



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA PROFISSIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

RENATA SÁ DE CASTRO PIRES

BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO DE “MORINGA OLEIFERA” COMO
CRIOPROTETOR DE AÇÃO EXTRACELULAR EM PROTOCOLOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO EM DILUENTE À BASE DE ÁGUA
DE COCO EM PÓ (ACP-101c)

FORTALEZA – CEARÁ

2020

RENATA SÁ DE CASTRO PIRES

BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO DE “MORINGA OLEIFERA” COMO
CRIOPROTETOR DE AÇÃO EXTRACELULAR EM PROTOCOLOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO EM DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE
COCO EM PÓ (ACP-101c)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Torres Mesquita.

FORTALEZA – CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Pires, Renata Sa de Castro.

Bioprospecção do óleo de Moringa oleifera como crioprotetor de ação extracelular em protocolos de criopreservação de sêmen caprino em diluente à base de água de coco em pó (ACP-101c) [recurso eletrônico] / Renata Sa de Castro Pires. - 2020.
65 f. : il.

Dissertação (MESTRADO PROFISSIONAL) -
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Mestrado, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Pós-Dr. Jose Ferreira Nunes.
Coorientação: Prof. Dr. Fernando Lucas Torres Mesquita.

1. Criopreservação. 2. Caprino. 3. Sêmen. 4.

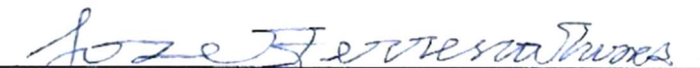
RENATA SÁ DE CASTRO PIRES


BIOPROSPECÇÃO DO ÓLEO DE “MORINGA OLEIFERA” COMO
CRIOPROTETOR DE AÇÃO EXTRACELULAR EM PROTOCOLOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO EM DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE
COCO EM PÓ (ACP-101c)

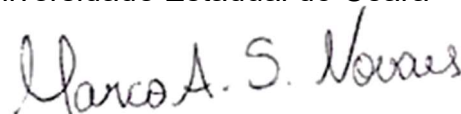
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 18 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Ferreira Nunes (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof.^a Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof. Dr. Marco Aurélio Schiavo Novaes
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Às pessoas mais importantes na minha vida, sem as quais não teria chegado aonde cheguei: ao meu amor (Renato M. Melo), aos meus filhos (Tomás e Olívia), aos meus familiares e a todos os meus amigos que colaboraram direto ou indiretamente nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo o caminho percorrido nesse trabalho.

À minha família, pelo todo apoio, encorajando e dando toda força necessária para chegar a esse momento, aos meus pais Paulo e Celina, à minha irmã Roberta, aos meus sogros Nonato e Francisca, às minhas cunhadas Fernanda, Flavia e Ana.

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pela a oportunidade, orientações e confiança.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pela sua competência e confiança.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Schiavo Novaes, por aceitar o convite de participar da banca.

À amiga e MSc. Juliana Ramos, pelo incentivo.

A todos que fazem o Programa Profissional de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, em especial ao Cláudio e à Celina, por toda atenção, colaboração e paciência.

Aos colegas da 3^a Turma do PPGBiotec, que apesar dos poucos encontros, se fortaleceu em busca do objetivo.

A todos os integrantes do Laboratório de Tecnologia do Sêmen de Caprinos e Ovinos, em especial: Marcimar, Bárbara, Leonardo, Bruna, Samuel, Karmille e Vitória.

Ao MSc. Marcimar Silva Souza, pela sua colaboração, dedicação, orientação e paciência durante toda a realização desse projeto.

À MSc. Bruna Farias Brito, pela sua colaboração, dedicação, orientação e por ter me socorrido quando mais precisei.

A todos os meus familiares pela confiança e apoio.

Aos meus amigos, pela amizade, por todo amor, carinho, paciência e conselhos.

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

Substâncias de origem animal, como gema de ovo (GO) e leite desnatado, são amplamente empregados na preservação do sêmen, mas representam um risco potencial na contaminação do mesmo. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do óleo de *Moringa oleifera* (MO) como crioprotetor de ação extracelular em protocolos de criopreservação de sêmen caprino em diluente à base de água de coco em pó (ACP-101c). Todos os ejaculados utilizados no estudo foram provenientes de reprodutores que apresentaram qualidade seminal dentro dos parâmetros estabelecidos pelo CBRA em 2013 para sêmen fresco. O diluente ACP-101c foi preparado e fracionado em quatro alíquotas: T1 (controle: ACP-101c + 5% GO), T2 (ACP-101c + 0,5% MO), T3 (ACP-101c + 1,0% MO), e T4 (ACP-101c + 2,5% MO). Após cada coleta e pré-avaliação, os ejaculados foram reunidos em um *pool*, homogeneizados, divididos em quatro alíquotas e diluídos nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 acima. Em seguida, cada tratamento foi fracionado em duas alíquotas, e uma foi mantida em banho Maria a 37 °C por duas horas para realização do teste de termorresistência (TTR) e a outra submetida a curva de refrigeração (-0,35 °C/min.) até atingir 4 °C. Já para o protocolo de congelação elaborou-se um meio-base contendo ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/mL de antimicrobiano (MB), em seguida o mesmo foi fracionado em cinco alíquotas e a estas foram adicionados os crioprotetores externos segundo os tratamentos: T1 (controle – MB + 5,0% GO), T2 (MB + 0,5% MO), T3 (MB + 1,0% MO), T4 (MB + 2,5% MO), e T5 (MB + 5,0% MO). Após cada coleta e pré-avaliação, os ejaculados foram reunidos em um *pool*, homogeneizados, divididos em cinco alíquotas e diluídos nos tratamentos T1 a T5 acima. Em seguida, as amostras foram refrigeradas até 4 °C (-0,35 °C/min), envasadas em palhetas de 0,25 ml, congeladas em vapor de nitrogênio (-60 °C) e armazenadas em botijões criogênicos -196 °C. O sêmen fresco diluído foi avaliado quanto à cinética espermática e submetido ao teste de termorresistência (TTR). O sêmen refrigerado foi avaliado somente quanto à cinética espermática. Já o sêmen pós-descongelação, foi avaliado quanto à cinética, à integridade de acrossoma, à integridade de membrana espermática, à atividade mitocondrial, e à morfologia espermática. Dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que o óleo da *M. oleifera* adicionado ao meio de conservação de sêmen caprino à base de água de coco em pó (ACP-101c) não apresenta toxicidade aos espermatozoides e preserva

a qualidade espermática, em protocolos de refrigeração a 4 °C, dentro dos valores preconizados para a espécie caprino. No entanto, o óleo de moringa não foi eficaz em proteger a membrana espermática durante o processo de congelação-descongelação, tornando-se necessários novos estudos para aprimorar o meio de criopreservação.

Palavras-chave: Criopreservação. Caprino. Sêmen. Água de coco em pó. Crioprotetores. *Moringa oleifera*.

ABSTRACT

Substances of animal origin, such as egg yolk (EY) and skimmed milk, are widely used in the preservation of sperm, but represent a potential risk of contamination. The present study aimed to evaluate the effect of *Moringa oleifera* (MO) oil as a cryoprotectant of extracellular action in goat sperm cryopreservation protocols in powdered coconut water diluent (ACP-101c). All ejaculates used in the study came from breeders that showed seminal quality within the parameters established by CBRA in 2013 for fresh sperm. The ACP-101c diluent was prepared and divided into four aliquots: T1 (control: ACP-101c + 5% EY), T2 (ACP-101c + 0.5% MO), T3 (ACP-101c + 1.0% MO), and T4 (ACP-101c + 2.5% MO). After each collection and pre-evaluation, the ejaculates were pooled, homogenized, divided into four aliquots and diluted in the T1 to T4 treatments above. Then, each treatment was divided into two aliquots, and one was kept in a water bath at 37 ° C for two hours to perform the thermo-resistance test (TRT) and the other submitted to a refrigeration curve (-0.35 ° C / min.) until it reaches 4 ° C. As for the freezing protocol, a base medium was prepared containing ACP-101c + 7% glycerol + 0.8 mg / mL of antimicrobial (BM), then it was divided into five aliquots and cryoprotectants were added to these, according to treatments: T1 (control - BM + 5.0% EY), T2 (BM + 0.5% MO), T3 (BM + 1.0% MO), T4 (BM + 2.5% MO), and T5 (BM + 5.0% MO). After each collection and pre-evaluation, the ejaculates were pooled, homogenized, divided into five aliquots and diluted in treatments T1 to T5 above. Then, the samples were refrigerated to 4 ° C (-0.35 ° C / min.), filled in 0.25 mL straws, frozen in nitrogen vapor (- 60 ° C) and stored in cryogenic cylinders -196 °C. Fresh diluted sperm was evaluated for kinetics parameters and subjected to TRT. Cooled sperm was evaluated only for kinetics parameters. The post-thaw sperm was evaluated for kinetics, acrosome integrity, sperm membrane integrity, mitochondrial activity, and sperm morphology. From the results obtained in the present study, it can be concluded that *M. oleifera* oil added to the goat preservation medium based on powdered coconut water (ACP-101c) is not toxic to spermatozoa and preserves sperm quality, in cooling protocols at 4 °C, within the values recommended for the goat species. However, moringa oil was not effective in protecting the sperm membrane during the freeze-thaw process, making further studies necessary to improve the cryopreservation medium.

Keywords: Cryopreservation. Goat. Sperm. Coconut water powder. Cryoprotectants.
Moringa oleifera.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação gráfica da análise de velocidades e amplitude de deslocamento lateral da cabeça através do software <i>Sperm Class Analyzer</i> (SCA[®], Microptics, S.L., Barcelona, Espanha).....	23
Figura 2 –	Avaliação do acrossoma espermático utilizando a sonda fluorescente FITC-PSA.....	26
Figura 3 –	Água de coco em pó específica para criopreservação de sêmen de caprinos e ovinos (ACP-101/102c).....	30
Quadro 1 –	Características do ejaculado de caprinos coletados por vagina artificial.....	21
Quadro 2 –	Características desejáveis para a dose de espermatozoides refrigerados.....	21
Quadro 3 –	Características desejáveis para dose de espermatozoides congelados.....	22
Quadro 4 –	Parâmetros de motilidade espermática obtidos através do software <i>Sperm Class Analyzer</i> (SCA[®], Microptics, S.L., Barcelona, Espanha).....	23
Quadro 5 –	Ácidos graxos presentes na <i>Moringa oleifera</i>.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros cinéticos do sêmen caprino fresco diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) sem e com a adição de óleo de moringa.....	45
Tabela 2 –	Porcentagem de motilidade total do sêmen caprino fresco diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de diferentes concentrações de óleo de moringa e submetido ao teste de termorresistência a 37 °C por duas horas.....	46
Tabela 3 –	Parâmetros cinéticos de sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) sem ou com a adição de óleo de moringa e refrigerado a 4 °C.....	47
Tabela 4 –	Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio-base (ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml antimicrobiano) sem e com a adição de óleo de moringa e avaliados após congelação-descongelação.....	48
Tabela 5 –	Parâmetros do sêmen caprino diluído em meio-base (ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml antimicrobiano) sem e com a adição de óleo de moringa e avaliados após congelação-descongelação através de microscopia de fluorescência.....	50
Tabela 6 –	Análise morfológica do sêmen caprino diluído em meio-base (ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml antimicrobiano) sem e com a adição de óleo de moringa e avaliados a fresco e após congelação-descongelação.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Água de coco em pó
ACP-101c	Meio de criopreservação para sêmen caprino à base de água de coco em pó
ACR	Espermatozoides com acrossoma danificado
AI	Acrossoma íntegro
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
AM alta	Atividade mitocondrial alta
AM baixa	Atividade mitocondrial baixa
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BCF	Frequência do batimento cruzado
CAB	Espermatozoides com alteração na cabeça
CASA	Sistema de análise de sêmen auxiliado por computador
CAU	Espermatozoide com alteração na cauda/flagelo
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FITC-PSA	Isotiocianato de fluoresceína conjugada a aglutinina do <i>Pisum sativum</i>
GC	Espermatozoide com presença de gota citoplasmática
GO	Gema de ovo de galinha
IA	Inseminação artificial
IAA	Ácido 3-indol-acético
IP	Iodeto de propídio
IPA	Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina
LIN	Linearidade
LTSCO	Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino
MB	Meio-base

