.1, n.92, p.138-145, 2020
- PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in reproductive medicine**, v.20, n.1, p. 5-13, 2002.
- PINTO, S. S. C. et al. Impact of adding different concentrations of IGF-I and insulin to the semen extender on bull sperm quality post-cryopreservation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.75, n.5, p.771-786, 2023.
- OMBELET W., VAN ROBAYS J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. **Facts, views & vision in ObGyn**. Wetteren, Bélgica, v.7, n,2, p.137, 2015.
- SPALLANZANI, L. **Dissertations relative to the natural history of animals and vegetables**. London: J. murray, 1789.
- SOUZA, W. L. et al. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesq. Vet. Bras.** v. 36, n. 7, p. 657-664, julho, 2016.
- TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological endocrinology**, Carnforth, v. 26, n. 8, p. 563-567, 2010.
- TREULEN, F. et al. Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. **Cryobiology**, San Diego, v. 83, p. 65-74, 2018.
- TVRDÁ, E. et al. Characterization of the Omija (*Schisandra chinensis*) extract and its effects on the bovine sperm vitality and oxidative profile during in vitro storage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, n. 1, p. 7123780, 2020.
- WHALEY, D. et al. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. **Cell Transplantation**, Elmsford, v.30, p. 0963689721999617, 2021.
- ZHAO, H.W et al. Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 849-857, 2009.

3. CONCLUSÃO

1. O presente estudo revelou que a adição da polpa de extrato de jatobá a 0,5 e 1% não melhorou os parâmetros de cinética espermática. O extrato a 1%, diminuiu os valores de motilidade total progressiva, motilidade rápida e aumento do percentual de espermatozoides imóveis.

2. Ressalta-se, no entanto, que apesar da ausência de resultados positivos, é promissor o estudo da utilização do extrato da polpa de jatobá, já que dentre a porcentagem remanescente de espermatozoides móveis os parâmetros de cinemática mais importantes relacionados à fertilidade individual de cada célula se mantiveram, além da manutenção da integridade de membrana. Portanto há a necessidade de novos estudos utilizando novas concentrações do extrato, novos métodos de integração e diluentes diferentes.

4 ANEXOS

ANEXO 1 - Normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 2), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 2), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 2). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 2), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com o número do ORCID e com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*.
* na submissão usar somente o Keyword (Step 3) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas

as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. *et al.* Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

**UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR**

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Universidade Paranaense - UNIPAR LTDA

Coordenadoria de Pós-Graduação - COPG

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DA POLPA DO JATOBÁ (HYMENAEA STIGONOCARPA) FRENTE A VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO", protocolo 41405/2024, sob a responsabilidade de RANULFO PIAU JUNIOR, - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata , subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Paranaense - UNIPAR em reunião realizada em 25/03/2024.

We hereby certify that the project "EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DA POLPA DO JATOBÁ (HYMENAEA STIGONOCARPA) FRENTE A VIABILIDADE DO SÊMEN BOVINO", protocol n.41405/2024, under the responsibility of RANULFO PIAU JUNIOR - involving production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (with the exception of Man), for scientific or teaching purposes - complies with Law n. 11,794, published on October 8, 2008, by Decree n. 6,899 of July 15, 2009, and with norms published by the Brazilian Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA), and approved by the COMMITTEE FOR ETHICS IN THE USE OF ANIMALS (CEUA) of UNIPAR - Universidade Paranaense at the meeting held on 03/25/2024.

UMUARAMA - PR, 21/07/2025.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Belettini', is written over a faint, circular stamp.

Salviano Tramontin Belettini
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº:41405