MO	<i>Moringa oleifera</i>
MP	Percentual de espermatozoides móveis progressivos
MPI	Membrana plasmática íntegra
MT	Percentual de espermatozoides móveis totais
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
NOR	Espermatozoides morfológicamente normais
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PI	Espermatozoides com alteração na peça intermediária
SCA	<i>Sperm Class Analyser</i>
SPRD	Sem padrão racial definido
sptz	Espermatozoides
STR	Retilinearidade
TTR	Teste de termorresistência
UECE	Universidade Estadual do Ceará
VA	Vagina artificial
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade linear

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Caprinocultura.....	18
2.2	Inseminação artificial.....	19
2.3	Características e avaliações do sêmen caprino.....	20
2.3.1	Sistema de análise de sêmen auxiliado por computador (CASA).....	22
2.3.2	Morfologia espermática.....	24
2.3.3	Microscopia de fluorescência.....	25
2.3.3.1	<i>Integridade do acrossoma.....</i>	<i>26</i>
2.3.3.2	<i>Integridade da membrana plasmática</i>	<i>27</i>
2.3.3.3	<i>Atividade mitocondrial.....</i>	<i>27</i>
2.4	Diluentes seminais.....	28
2.4.1	Água de coco em pó.....	29
2.5	Crioprotetores.....	30
2.5.1	Glicerol.....	31
2.5.2	Gema de ovo.....	32
2.5.3	Moringa.....	33
2.6	Conservação seminal.....	35
2.6.1	Refrigeração.....	36
2.6.2	Congelamento.....	36
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	39
5	OBJETIVOS.....	40
5.1	Objetivo geral.....	40
5.2	Objetivos específicos.....	40
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
6.1	Animais experimentais.....	41
6.2	Diluentes para sêmen fresco e refrigerado.....	41
6.3	Protocolo para sêmen fresco e refrigerado.....	42

6.4	Diluentes para sêmen congelado.....	42
6.5	Protocolo para sêmen congelado.....	42
6.6	Avaliações espermáticas.....	42
6.7	Análises estatísticas.....	44
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
8	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXOS.....	64
	ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) em caprinos tem sido praticada em vários países, especialmente da Europa, onde a caprinocultura é uma atividade cultural. Entretanto, existe grande variação nos resultados, principalmente quando à utilização de sêmen congelado, o que permite questionamento acerca da metodologia aplicada (ANDRADE; MARQUES; LEITE, 1999).

Desde que os primeiros espermatozoides caprinos foram congelados, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando estabelecer protocolos de refrigeração e congelação do sêmen caprino (SMITH; POLGE, 1950), diferentes meios de conservação têm sido utilizadas como diluentes para o sêmen, a maioria dos quais são variações de diluentes pré-estabelecidos (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Acredita-se que o futuro da IA em caprinos depende do sucesso da congelação do sêmen, sendo necessários mais estudos para melhorar os meios e as técnicas utilizadas (MASCARENHAS, 1994).

O processo de refrigeração e reaquecimento afetam a integridade funcional e física das células espermáticas. É necessário que o diluente forneça energia, proteja aos espermatozoides contra danos relacionados às baixas temperaturas e mantenha um ambiente adequado para sua sobrevivência (EVANS; MAXWELL, 1987).

A água de coco, produto de origem vegetal, possui características que a classificam como um bom diluente, pois fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos (BLUME; MARQUES JR., 1994; SANTOS *et al.*, 2018).

Alguns componentes, que apresentam característica de proteger os espermatozoides, são incorporados aos diluentes, como a gema de ovo (crioprotetor de ação externa) ou glicerol (crioprotetor de ação interna). A principal função da gema de ovo é estabilizar as membranas biológicas e minimizar os efeitos negativos do choque térmico, principalmente com a reposição de fosfolipídios de membrana (BISPO *et al.*, 2011). Um dos fatores limitantes da gema de ovo corresponde ao risco biológico, devido ao fato de ser um meio de cultura para agentes infectantes como vírus e bactéria (JORDAN; PATTISON, 1996). Logo, a supressão de substâncias de origem animal em meios de conservação de sêmen tem sido sugerida, a fim de garantir a segurança sanitária nos processos biológicos (BOUSSEAU *et al.*, 1998; SAMPAIO NETO *et al.*, 2002; MELO, 2010).

Como alternativa para substâncias de origem animal, recomenda-se o uso de produtos de origem vegetal que tenham, em sua composição, substâncias similares aos crioprotetores convencionais, que possuam simplicidade de manipulação e sejam amplamente distribuídos na natureza, além de não causarem danos irreversíveis à célula. Uma opção é a *Moringa oleifera* (MO), suas folhas e sementes apresentam potencial nutricional e fornecem uma grande variedade e quantidade de proteínas essenciais, vitaminas e minerais. Sendo uma rica fonte de aminoácidos essenciais; entretanto, possui baixa quantidade de gorduras (FERREIRA *et al.*, 2008).

Tendo em vista o amplo uso da MO dentro da sociedade, diante dos seus constituintes, de seu potencial antioxidante e visando a busca por novos crioprotetores vegetais, se faz importante haver um estudo a respeito das características toxicológicas do composto lipídico (óleo de MO) para utilização na criopreservação de espermatozoides caprinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura

Os caprinos estão distribuídos por todos os continentes do planeta, no entanto, percebe-se uma maior concentração nos países em desenvolvimento. A criação de caprinos e ovinos foi a primeira atividade zootécnica desenvolvida pelo homem, uma vez que essas espécies foram as primeiras domesticadas. Os primeiros registros em pinturas rupestres dão testemunho desse princípio, há aproximadamente dez mil anos (ZEDER; HESSE, 2000; ZEUNER, 1963).

Desde então, esses pequenos e notáveis ruminantes estiveram presentes nos momentos mais marcantes da história e da evolução da humanidade. Como fonte permanente de alimento (carne e leite) e proteção (peles) eles deixaram suas origens africanas e acompanharam o homem nas conquistas da Europa, Ásia, Américas e Oceania (FONSECA; BRUSCHI, 2009).

No Brasil, os caprinos foram introduzidos pelos colonizadores portugueses, juntamente com os primeiros animais domésticos, por volta de 1535. A caprinocultura se faz presente em todas as regiões do país. Porém, 89,8% do efetivo do rebanho nacional está distribuído na região Nordeste, tendo como principais produtores os Estados da Bahia, Piauí, Pernambuco e Ceará (FIGUEIREDO *et al.*, 1987; FONSECA; BRUSCHI, 2009; MAIA, 1994; SILVA NETO, 1950).

No Nordeste, a caprinocultura é caracterizada em sua grande maioria pelo sistema extensivo de manejo. O sistema de criação adotado na região é também conhecido como sistema tradicional, apresenta-se geralmente em grandes áreas cujo rebanho é composto de animais sem raça definida ou por raças nativas. Há pouca especialização e produtividade (SANTOS, 2001). Contudo, a exploração de caprinos tem elevada importância social e econômica para a população rural e para a própria estrutura econômica das regiões onde é desenvolvida (NOGUEIRA FILHO; KASPRZYKOWSKI, 2006).

Desta forma, com o fortalecimento do sistema agroindustrial da caprinovinocultura nacional se faz necessário o aumento nos investimentos e avanços tecnológicos para os seus diversos segmentos, ou seja, produção, processamento dos seus produtos e comercialização. Dentre esses avanços, têm-se as diversas biotecnologias disponíveis para a intensificação do manejo reprodutivo, preconizando-

se a programação reprodutiva e distribuição dosaios e partos ao longo do ano, alicerçadas pelo uso racional da IA (SAKASHITA *et al.*, 2012).

O uso das biotécnicas, como a IA e a conservação de sêmen repercutem no aumento da produção animal, uma vez que estão diretamente relacionadas ao melhoramento genético, permitindo a obtenção de um maior número de animais de alta genética e seus produtos (DANTAS; NEGRÃO, 2010).

2.2 Inseminação artificial

A IA é a mais antiga biotécnica e que contribui mais rapidamente para o melhoramento genético dos rebanhos, e a biotécnica da reprodução mais utilizada atualmente em rebanhos de todo o mundo. Consiste no ato de introduzir, por meios instrumentais, o sêmen nas vias genitais da fêmea em condições tais que permitam aos espermatozoides encontrar o óvulo e fecundá-lo. Assim, a IA consta basicamente de três etapas: coleta do sêmen, manipulação do sêmen e deposição da dose do sêmen no sistema genital feminino, visando a fecundação (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1992).

As principais vantagens da IA em caprinos são: reduzir ou eliminar a presença de reprodutores na fazenda, barateando assim a custeio de manutenção do rebanho e facilitando o manejo; permitir que um reprodutor seja usado em um número de fêmeas muito maior do que quando em monta natural; proporcionar o uso de reprodutores geneticamente superiores e de reconhecida fertilidade acelerando assim o melhoramento genético dos rebanhos; permitir o uso de reprodutores caros, mesmo para os pequenos criadores, que não teriam poder aquisitivo para comprar ou manter um animal de elite; reduzir ou prevenir a transmissão de doenças venéreas; permitir o uso do material genético de reprodutores que já morreram ou que estejam impossibilitados de monta ou que estejam a longas distâncias. Além disso, permite a adoção de outras biotécnicas reprodutivas referentes à indução de estro e reprodução fora da estação reprodutiva, permitindo a programação dos partos, facilitando o manejo e oferecendo cabritos na melhor época ao mercado (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1992; NEVES *et al.*, 2008; TRALDI *et al.*, 1994).

O sêmen utilizado na técnica de IA pode ser de três formas: fresco, refrigerado ou congelado. O sêmen fresco tem uma maior viabilidade ou longevidade

quando comparado ao congelado-descongelado, e o sêmen refrigerado apresenta condição intermediária entre os dois métodos (FONSECA *et al.*, 2014).

Na espécie caprina, muitas etapas devem ser respeitadas para o sucesso da IA, que vai desde a infraestrutura básica da propriedade, seleção do tipo de sêmen a ser utilizado, seleção das fêmeas a serem inseminadas, até o diagnóstico de gestação (BEZERRA, 2010). Além disso, ainda existe uma grande variação nos resultados, principalmente quando à utilização de sêmen congelado, o que permite questionamento acerca da metodologia aplicada (ANDRADE; MARQUES JR.; LEITE, 1999). Acredita-se que o sucesso da IA em caprinos possa estar relacionado à congelamento do sêmen, sendo necessários mais estudos para melhorar os meios e as técnicas utilizadas (MASCARENHAS, 1994).

2.3 Características e avaliações do sêmen caprino

O sêmen é uma suspensão celular líquida contendo espermatozoides e secreções do trato genital masculino. Os espermatozoides são produzidos nos testículos e a porção fluida (plasma seminal) desta suspensão é produzida pelas glândulas acessórias no momento da ejaculação. O plasma seminal é um componente essencial na cobertura natural, que serve como carreador e protetor dos espermatozoides (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O sêmen caprino apresenta particularidades que o diferencia do sêmen de outras espécies. A mais importante e característico do sêmen caprino é a síntese e secreção de enzima pelas glândulas bulbouretrais, liberadas no plasma seminal (SAKASHITA *et al.*, 2012; SIMPLÍCIO; MACHADO, 1989).

O plasma seminal dos caprinos é rico em fosfolipase “A”, que ao interagir com os fosfolipídios da maioria dos diluentes, catalisa a hidrólise de lecitina presente na gema de ovo e liberam ácidos graxos e lisolecitinas, responsáveis pela ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática que são altamente tóxicos para os espermatozoides (AAMDAL; LYNGSET; FOSSUM, 1965; CORTEEL, 1974; IRITANI; NISHIKAWA, 1961; ROY, 1957; SAKASHITA *et al.*, 2012). A reação de hidrólise promove uma atividade fusogênica na membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008; GIBBONS, 2002). Em função dos efeitos deletérios, a composição enzimática do sêmen do bode e os diluentes assumem grande

importância no processo de conservação do sêmen congelado ou refrigerado (SIMPLÍCIO; MACHADO, 1989).

A colheita desse sêmen é usualmente efetuada por meio de vagina artificial (VA) um instrumento que simula as condições de pressão e temperatura de uma vagina natural. Para a coleta, é necessário utilizar uma cabra com estro induzido ou natural como manequim, para que o macho realize o salto. O manipulador deve desviar o pênis do animal, segurando pelo prepúcio e em direção a VA. É de extrema importância a manutenção do sêmen sob a proteção da luz solar e poeira, bem como evitar agitações bruscas (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

Após a coleta, o sêmen caprino deve ser avaliado conforme as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Os ejaculados são avaliados quanto ao volume (0,5 a 2,0 ml), cor (branca a acinzentada), aspecto (cremoso, leitoso ou aquoso), turbilhonamento (0-5), vigor (0-5), motilidade total (0-100%), viabilidade, morfologia e a concentração espermática, sendo esta, mensurada em câmara de Neubauer (espermatozoides/mm³) (Quadro 1-3) (MANUAL..., 2013).

Quadro 1 - Características do ejaculado de caprinos coletados por vagina artificial

Características	Valores
Volume	0,5 – 1,5 ml
Cor	Branca ou amarelo-marfim
Odor	“sui generis”
Movimento de massa	≥ 4
Motilidade espermática	80 (70-90%)
Vigor	≥ 3
Concentração espermática	2-5 x 10 ⁹ / ml
Nº total espermatozoides/ejaculado	3-5 x 10 ⁹
Espermatozoides morfolologicamente normais	≥ 80%

Fonte: Adaptado de CBRA (MANUAL..., 2013).

Quadro 2 - Características desejáveis para a dose de espermatozoides refrigerados

Características	Valores
Motilidade espermática	≥ 60%
Vigor	≥ 3
Dose inseminante convencional	150x10 ⁶ sptz móveis
Volume da dose	0,025 - 0,050 ml
Espermatozoides normais	≥ 80%
Defeitos maiores	≤ 10%

Fonte: Adaptado de CBRA (MANUAL..., 2013). Sptz = espermatozoides.

Quadro 3 - Características desejáveis para dose de espermatozoides congelados

Características	Valores
Motilidade espermática	≥ 30%
Vigor	≥ 2
Nº sptz por palheta (0,25 e 0,50)	40x10 ⁶ móveis
Espermatozoides normais	≥ 80%
Defeitos maiores	≤ 10%

Fonte: Adaptado de CBRA (MANUAL..., 2013). Sptz = espermatozoides.

2.3.1 Sistema de análise de sêmen auxiliado por computador (CASA)

A avaliação da cinética espermática é essencial na análise da qualidade do sêmen (MATOS *et al.*, 2008). Com intuito de amenizar a variabilidade devido a subjetividade, foram desenvolvidos vários sistemas de Análise de Sêmen Auxiliada por Computador (CASA – *Computer-assisted Sperm Analyser*), definida como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozoide (AMANN; KATZ, 2004).

O CASA permite uma mensuração objetiva de diferentes características da cinética espermática, mostrando alto nível de precisão e segurança, sendo atualmente utilizado como uma ferramenta para melhorar o nosso conhecimento e habilidade para manipular espermatozoides. Esse sistema tem demonstrado ser uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos experimentais (FARREL *et al.*, 1996), na pesquisa de novos diluentes seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamento (AMANN; KATZ, 2004). Como também, tem sido valioso na quantificação da hiperativação, no estabelecimento da relação entre qualidade do sêmen do doador e a verdadeira fertilidade da amostra e nas avaliações gerais da conveniência do uso de machos para reprodução (FARREL *et al.*, 1996; MATOS *et al.*, 2008; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Os parâmetros cinéticos comumente obtidos através de analisadores de sêmen computadorizados são: motilidade total (MT, motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear (VSL), linearidade (LIN), índice de oscilação ou retilinearidade (STR), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), e frequência do batimento cruzado (BCF) (Quadro 4; ARRUDA *et al.*, 2011; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

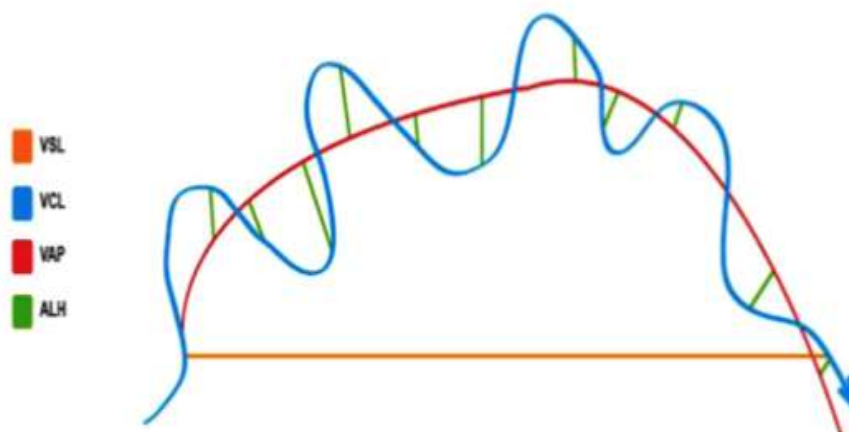
Os três parâmetros de velocidade (VCL, VAP, VSL) são comumente utilizados para a descrição geral do movimento do espermatozoide, entretanto, para uma avaliação adicional, foram estabelecidos os parâmetros LIN e STR, que tratam das relações entre estas velocidades (Figura 1).

Quadro 4 - Parâmetros de motilidade espermática obtidos através do software *Sperm Class Analyzer* (SCA[®], Microoptics, S.L., Barcelona, Espanha)

Parâmetro	Sigla	Unidade	Descrição
Motilidade total	MT	%	Percentual de espermatozoides móveis
Motilidade progressiva	MP	%	Percentual de espermatozoides progressivos
Velocidade curvilínea	VCL	µm/s	Velocidade da trajetória real do espermatozoide
Velocidade média da trajetória	VAP	µm/s	Velocidade da trajetória média do espermatozoide
Velocidade linear	VSL	µm/s	Velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide
Linearidade	LIN	%	Relação percentual entre VSL e VCL
Índice de oscilação ou retilinearidade	STR	%	Relação percentual entre VAP e VCL
Amplitude do deslocamento lateral da cabeça	ALH	µm/s	Deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real em relação à trajetória média ou linear
Frequência do batimento cruzado	BCF	µm/s	Frequência que a cabeça do espermatozoide atravessa a trajetória média

Fonte: Adaptado de Mortimer (2000).

Figura 1 – Representação gráfica da análise de velocidades e amplitude de deslocamento lateral da cabeça através do software *Sperm Class Analyzer* (SCA[®], Microoptics, S.L., Barcelona, Espanha)



Fonte: Adaptado de Mortimer (2000).

2.3.2 Morfologia espermática

A análise morfológica deve ser realizada sob imersão (aumento de 1000x) onde as primeiras 200 células observadas são classificadas quanto aos defeitos de forma e estrutura. A estrutura do espermatozoide é formada por cabeça, colo, peça intermediária e flagelo, sendo este último subdividido em peça principal e peça terminal (BARTH; OKO, 1989; RICARTE; SILVA, 2010). A cabeça do espermatozoide é formada principalmente pelo núcleo. Entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo existe o acrossoma, uma estrutura de dupla camada de membranas que contém enzimas (hialuronidase e acrosina) responsáveis pela destruição do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida do oócito durante a fecundação (BEARDEN; FUQUAY, 1997; RICARTE; SILVA, 2010).

Como o espermatozoide é uma célula translúcida, sua visualização sob microscopia óptica comum não é muito nítida para avaliação do contorno celular; por isso, quando se dispõe somente de microscopia óptica comum deve-se fazer uso da técnica de esfregaço corado. De forma geral, as características morfológicas espermáticas são analisadas usualmente utilizando-se esfregaços corados como Rosa de Bengala, Giemsa, eosina-nigrosina, azul de bromofenol e outros (MANUAL..., 2013).

A alta frequência de espermatozoides morfológicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região: cabeça, peça intermediária e cauda, ou em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (HOWARD; PACE, 1988).

As anormalidades são expressas em porcentagem, sendo nomeadas em classificação de Blom e Christensen (1951 *apud* MANUAL..., 2013), que são subclassificadas em defeitos primários, quando apresentam as seguintes anormalidades: cabeça piriforme, cabeça em raquete, macrocefalia, microcefalia picnose, cabeça anormal solta, forma abortiva, cauda enrolada na cabeça, forma dupla, inserção abaxial, defeito na peça intermediária ou defeito do acrossoma (*knobbed*). E em defeitos secundários, quando apresentam as seguintes anormalidades: cabeça anormal solta, gota proximal, gota distal, *bent tail* ou acrossoma.

Em classificação de Blom (1972 *apud* MANUAL..., 2013), sendo subclassificada em defeitos maiores, apresentando anormalidade na região da cabeça e acrossoma, essas imperfeições são classificadas em: acrossoma, acrossomas subdesenvolvidos, cabeça isolada anormal, contorno anormal, cabeça estreita na base, cabeça piriforme, pequena anormal ou *pouch formation*, ainda levando em consideração os defeitos maiores onde a anormalidade encontrasse na peça intermediária podemos classificar em: gota proximal, peça intermediária rudimentar ou outros (fibrilação, edema, pseudogota), anormalidade na peça principal (cauda fortemente dobrada) ou formas teratológicas. Os defeitos menores são classificados em: cabeça (delgada, gigante, curta larga e pequena normal), cabeça isolada normal, defeitos de implantação, cauda dobrada (*bent-tail*), gota distal ou cauda enrolada na porção terminal. E por fim em classificação de Garcia e Rao (1971 *apud* MANUAL..., 2013), sendo considerado anormalidade de cabeça, acrossoma, peça intermediária, gota citoplasmática (proximal ou distal), peça principal ou cabeça isolada.

Para a avaliação da morfologia espermática na espécie caprina é recomendado que o percentual de espermatozoides normais seja igual ou superior a 80% e que o percentual de espermatozoides com defeitos maiores seja igual ou inferior a 10% (MANUAL..., 2013).

2.3.3 Microscopia de fluorescência

As sondas fluorescentes são utilizadas na avaliação da integridade e funcionalidade da célula espermática, avaliando estruturas e compartimentos específicos destes (HALANGY; FRANK; BOHNEENSACK, 1984; PETERSON; SILVERSTEIN; FEUND, 1974).

O desenvolvimento de técnicas de coloração usando fluorocromos tem fornecido novas ferramentas para avaliar as células espermáticas. Isoladas ou em combinação, as sondas fluorescentes podem ser usadas para determinar a integridade das membranas a serem visualizadas simultaneamente ou separadamente, usando diferentes filtros (ARRUDA *et al.*, 2010; GILLAN *et al.*, 2005).

Novas combinações de fluorocromos vêm sendo validadas e analisam diferentes estruturas espermáticas tanto sob o aspecto estrutural quanto funcional (CELEGHINI *et al.*, 2007).

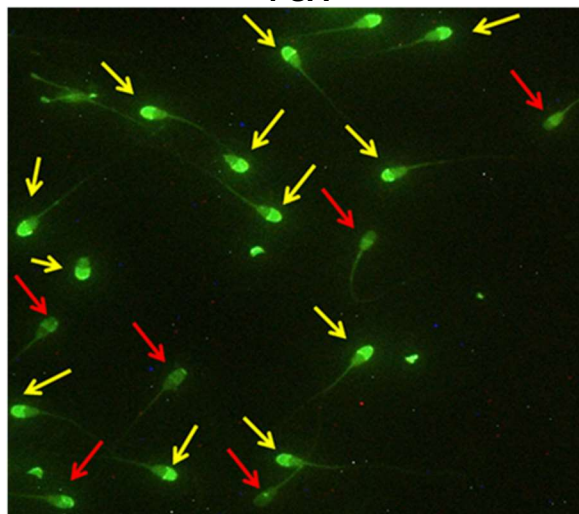
2.3.3.1 Integridade do acrossoma

O acrossoma é uma organela encontrada na cabeça dos espermatozoides, cuja função está relacionada à reprodução. A avaliação da integridade do acrossoma é um importante aspecto da estimativa da fertilidade potencial do macho, já que possui enzimas que participam ativamente no processo de fertilização. A ocorrência de uma certa proporção de acrossomas anormais no ejaculado indica que uma considerável parcela da população espermática, além daqueles que, através do microscópio ótico apresentam o defeito, devem ter alterações quantitativas e/ou qualitativas de suas enzimas, com uma correspondente redução nos índices de fertilidade (FERNANDES; PIMENTEL, 1997; HANCOCK; TREVAN, 1957; HURTGEN; JOHNSON, 1982; SAACKE; AMANN; MARSHALL, 1968).

A principal forma de avaliação da integridade do acrossoma é com o uso de aglutinina de amendoim conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) como descrito por Mendoza *et al.* (1992).

O *status* do acrossoma pode ser examinado em microscópio com contraste de fase e óptica de epi fluorescência sob filtro FITC/azul. O acrossoma íntegro é observado com forte fluorescência verde, já os acrossomas danificados, estes apresentam nenhuma ou baixa fluorescência na região acrossomal indicando danos, perda de acrossoma ou acrossoma reagido (Figura 2).

Figura 2 - Avaliação do acrossoma espermático utilizando a sonda fluorescente FITC-PSA



Fonte: Adaptado de Reddy *et al.* (2018). A fluorescência brilhante na parte anterior dos espermatozoides indica acrossoma íntegro (seta amarela) e nenhuma fluorescência indica acrossoma reagido (seta vermelha).

2.3.3.2 Integridade da membrana plasmática

A membrana plasmática atua como uma barreira entre os meios intra/extracelulares, sendo responsável pelo equilíbrio osmótico da célula. Portanto, a integridade da membrana é de fundamental importância para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e capacidade fertilizante (CELEGHINI *et al.*, 2010; PARKS; GRAHAM, 1992).

Para avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides utilizam-se corantes ou sondas fluorescentes. Estas sondas não penetram a membrana intacta, uma vez permeabilizada a membrana, estes corantes entram na célula e se ligam ao DNA, quando intercalado à dupla hélice do DNA, a emissão de sua fluorescência aumenta onze vezes. O Iodeto de Propídio (PI), é um exemplo de marcador fluorescente impermeável a membrana celular que tem afinidade com receptores no DNA, emite fluorescência vermelha (CELEGHINI *et al.*, 2010) e é incapaz de penetrar a membrana íntegra (ARRUDA *et al.*, 2003; MAXWELL; WELCH; JOHNSON, 1997). A sonda Hoechst 33342 (H33342) também possui afinidade pelo DNA, cora o núcleo de azul, sendo capaz de atravessar a membrana intacta (CELEGHINI, 2005).

2.3.3.3 Atividade mitocondrial

A mitocôndria é a principal fonte de energia para a motilidade e a homeostase espermática. Durante a fosforilação oxidativa são produzidos metabólitos, denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais desempenham papel fundamental nos processos fisiológicos. No entanto, disfunções mitocondriais podem causar desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes, provocando o estresse oxidativo, letal para a célula espermática. Assim, como essa organela está envolvida tanto nos processos fisiológicos quanto nos patológicos dos espermatozoides, fica clara a importância de se avaliar sua funcionalidade (ANGRIMANI *et al.*, 2015).

A mitocôndria possui papel central na viabilidade e na morte celular, estando relacionada com a funcionalidade da célula espermática, principal fonte de energia para motilidade e homeostase celular (ANGRIMANI *et al.*, 2015; ST. JOHN, 2002). Na células espermáticas, as mitocôndrias estão localizadas na peça

intermediária e o trifosfato de adenosina (ATP), produzido pela mitocôndria, serve como suplemento energético para a movimentação dos espermatozoides (COSSON, 1996; CELEGHINI *et al.*, 2010).

O corante mais utilizado para avaliar a função mitocondrial, ou seja, a capacidade desta organela em produzir ATP, é o iodeto de 5,5', 6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), capaz de identificar a diferença de potencial mitocondrial através de códigos de cor. Sua cor é alterada de verde para laranja ou vermelho, com o aumento do potencial de atividade mitocondrial. Esta sonda fluorescente é metacromática, mitocôndrias com baixo potencial da atividade mitocondrial emitem fluorescência verde devido à formação de monômeros de carbocianinas, apresentando excitação e emissão no máximas de 510 e 527 nm, respectivamente, enquanto em alto potencial, esses monômeros se agregam, formando multímeros, também chamados de J-agregados, com excitação e emissão máximas de 485 e 585 nm, respectivamente, que emitem fluorescência vermelha/laranja (CELEGHINI *et al.*, 2010).

2.4 Diluentes seminais

A maioria dos ejaculados dos animais domésticos contém mais espermatozoides que o necessário para uma fecundação. Sendo assim, este sêmen sendo diluído, pode ser utilizado para várias inseminações. A elevada concentração espermática determina uma intensa atividade metabólica com rápido acúmulo de catabólitos no plasma seminal, extremamente prejudicial à célula espermática. A diminuição da concentração, até certos limites, resultaria numa maior proporção diluente/espermatozoide, o que significa maior proteção celular (NEVES; BLAYA; TEIXEIRA, 1983). Elevadas diluições, porém, não levam a uma congelabilidade adequada (AZEVEDO *et al.*, 2000). De acordo com Azevedo *et al.* (2000) um parâmetro de eficiência a ser considerado na criopreservação do sêmen é o número mínimo de espermatozoides móveis que deverá conter a dose inseminante, tornando muito mais efetivo o aproveitamento do ejaculado.

Segundo Watson (1979) as principais características de um diluente são: a extensão do volume, a fim de aumentar a quantidade de doses inseminantes e conseqüentemente o número de animais inseminados; efeito tamponante, já que os espermatozoides possuem fraca resistência à alterações de pH; manutenção da

pressão osmótica, mantendo o diluente o mais próximo possível da pressão do plasma seminal (285 mOsm/L), através da adição de substâncias como açúcares; substrato energético, sendo também os açúcares que provém energia para espermatozoides, e por último, atividade antimicrobiana, que consiste na adição de antibióticos, a fim de reduzir a transmissão de bactérias patogênicas e a carga de bactérias não patogênicas que contaminam o sêmen. Além disso, um diluente ideal deve possuir substâncias estabilizadoras de membrana, nutritivas e crioprotetoras para assegurar a sobrevivência dos espermatozoides e ser de fácil preparo e de baixo custo (AMANN; PICKETT, 1987).

Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (DERIVAUX, 1980). Diversos diluentes tem sido testados e utilizado. Os mais comuns são à base de glicina-gema, glicina-gema-leite (GONZALEZ *et al.*, 1999), água de coco (NUNES, 1998), citrato-açúcar-gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose, rafinose e os formulados com TRIS-gema de ovo (SALAMON; MAXWELL, 2000).

2.4.1 Água de coco em pó

Estudos mostram que a água de coco em pó (ACP) pode ser utilizada como diluente para o sêmen caprino com sucesso, sendo considerada uma solução de fácil preparo e de baixo custo, estéril, contendo sais, proteínas, açúcares, vitaminas, minerais, fatores de crescimento e gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhes confere densidade e pH compatíveis com o sêmen, fornecendo, desta forma, os nutrientes necessários para manter a sobrevivência dos gametas masculinos criopreservados.

Dentre diversas substâncias presentes na água de coco, tem-se também o ácido 3-indol-acético (IAA), um fitormônio que estimula o crescimento dos vegetais, o qual foi isolado primeiramente por Nunes e Combarous (1995), sugerindo que esta substância promove incremento na motilidade do espermatozoide. Pesquisas realizadas por Campos (1999) para verificar a viabilidade deste diluente para a congelação do sêmen caprino, constatou que a água de coco se comportou como diluente eficaz para o sêmen caprino, possibilitando seu uso em regiões onde inexista

o coqueiro, bem como facilitando o armazenamento, conservação e transporte desta solução.

A água de coco foi utilizada inicialmente *in natura* (NUNES, 1998); na sequência, foi padronizado o estágio de maturação ideal do fruto para sua utilização biotecnológica e em 2002 o produto foi estabilizado na forma liofilizada –ACP (Figura 3). A água de coco em pó tem sido utilizada na biotecnologia da reprodução animal obtendo-se bons resultados na preservação do sêmen de animais domésticos de várias espécies como caprinos (CÂMARA, 2019; CAMPOS *et al.*, 2003), ovinos (BRITO *et al.*, 2019), peixes (CARVALHO; NUNES; GONDIM, 2002; LINHARES *et al.*, 2017; VIVEIROS *et al.*, 2008), humanos (FAUSTINO, 2007), equinos (SOBREIRA NETO, 2008) e cães (CARDOSO; SILVA; SILVA, 2006).

Figura 3 – Água de coco em pó específica para criopreservação de sêmen de caprinos e ovinos (ACP-101/102c)



Fonte: ACP Biotecnologia (2020).

2.5 Crioprotetores

A criopreservação do sêmen altera as características das membranas dos espermatozoides e com isso interfere na sua capacidade fertilizante. Durante as fases de congelação-descongelação, ocorrem flutuações no volume celular, que contribuem para o dano celular quando os limites de tolerância das membranas são ultrapassados (BECKER-SILVA, 2004). Quando os espermatozoides são submetidos as rápidas taxas de refrigeração, sofrem injúrias e morte, devido à formação de cristais de gelo no seu interior; e quando taxas lentas de refrigeração são usadas ocorre o

desenvolvimento de regiões com elevada concentração de soluto, que desidratam a célula (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Objetivando minimizar os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se úteis como agentes crioprotetores. Os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen são macromoléculas, como a caseína do leite, as proteínas da gema de ovo, glicerol (EVANS; MAXWELL, 1987) e açúcares como lactose, rafinose, manose, sacarose (CARNEIRO, 2002). De acordo com os estudos de Gil *et al.* (2003), o uso de aditivos de origem animal, como gema de ovo e leite, na diluição, pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto.

Segundo Gonzalez (2004), os crioprotetores podem ser classificados em não-penetrantes, cuja atividade de crioproteção ocorre fora da célula ou na sua superfície, aumentando a osmolaridade do meio extracelular, e são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo assim, a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação; e em agentes crioprotetores penetrantes, quando exercem sua ação crioprotetora dentro da célula, os quais são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a criopreservação causa sobre a célula. As características físico-químicas ideais que eles devem possuir são: baixo peso molecular; alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular.

2.5.1 Glicerol

O glicerol é considerado um álcool, sendo o principal crioprotetor utilizado para espermatozoides (GONZALEZ, 2004) e classificado como um crioprotetor espermático de ação interna largamente utilizado para a congelação de sêmen caprino, cuja concentração usada em diferentes estudos varia de 3 a 9%, com melhores resultados entre 4 e 7% no diluente utilizado (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).

Tem a capacidade de penetrar na célula espermática através de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, isso faz com que o meio fique hipertônico, e promove a desidratação da célula, prevenindo a formação de cristais de gelo dentro da célula (PURDY, 2006). O glicerol interage com as cabeças polares dos

fosfolipídios da membrana, baixando a temperatura de transição de fase dos lipídios da membrana e diminuindo a adesão entre as células (KUNDU *et al.*, 2000). O efeito crioprotetor do glicerol parece se estabelecer em menos de cinco minutos após sua adição (BECKER-SILVA, 2004).

Embora o glicerol seja considerado um crioprotetor, o mesmo possui efeitos tóxicos aos espermatozoides que se manifestam em temperaturas superiores a 20 °C (WATSON, 1979). Sendo assim, a glicerolização (adição de glicerol) pode ser feita em dois momentos: na diluição inicial (*one step*), que consiste em diluir o sêmen fresco com o diluente contendo o crioprotetor (glicerol) a temperatura de 37 °C ou em (*two steps*) após a diluição inicial, o sêmen deve ser refrigerado até atingir a marca de 4 °C (NEVES *et al.*, 2008) e após adiciona-se o diluente contendo o glicerol (BRITO, 2017; SILVA; GUERRA, 2011).

2.5.2 Gema de ovo

A gema de ovo (GO) de galinha é considerada um crioprotetor não-penetrante, agindo no compartimento extracelular, sendo largamente utilizada como crioprotetor da membrana plasmática do espermatozoide em diversas espécies (WATSON, 1995). A GO protege a membrana plasmática da célula espermática restaurando fosfolipídios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante a refrigeração do sêmen (HAMMERSTED; GRAHAM; NOLAN, 1990). Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina. Durante o choque térmico, essas lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção.

A GO previne também a liberação da enzima hialuronidase pela célula espermática (FOULKES, 1977). Visto que a mesma também tem capacidade de tampão, sua quantidade no meio varia de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluente. Segundo Aboagla e Terada (2004), a adição de GO aos diluentes para o sêmen caprino significativamente aumenta a proporção de espermatozoides móveis recuperados pós-descongelção.

Sabe-se que o sêmen caprino apresenta particularidades que o diferenciam do de outras espécies, sendo a mais importante a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbouretrais liberadas no plasma seminal (SIMPLÍCIO; MACHADO,

1989). Segundo Iritani e Nishikawa (1961), essas enzimas possuem atividade fosfolipase e hidrolisam a lecitina presente na GO em lisolecitinas e ácidos graxos altamente tóxicos para os espermatozoides. A lecitina é o fosfolípido mais abundante nas membranas plasmáticas dos espermatozoides e também presente na GO, a composição enzimática do sêmen dos caprinos e dos diluentes assume grande importância no processo de conservação do sêmen, congelado ou refrigerado (SIMPLÍCIO; MACHADO, 1989). Essa lisolecitina é tóxica devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática (NUNES *et al.*, 1982). Portanto, a concentração recomendada de GO é de 2,5% ao volume total do diluente de sêmen de caprinos, a fim de evitar a ação da fosfolipase “A2” sobre os componentes lipídicos da GO, promovendo a formação por hidrólise de lisofosfatidilcolinas, que são tóxicas aos espermatozoides (BISPO *et al.*, 2011; EVANS; MAXWELL, 1987; PELLICER-RUBIO; MAGALLON; COMBARNOUS, 1997).

A uniformidade na preparação dos diluentes de sêmen contendo GO é difícil de ser atingida devido às suas características individuais, como idade do ovo, tipo de alimentação das aves, à variação na composição da GO, dependendo da linhagem da ave e a variação sazonal na concentração da enzima coaguladora da GO no plasma seminal (CORTEEL, 1974; ROCA *et al.*, 1997; SAKASHITA *et al.*, 2012).

2.5.3 Moringa

A moringa (*Moringa oleifera* - MO), também conhecida como lírio-branco, quiabo-de-quina e cedro, pertence à família Moringaceae, que é composta apenas de um gênero (*Moringa*) e quatorze espécies. É um arbusto ou árvore de pequeno porte, de crescimento rápido podendo atingir uma altura de 12 m (RANGEL, 2003). É uma árvore do Sul da Ásia, que cresce perto das montanhas do Himalaia, do noroeste do Paquistão para o norte da Índia (FERREIRA *et al.*, 2008; ROBERTA; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980). Foi introduzido em muitas partes do mundo, como Afeganistão, Bangladesh, Sri Lanka, África, Ásia Ocidental e nas Américas, do México ao Peru, Ilhas do Caribe, Paraguai e Brasil (FERREIRA *et al.*, 2008; JAHN; MUSNAD; BURGSTALLER, 1986; MORTON, 1991). Espécie de planta perene, que se adapta tanto às condições irrigadas quanto às de seca, pouco exigente em solos e fertilizantes, encontra-se disseminada na região nordeste, particularmente no Ceará (BEZERRA *et al.*, 2004).

O cultivo da moringa é influenciado pelo grande potencial que a planta apresenta e em sua multiplicidade de usos – alimentar, agrícola, medicinal e industrial (CORREA, 1984; LORENZI; MATOS, 2002; MATOS; ABREU, 1998; RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; SILVA; KERR, 1999). Além de apresentar baixo custo na sua produção, uma vez que é uma planta de fácil adaptação (SILVA *et al.*, 2009).

As sementes são ricas em proteínas (33,9%) e lipídios (37,2%) (MACHADO; CARNEIRO, 2000). O óleo extraído das sementes de MO apresenta alta resistência à oxidação, pela presença de elevados teores de ácidos graxos insaturados, especialmente o oleico (71,6%), sendo o palmítico e o behênico (ambos com 6,4%) os ácidos graxos saturados dominantes (Quadro 5; LALAS; TSAKNIS, 2000).

Quadro 5 – Ácidos graxos presentes na *Moringa oleifera*

Substância	Fórmula	%
Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	71,6
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	6,40
Ácido behênico	$C_{22}H_{44}O_2$	6,40
Ácido palmitoleico	$C_{16}H_{30}O_2$	5,07
Ácido vacênico	$C_{18}H_{34}O_2$	4,41
Ácido araquídico	$C_{20}H_{40}O_2$	2,69

Fonte: Adaptado de Lalas e Tsakins (2002).

As folhas e sementes da MO apresentam potencial nutricional e fornecem uma grande variedade e quantidade de proteínas essenciais, vitaminas, minerais e é uma rica fonte de aminoácidos essenciais. Ela também contém uma quantidade significativa de vitaminas, tais como: vitamina A, vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B6, ácido fólico e ácido ascórbico (vitamina C). A riqueza mineral da MO inclui cálcio, potássio, ferro, magnésio, fósforo e zinco. Além disso, contém uma baixa quantidade de gorduras e não oferece colesterol nocivo (FERREIRA *et al.*, 2008).

As folhas e sementes de MO são excelentes fontes de antioxidantes. Seu extrato exerce efeitos protetores diminuindo os peróxidos lipídicos do fígado e aumentando os antioxidantes (ASMA *et al.*, 2005; LALA; TSAKNIS, 2002). Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas aquela do substrato oxidável, retarda ou previne

significativamente, a oxidação daquele substrato. A adição de antioxidantes ao diluente tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico dos radicais livres (MAIA, 2006).

Os níveis de antioxidantes presentes normalmente no sêmen ainda são parcialmente reduzidos com a diluição do sêmen, o que pode diminuir consideravelmente o efeito benéfico do antioxidante natural. Assim, a adição destes agentes, mesmo em pequenas concentrações, pode melhorar a função espermática do sêmen manipulado (MAIA, 2006).

Estudos realizados em ratos criptorquídicos, utilizaram o extrato metanólico das folhas de MO, com intuito de diminuir o estresse oxidativo proveniente do testículo presente na cavidade abdominal e foi observado uma melhora na perda de células germinativas e na diminuição do estresse oxidativo associados ao criptorquidismo (AFOLABI; ADEROJU; ALAGBONSI, 2013; SANTOS *et al.*, 2018).

Em coelhos, quando o extrato em pó de MO foi administrado via oral por um período de 21 dias, houve melhoria na atividade antioxidante do trato reprodutivo masculino, sendo indicado essa dieta como manejo nutricional para melhorar a produção espermática (EL-HARAIKY *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018).

2.6 Conservação seminal

O sêmen caprino pode ser utilizado de três formas: fresco, refrigerado e congelado. O sêmen fresco é preferido quando o reprodutor está presente no rebanho, e se tem um grande número de fêmeas em estro, natural ou sincronizado, inviabilizando a monta natural. A utilização de sêmen refrigerado é uma estratégia comum nos casos em que um reprodutor em particular é compartilhado por um grupo de criadores localizados dentro de uma área relativamente pequena. Em tais casos, o sêmen é armazenado a 4 °C e pode ser utilizado até 24 horas a partir da coleta. Por fim, o sêmen é congelado para a preservação em longo prazo, permitindo que ele seja distribuído por uma área mais ampla e usado por tempo indeterminado (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004; MAIA, 2014).

2.6.1 Refrigeração

Na preservação do sêmen pelo método da refrigeração os espermatozoides são armazenados a temperaturas baixas o suficiente para deprimir o seu metabolismo, prolongando assim a sua vida fértil. Para promover essa queda na temperatura, recomenda-se o uso de equipamentos convencionais como refrigerador, garrafas térmicas ou caixas isotérmicas com gelo, ou ainda, equipamentos automatizados (CÂMARA; GUERRA, 2011).

A mudança rápida de temperatura, induz estresse na membrana plasmática e acrossomal, repercutindo na motilidade espermática e na capacidade fecundante do espermatozoide. Este efeito pode ser parcialmente superado pelo refrigeração gradual do sêmen da temperatura ambiente à temperatura de armazenamento e pela suplementação do diluente com alguns aditivos, como os crioprotetores (HOLT, 2000; SALAMON; MAXWELL, 2000; WATSON, 2000).

Roca *et al.* (2000) relataram que o sêmen caprino tem sido conservado em temperaturas variando entre 4 e 5 °C. O ritmo de refrigeração do sêmen desta espécie após diluição deve estar compreendido entre -0,25 e 0,35 °C/ min. até que seja atingida a temperatura de 5 °C, mantendo-se desta forma a motilidade dos espermatozoides em baixos níveis por alguns dias (MACHADO; SIMPLÍCIO, 1992). Segundo Evans e Maxwell (1987), o período máximo de conservação do sêmen a 5 °C para obtenção de um grau aceitável de fertilidade através da IA, é de 24 horas para ovinos e de 48 horas para caprinos.

2.6.2 Congelação

O sucesso da criopreservação de sêmen é apenas parcial, uma vez que aproximadamente metade dos espermatozoides podem ser danificados pela congelação-descongelação. Isso ocorre porque durante o processo de criopreservação a célula passa por uma série de alterações estruturais, causadas pelo gradiente osmótico, gerado entre o meio intra e extracelular, resultando em danos a membrana plasmática e acrossomal, bem como a outras estruturas espermáticas (MAIA, 2014; MAZUR, 1984; WATSON, 1995).

Após a diluição e refrigeração, o sêmen pode ser congelado em palhetas (0,25 ou 0,50 ml) ou na forma de pellets (CHEMINEAU *et al.*, 1991; MAIA, 2014;

PURDY, 2006). A congelação em palhetas pode ser realizada usando uma máquina de congelação automática ou sobre o vapor de nitrogênio líquido (-60 a 196 °C), em que pode ter sua estrutura e funcionalidade conservadas, mantendo-os inativos e viáveis por tempo indeterminado (BAKHACH, 2009). Congeladores automáticos tem a vantagem de permitir a congelação de grandes quantidades de palhetas por vez e o controle da curva de congelação (CHEMINEAU *et al.*, 1991; MAIA, 2014; PURDY, 2006). Tradicionalmente, as palhetas são descongeladas em banho Maria (37 °C) por 30 segundos.

3 JUSTIFICATIVA

Os diluentes seminais para caprinos contêm em suas composições substâncias de origem animal como a gema de ovo e/ou o leite desnatado, o que implica em limitações como reações com o plasma seminal e risco biológico potencial. No caso da gema de ovo, o risco de contaminação é maior, pelo fato da casca do ovo ser porosa e passível de permitir a passagem de patógenos, como *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

Além disso, tem que ser levado em consideração o fato de ocorrer uma falta de padronização dos constituintes da gema de ovo e do leite em pó utilizado, podendo também apresentar resultados diferentes entre os protocolos utilizados. O sêmen não é estéril e já vem com uma certa carga de contaminantes. Comprometendo assim, a qualidade do mesmo e o comércio internacional, ocasionando uma redução na difusão de material genético de alto valor.

Diante disso, a busca por diluentes livre de produtos de origem animal têm se intensificado. O presente trabalho se justifica pela necessidade de novos estudos de substâncias de origem vegetal adicionada ao diluente ACP-101c como meio de criopreservação de sêmen caprino. Nesse aspecto, a utilização do óleo da *Moringa oleifera* surge como um substituto provável aos crioprotetores externos de membrana de origem animal para os meios de conservação, pois a moringa é considerada um excelente antioxidante e apresenta um elevador teor de ácidos graxos insaturados, acreditando-se, assim, que os antioxidantes presentes no óleo de moringa acrescentado ao diluente serão capazes de proteger o espermatozoide do efeito tóxico dos radicais livres.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O óleo da *Moringa oleifera* adicionado ao meio de conservação à base de água de coco em pó para sêmen caprinos (ACP-101c) não apresenta toxicidade aos espermatozoides.

O meio de criopreservação seminal ACP-101c adicionado óleo de *Moringa oleifera* é um substituto à gema de ovo como crioprotetor de ação extracelular, preservando a qualidade espermática do sêmen caprino refrigerado ou pós-descongelado.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do óleo de *Moringa oleifera* como crioprotetor de ação extracelular em protocolos de criopreservação de sêmen caprino em diluente à base de água de coco em pó (ACP-101c).

5.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a citotoxicidade do óleo de *M. oleifera* sobre os espermatozoides de caprinos em diluente ACP-101c através do teste de termorresistência;
- ❖ Avaliar a eficiência do óleo da *M. oleifera* como crioprotetor da membrana espermática de ação extracelular em protocolos de refrigeração do sêmen caprino a 4 °C em diluente ACP-101c através da avaliação da cinética espermática;
- ❖ Avaliar a eficiência do óleo da *M. oleifera* como crioprotetor da membrana espermática de ação extracelular em protocolos de congelação-descongelação do sêmen caprino em diluente ACP-101c através da avaliação da cinética, morfologia e integridade de membrana espermática, bem como da atividade mitocondrial.

6 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da UECE sob o protocolo n° 4244862/2018. O sêmen caprino foi preservado em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) (ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil) e submetido a três etapas de avaliação: a fresco diluído, pós-refrigeração a 4 °C, e pós-descongelação. Todos os ejaculados utilizados no estudo foram provenientes de reprodutores que apresentaram qualidade seminal dentro dos parâmetros estabelecidos pelo CBRA (MANUAL..., 2013) para sêmen fresco. Todas as avaliações foram executadas no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da UECE, localizado a 3° de latitude sul e 38° de longitude oeste, Fortaleza-CE.

6.1 Animais experimentais

Para os protocolos de preservação do sêmen fresco e refrigerado foram utilizados cinco reprodutores das raças Alpina Britânica e SPRD pertencentes e alojados na LTSCO que tiveram o sêmen coletado 2x/semana no durante o mês de agosto de 2018. Já para o de congelação, foram utilizados três reprodutores das raças Anglo Nubiana e Saanen pertencentes e alojados na Estação Experimental do Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA), localizado a 8° de latitude sul e 37° de longitude oeste, Sertânia-PE, que tiveram o sêmen coletado 2x/semana durante o mês de julho de 2019.

6.2 Diluentes para sêmen fresco e refrigerado

O diluente ACP-101c foi preparado segundo a recomendação do fabricante e, em seguida, fracionado em quatro alíquotas: T1 (controle: ACP-101c + 5% GO), T2 (ACP-101c + 0,5% MO), T3 (ACP-101c + 1,0% MO), T4 (ACP-101c + 2,5% MO). O MO utilizado no experimento foi um óleo comercial, extraído das sementes da planta *M. oleifera* (União Vegetal Indústria de Produtos Alimentícios, Eusébio, Ceará).

6.3 Protocolo para sêmen fresco e refrigerado

Após cada coleta e pré-avaliação, os ejaculados dos cinco reprodutores foram reunidos em um mesmo recipiente na forma de *pool*, homogeneizados, divididos em quatro alíquotas e diluídos nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, obtendo-se uma concentração final de 200×10^6 spz/ml. Em seguida, cada tratamento foi fracionado em duas alíquotas, e uma foi mantida em banho Maria a 37 °C por duas horas para realização do teste de termorresistência (TTR) e a outra submetida a curva de refrigeração (-0,35 °C/min.) até atingir 4 °C.

6.4 Diluentes para sêmen congelado

Já para o protocolo de congelação elaborou-se um meio-base (MB) contendo ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml de antimicrobiano, em seguida o mesmo foi fracionado em cinco alíquotas e a estas foram adicionados os crioprotetores externos segundo os tratamentos: T1 (controle – MB + 5,0% GO), T2 (MB + 0,5% MO), T3 (MB + 1,0% MO), T4 (MB + 2,5% MO), e T5 (MB + 5,0% MO).

6.5 Protocolo para sêmen congelado

Após cada coleta e pré-avaliação, os ejaculados dos três reprodutores foram reunidos em um mesmo recipiente na forma de *pool*, homogeneizados, divididos em cinco alíquotas e diluídos nos tratamentos T1 a T5, obtendo-se uma concentração final de 400×10^6 spz/ml. Em seguida, as amostras foram refrigeradas até 4 °C em 60 min., a um decréscimo de 0,35 °C/min. Ao atingir 4 °C, as amostras foram mantidas por mais 30 min. de estabilização. Após este período, foram envasadas em palhetas de 0,25 ml e congeladas em vapor de nitrogênio (-60 °C) por 15 min., a uma altura de 5 cm do nitrogênio líquido, e então imersas em nitrogênio líquido a -196 °C e armazenadas em botijões criogênicos.

6.6 Avaliações espermáticas

O sêmen fresco diluído foi avaliado quanto à cinética espermática e submetido ao TTR. O sêmen refrigerado foi avaliado somente quanto à cinética

espermática. Já o sêmen pós-descongelamento, foi avaliado quanto à cinética, à integridade de acrossoma, à integridade de membrana espermática, à funcionalidade mitocondrial, e à morfologia espermática.

A cinética espermática foi avaliada em Sistema de Análise de Sêmen Auxiliado por Computador (CASA), com uso do programa *Sperm Class Analyser*[®] (SCA[®], Microptic S.L., Barcelona, Espanha) que processa imagens obtidas em microscópio de contraste de fase acoplado a uma câmera digital. Para a avaliação, o sêmen foi re-diluído em ACP-101c, até a concentração de 40×10^6 spz/ml. Dez microlitros desta diluição foi colocada em câmara de Makler (*Sefi Medical Instruments* Ltda., Haifa, Israel), pré-aquecida a 37 °C, para se determinar as variáveis: percentual de espermatozoides móveis totais (MT), progressivos (MP), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória (VAP - $\mu\text{m/s}$) e linearidade (LIN - %).

No TTR o sêmen foi mantido em banho Maria a 37 °C por duas horas e a MT foi avaliada com 0 h, 1 h e 2 h de incubação no sistema CASA acima descrito.

Para avaliação da integridade e viabilidade espermática foram utilizadas sondas fluorescentes para avaliar, simultaneamente, integridade de acrossoma, integridade de membrana espermática e função mitocondrial. Foi adotada a associação das sondas fluorescentes (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) iodeto de propídio (IP, P4170), isotiocianato de fluoresceína conjugada a aglutinina do *Pisum sativum* (FITC-PSA, L0770), iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, T4069 e Hoechst 33342). Alíquotas de 150 μl de sêmen descongelado foram diluídas em tampão fosfato-salino (PBS) para se obter 50×10^6 spz/ml, adicionado de 6 μl de IP (0,5 mg/ml em PBS), 12 μl de JC-1 (153 μM em dimetilsulfóxido), 50 μl de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/ml}$ em PBS) e 3 μl de Hoechst 33342 em microtubo e incubado a 37 °C por 8 min. em escuro. Após incubação, uma alíquota foi colocada em lâmina de microscopia pré-aquecida (37 °C), coberta com lamínula e imediatamente avaliada em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci, Tóquio, Japão) em um aumento de 400x.

Duzentos espermatozoides por lâmina foram contados e o percentual de espermatozoides avaliados em relação a integridade do acrossoma, integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial. Quanto à integridade do acrossoma, foi classificado em íntegro, quando apresentou o acrossoma completo; ou reagido, quando apresentou o acrossoma destacado. Quanto à integridade da membrana

plasmática, foi classificada em íntegra quando apresentou coloração azul, ou danificada quando apresentou coloração vermelha. E quanto à atividade mitocondrial, foi classificada em baixa, quando apresentou coloração verde; ou alta, quando apresentou coloração laranja.

A morfologia espermática foi avaliada através do corante vital eosina-nigrosina em esfregaço confeccionado com 5 µl do corante com 5 µl de sêmen em lâmina previamente aquecida (37 °C) e contado 200 células em microscópio convencional com aumento de 400x, e classificados quanto a espermatozoides normais (NOR), defeitos de acrossoma (ACR), cabeça (CAB), peça intermediária (PI), cauda (CAU) e gota citoplasmática (GC).

6.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos em média e erro padrão e analisados através do software estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0. Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade *Bartlett's* e ao teste de normalidade *Shapiro Wilk*. As proporções encontradas para os parâmetros espermáticos foram submetidas à ANOVA seguidas pelo teste de *Tukey* quando paramétricos, e ao teste de *Kruskal-Wallis* seguidos pelo teste de *Dunn* quando não-paramétricos para comparação entre os tratamentos. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade fertilizante do espermatozoide (COX *et al.*, 2006). O *Computer-assisted Sperm Analysis* (CASA), comumente utilizado para avaliar a cinética espermática, é um sistema que tem demonstrado ser uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas à diferentes tratamentos experimentais (FARREL *et al.*, 1996).

No presente experimento, inicialmente, o sêmen fresco de caprino foi diluído em ACP-101c + 5% GO (T1 – controle), e nos tratamentos experimentais: ACP-101c + 0,5% MO (T2), ACP-101c + 1,0% MO (T3), ACP-101c + 2,5% MO (T4), e avaliados quanto aos parâmetros cinéticos através do sistema CASA utilizando o software SCA®.

Os parâmetros cinéticos avaliados (MT, MP, VCL, VAP, VSL, LIN) não apresentaram diferenças entre os tratamentos ($P > 0.05$; Tabela 1). Esse teste inicial mostrou que o óleo de moringa, em concentrações até 2,5%, não era tóxico aos espermatozoides e mantinha os parâmetros de cinética espermática dentro dos valores preconizados pelo CBRA (MANUAL..., 2013), quer seja, entre 70-90% de MT.

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos do sêmen caprino fresco diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) sem e com a adição de óleo de moringa

Parâmetros	Tratamentos			
	T1 - controle (ACP +5,0%GO)	T2 (ACP+0,5%MO)	T3 (ACP+1,0%MO)	T4 (ACP+2,5%MO)
MT (%)	96,2 ± 0,4 ^a	72,9 ± 13,7 ^a	90,0 ± 2,0 ^a	87,0 ± 3,4 ^a
MP (%)	76,9 ± 6,8 ^a	60,8 ± 14,2 ^a	72,2 ± 6,2 ^a	68,9 ± 5,7 ^a
VCL (µm/s)	131,4 ± 15,0 ^a	114,7 ± 9,6 ^a	112,8 ± 8,4 ^a	115,2 ± 13,3 ^a
VSL (µm/s)	76,7 ± 9,8 ^a	74,2 ± 9,2 ^a	73,0 ± 6,3 ^a	75,4 ± 9,0 ^a
VAP (µm/s)	108,0 ± 12,9 ^a	98,9 ± 9,2 ^a	98,0 ± 8,0 ^a	99,3 ± 11,3 ^a
LIN (%)	58,1 ± 2,4 ^a	64,6 ± 5,5 ^a	64,7 ± 2,6 ^a	65,5 ± 2,7 ^a

Os dados foram distribuídos normalmente e os valores são apresentados como média ± erro padrão. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$).

T1 = ACP-101c + 5,0% gema de ovo; T2 = ACP-101c + 0,5% óleo de moringa; T3 = ACP-101c + 1,0% óleo de moringa; T4 = ACP-101c + 2,5% óleo de moringa; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade.

Visando simular as condições pelas quais os espermatozoide é submetido dentro do trato genital da fêmea quando em protocolos de inseminação artificial por

via vaginal, foi utilizado o teste de termorresistência onde os sêmen permanecer por duas horas a 37 °C.

Os resultados desse teste mostraram que não foram observadas diferenças nos valores de cinética espermática entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo de avaliação (0h, 1h e 2h). No entanto, quando avaliado cada tratamento, individualmente, entre os diferentes tempos, observou-se que no T1, após 2h de incubação a 37 °C, os resultados foram inferiores aos demais tempos (0h e 1h) ($P < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2 - Percentagem de motilidade total do sêmen caprino fresco diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) adicionado de diferentes concentrações de óleo de moringa e submetido ao teste de termorresistência a 37 °C por duas horas

Tratamentos	Tempos de avaliação		
	0 h	1 h	2 h
T1 (ACP+5,0%GO)	96,2 ± 0,4 ^{AA}	78,1 ± 7,3 ^{AB}	55,8 ± 10,8 ^B
T2 (ACP+0,5%MO)	72,9 ± 13,7 ^{AA}	70,8 ± 14,9 ^{AA}	69,7 ± 12,5 ^{AA}
T3 (ACP+1,0%MO)	90,0 ± 2,0 ^{AA}	78,4 ± 10,0 ^{AA}	67,3 ± 11,4 ^{AA}
T4 (ACP+2,5%MO)	87,0 ± 3,4 ^{AA}	76,4 ± 8,2 ^{AA}	74,0 ± 11,3 ^{AA}

Os dados foram distribuídos normalmente e os valores são apresentados como média ± erro padrão. Médias seguidas por diferentes letras minúsculas dentro da mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$) entre tratamentos em um mesmo tempo de avaliação. Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas dentro da mesma linha diferem significativamente ($P > 0,05$) entre os tempos de avaliação em um mesmo tratamento.

T1 = ACP-101c + 5,0% gema de ovo; T2 = ACP-101c + 0,5% óleo de moringa; T3 = ACP-101c + 1,0% óleo de moringa; T4 = ACP-101c + 2,5% óleo de moringa; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade.

Observa-se que mesmo após duas horas de incubação, no grupo controle (T1) e nos demais tratamentos, mais de 50% dos espermatozoides se mantiveram aptos à fecundação e, conseqüentemente, a serem utilizados em protocolos de IA por via cervical.

Assim, sabendo-se que os óleos das sementes de *M. oleifera* são excelentes fontes de antioxidantes (ASMA *et al.*, 2005; LALA; TSAKNIS, 2002) e que a adição de antioxidantes ao diluente tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozoide do efeito tóxico dos radicais livres (MAIA, 2006), acredita-se que o óleo de moringa tenha como uma de suas ações o efeito antioxidante, minimizando os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, evitando o estresse oxidativo, garantindo assim a viabilidade dos espermatozoides.

Dando prosseguimento aos protocolos de preservação, foi realizada a etapa de refrigeração do sêmen, utilizando o mesmo grupo controle e os mesmos tratamentos experimentais da etapa anterior.

Os parâmetros cinéticos foram avaliados pelo sistema CASA (SCA®) e foram observados valores de MT que não diferiram entre os tratamentos teste (T2, T3 e T4) e entre T3, T4 e o controle (T1) ($P > 0.05$); apenas o T2 apresentou valores estatisticamente inferiores ao T1 ($P < 0.05$). Quanto à MP, o T3 não diferiu estatisticamente do T1 (controle) ($P > 0.05$); já entre os tratamentos testes (T2, T3 e T4), não foram observadas diferenças ($P > 0.05$). Na VCL o T2 e T3 não diferiu do controle (T1; $P > 0.05$) e apresentou os menores valores no T4. Com relação a VSL, VAP e LIN, não houve diferença entre os tratamentos e nem entre estes e o grupo controle ($P > 0.05$; Tabela 3).

O CBRA (MANUAL..., 2013) preconiza que, para sêmen refrigerado caprino, a MT seja $\geq 60\%$; nos tratamentos experimentais (T2 e T4) os valores médios foram muito próximos a 60% e não diferiram estatisticamente do grupo controle ($P > 0.05$). Já os demais parâmetros cinéticos (VCL, VSL, VAP e LIN) parecem não ter sofrido interferências pela adição do óleo de moringa. Tais variações nas amostras podem ter sido decorrentes de dificuldades quando da preparação do meio na fase de homogeneização do óleo de moringa no mesmo. Futuramente, esse problema poderá ser minimizado ou contornado com a adição de algum agente emulsificante ao meio.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos de sêmen caprino diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-101c) sem ou com a adição de óleo de moringa e refrigerado a 4 °C

Parâmetros	Tratamentos			
	T1 – controle (ACP+5,0%GO)	T2 (ACP+0,5%MO)	T3 (ACP+1,0%MO)	T4 (ACP+2,5%MO)
MT (%)	85,2 ± 7,4 ^a	45,6 ± 7,7 ^b	55,2 ± 5,3 ^{ab}	51,3 ± 11,3 ^{ab}
MP (%)	69,0 ± 7,2 ^a	32,1 ± 10,4 ^b	42,6 ± 10,1 ^{ab}	29,9 ± 6,7 ^b
VCL (µm/s)	128,5 ± 6,5 ^a	101,2 ± 7,9 ^{ab}	104,0 ± 10,1 ^{ab}	81,8 ± 8,6 ^b
VSL (µm/s)	82,7 ± 7,1 ^a	71,5 ± 8,4 ^a	83,6 ± 9,5 ^a	60,8 ± 9,5 ^a
VAP (µm/s)	109,1 ± 6,7 ^a	90,4 ± 8,2 ^a	96,7 ± 10,1 ^a	71,7 ± 10,9 ^a
LIN (%)	64,3 ± 4,2 ^a	70,1 ± 4,2 ^a	80,1 ± 2,1 ^a	73,0 ± 5,0 ^a

Os dados foram distribuídos normalmente e os valores são apresentados como média ± erro padrão. Médias seguidas por diferentes letras dentro de uma mesma linha diferem significativamente entre tratamentos ($P < 0,05$).

T1 = ACP-101c + 5,0% gema de ovo; T2 = ACP-101c + 0,5% óleo de moringa; T3 = ACP-101c + 1,0% óleo de moringa; T4 = ACP-101c + 2,5% óleo de moringa; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade.

Finalizada a etapa de refrigeração, partiu-se para o estudo do comportamento dos espermatozoides frente ao processo de congelação-descongelação. Para tal fim, foi elaborado um meio-base contendo ACP-101c, glicerol e antimicrobiano e a este foram adicionados os crioprotetores externos segundo o tratamentos (controle – gema de ovo de galinha, ou óleo de moringa). Nessa última etapa, foi incluído mais um tratamento experimental com adição de 5,0% de óleo de moringa.

O processo de criopreservação ocasiona modificações na membrana espermática que resulta em diminuição de seu potencial fecundante, causando redução na motilidade e na viabilidade espermática, danos na integridade de membrana e nas funções espermáticas (BUCAK *et al.*, 2010).

Seguindo o mesmo protocolo de avaliação das etapas anteriores, as amostras de sêmen foram novamente avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos (Tabela 4), onde não foram observadas diferenças com relação ao percentual de óleo de moringa adicionado ao meio-base nos grupos tratamento (T2-T5) ($P > 0,05$). Somente no T5, no item LIN, foi observado resultado similar ao controle (T1) ($P > 0,05$); sendo este um fator que apresenta alta correlação com a fertilidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005; ZHANG *et al.*, 1999). O meio-base contendo ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml de antimicrobiano foi o que mostrou os melhores resultados pós-descongelação ($P < 0,05$), com valores compatíveis àqueles preconizados pelo CBRA (MANUAL..., 2013), ou seja, $MT \geq 30\%$.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos do sêmen caprino diluído em meio-base (ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml antimicrobiano) sem e com a adição de óleo de moringa e avaliados após congelação-descongelação

Parâmetros	Tratamentos				
	T1 - controle (MB+5,0%GO)	T2 (MB+0,5%MO)	T3 (MB+1,0%MO)	T4 (MB+2,5%MO)	T5 (MB+5,0%MO)
MT (%)	45,14 ± 4,98 ^a	6,88 ± 1,76 ^b	7,32 ± 2,01 ^b	8,40 ± 2,14 ^b	4,64 ± 1,05 ^b
MP (%)	29,66 ± 3,62 ^a	2,32 ± 0,61 ^b	1,59 ± 0,60 ^b	2,55 ± 0,60 ^b	1,03 ± 0,17 ^b
VCL (µm/s)	93,52 ± 4,41 ^a	46,31 ± 2,38 ^b	40,85 ± 2,51 ^b	47,92 ± 2,03 ^b	44,35 ± 2,67 ^b
VSL (µm/s)	72,88 ± 4,16 ^a	30,94 ± 2,80 ^b	25,49 ± 2,97 ^b	32,90 ± 1,53 ^b	31,42 ± 2,54 ^b
VAP (µm/s)	82,33 ± 4,72 ^a	35,96 ± 2,91 ^b	30,34 ± 2,84 ^b	37,18 ± 1,52 ^b	35,11 ± 2,48 ^b
LIN (%)	77,62 ± 1,03 ^a	65,70 ± 2,98 ^b	61,37 ± 4,94 ^b	68,64 ± 1,40 ^b	70,29 ± 2,15 ^{ab}

Os dados foram distribuídos normalmente e os valores são apresentados como média ± erro padrão. Médias seguidas por diferentes letras dentro de uma mesma linha diferem significativamente entre tratamentos ($P < 0,05$).

T1 = meio-base + 5,0% gema de ovo; T2 = meio-base + 0,5% óleo de moringa; T3 = meio-base + 1,0% óleo de moringa; T4 = meio-base + 2,5% óleo de moringa; T5 = meio-base + 5,0% óleo de moringa; MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade linear; VAP = velocidade média da trajetória; LIN = linearidade.

Na criopreservação com o óleo da moringa, os resultados não foram de acordo com o esperado. No entanto, foi observado uma possível ação crioprotetora, que pode estar relacionada aos antioxidantes, como também às vitaminas lipossolúveis (Vit. A, ácido fólico e Vit. C), além da presença de minerais como cálcio, potássio, zinco e fósforo (FERREIRA *et al.*, 2008). Estudos já comprovaram que o ácido ascórbico (Vit. C) adicionado ao diluente promove proteção contra os danos no acrossoma dos espermatozoides de carneiros durante o processo de criopreservação (COSTA *et al.*, 2015). Como os constituintes predominantes do óleo de moringa são os ácidos graxos, devem ser eles que agem estabilizando a membrana espermática durante o processo de congelação-descongelação (SILVA *et al.* 2018).

Além da cinética espermática, os corantes fluorescentes também são utilizados para prever o potencial de fertilidade, estes podem ser utilizados na identificação de condições subcelulares, sendo possível a identificação de alterações estruturais ou metabólicas no interior da célula (SOUSA *et al.*, 2012).

Através da microscopia de fluorescência, pôde-se avaliar os parâmetros de integridade do acrossoma, de integridade da membrana espermática e a funcionalidade das mitocôndrias dos espermatozoides do sêmen congelado-descongelado caprino diluído em meio-base (ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml antimicrobiano) de acordo com o grupo controle (adição de 5% de gema de ovo) e os grupos experimentais (adição de óleo de moringa) (Tabela 5).

Após a análise dos resultados, pode-se observar que o grupo controle (T1) apresentou valores superiores, ou seja, manteve melhor a integridade e funcionalidade dos espermatozoides durante o processo de congelação-descongelação com relação aos tratamentos onde houve a adição do óleo de moringa em detrimento à gema de ovo ($P < 0,05$). Somente no parâmetro de alta atividade mitocondrial o T3 obteve valores estatisticamente similares ao T1 ($P > 0,05$).

Tabela 5 – Parâmetros do sêmen caprino diluído em meio-base (ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml antimicrobiano) sem e com a adição de óleo de moringa e avaliados após congelação-descongelação através de microscopia de fluorescência

Parâmetros	Tratamentos				
	T1 - controle (MB+5,0%GO)	T2 (MB+0,5%MO)	T3 (MB+1,0%MO)	T4 (MB+2,5%MO)	T5 (MB+5,0%MO)
AI	71,80 ± 1,51 ^a	65,60 ± 1,45 ^b	61,55 ± 1,3 ^{bc}	57,30 ± 0,95 ^c	56,40 ± 1,42 ^c
MPI	77,50 ± 2,08 ^a	63,35 ± 1,81 ^b	61,45 ± 1,63 ^b	60,50 ± 1,77 ^b	65,25 ± 2,62 ^b
AM alta	64,30 ± 1,00 ^a	57,65 ± 1,21 ^b	59,75 ± 1,84 ^{ab}	57,20 ± 1,37 ^b	56,70 ± 0,88 ^b
AM baixa	33,43 ± 0,98 ^a	42,35 ± 1,21 ^b	40,25 ± 1,84 ^b	42,80 ± 1,37 ^b	43,30 ± 0,88 ^b

Os dados foram distribuídos normalmente e os valores são apresentados como média ± erro padrão. Médias seguidas por diferentes letras dentro de uma mesma linha diferem significativamente entre tratamentos ($P < 0,05$).

T1 = meio-base + 5,0% gema de ovo; T2 = meio-base + 0,5% óleo de moringa; T3 = meio-base + 1,0% óleo de moringa; T4 = meio-base + 2,5% óleo de moringa; T5 = meio-base + 5,0% óleo de moringa; AI = acrossoma íntegro; MPI = membrana plasmática íntegra; AM alta = atividade mitocondrial alta; AM baixa = atividade mitocondrial baixa.

Apesar da redução dos parâmetros cinéticos e da diferença entre os tratamentos testes e o controle, observou-se que o óleo de moringa apresentou um percentual de espermatozoides com acrossoma e membrana intactas, bem como células com alta atividade mitocondrial superior a 50%, sendo considerado valores aceitáveis para sêmen submetidos ao processo de congelação-descongelação.

Ainda em relação a avaliação do sêmen criopreservado, na avaliação da morfologia espermática, observou-se que quanto ao percentual de espermatozoides normais, o controle (T1) e o T4 foram semelhantes ao fresco ($P > 0,05$), já entre o T2, T3, T4 e T5 não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) e foram semelhantes ao controle (T1).

Em relação ao acrossoma, o fresco diferiu apenas do T3 ($P < 0,05$); no entanto, o T3 foi semelhante ao controle (T1; $P > 0,05$). Quanto aos defeitos de cabeça, não foi observada diferença entre o fresco e os tratamentos contendo moringa ($P > 0,05$), como também não foi observada diferença entre o controle e os demais tratamentos ($P > 0,01$); entretanto, o controle (T1) mais defeitos de cabeça do que o fresco ($P < 0,05$). Quanto aos defeitos de peça intermediária, os menores valores foram observados no fresco e no T5, não diferindo dos valores encontrados em T1, T2 e T4 ($P > 0,05$). Em relação aos defeitos de cauda e à presença de gota citoplasmática, não foram observadas diferenças entre o fresco, o controle e os demais tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6 – Análise morfológica do sêmen caprino diluído em meio-base (ACP-101c + 7% glicerol + 0,8 mg/ml antimicrobiano) sem e com a adição de óleo de moringa e avaliados a fresco e após congelação-descongelação

Parâmetros (%)	Tratamentos					
	Fresco	T1 - controle (MB+5,0%GO)	T2 (MB+0,5%MO)	T3 (MB+1,0%MO)	T4 (MB+2,5%MO)	T5 (MB+5,0%MO)
NOR	94,25±0,71 ^a	90,65±0,77 ^{ab}	89,55±0,88 ^b	88,00±1,14 ^b	90,75±0,80 ^{ab}	89,85±0,85 ^b
ACR	0,00±0,00 ^a	0,50±0,15 ^{ab}	0,15±0,11 ^a	0,70±0,11 ^b	0,25±0,11 ^{ab}	0,45±0,16 ^{ab}
CAB	0,10±0,10 ^a	1,05±0,20 ^b	0,95±0,27 ^{ab}	1,00±0,28 ^{ab}	0,60±0,18 ^{ab}	0,65±0,25 ^{ab}
PI	1,20±0,36 ^a	2,40±0,21 ^{ab}	3,35±0,59 ^{ab}	4,15±0,40 ^b	2,90±0,36 ^{ab}	2,30±0,27 ^a
CAU	4,45±0,35 ^a	5,20±0,46 ^a	6,10±0,54 ^a	6,10±0,79 ^a	5,35±0,45 ^a	6,50±0,69 ^a
GC	0,00±0,00 ^a	0,20±0,08 ^a	0,25±0,15 ^a	0,10±0,07 ^a	0,15±0,08 ^a	0,25±0,08 ^a

Os dados foram distribuídos normalmente e os valores são apresentados como média ± erro padrão. Médias seguidas por diferentes letras dentro de uma mesma linha diferem significativamente entre tratamentos ($P < 0,05$).

T1 = meio-base + 5,0% gema de ovo; T2 = meio-base + 0,5% óleo de moringa; T3 = meio-base + 1,0% óleo de moringa; T4 = meio-base + 2,5% óleo de moringa; T5 = meio-base + 5,0% óleo de moringa; NOR = espermatozoides normais; ACR = espermatozoides com acrossoma danificado; CAB = espermatozoides com defeito(s) na cabeça; PI = espermatozoides com alterações na peça intermediária; CAU = espermatozoides com alterações na cauda/flagelo; GC = espermatozoides com presença de gota citoplasmática.

Nos dados obtidos com a avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados, os valores médios para espermatozoides normais foram superiores a 80% em todos os tratamentos, como recomendado para a espécie (MANUAL..., 2013). Isso demonstra que o óleo de moringa preservou a estrutura dos espermatozoides.

Logo, diante de todos os resultados obtidos, sugere-se que o óleo de moringa é capaz de proteger as membranas espermáticas. No entanto, devido a ser um óleo, pode estar impedindo a movimentação dessas células. Assim, considerando que esse estudo é pioneiro no uso do óleo de moringa como crioprotetor externo em meio de criopreservação seminal, são necessárias novas pesquisas com o meio-base ACP-101c associado ao óleo de moringa para definição de protocolos e obtenção de melhores resultados, principalmente para espermatozoides congelados-descongelados.

8 CONCLUSÃO

Os crioprotetores de origem vegetal proporcionam um maior controle sanitário do produto, uma vez que não sofrem contaminação por vírus ou bactérias, podendo oferecer material biológico de melhor qualidade para ser introduzido em diferentes rebanhos no âmbito nacional ou internacional.

O óleo da *M. oleifera* adicionado ao meio de conservação de sêmen caprino à base de água de coco em pó (ACP-101c) não apresenta toxicidade aos espermatozoides e preserva a qualidade espermática, em protocolos de refrigeração a 4 °C, dentro dos valores preconizados para a espécie caprina. No entanto, o óleo de moringa não foi eficaz em proteger a membrana espermática durante o processo de congelação-descongelação, tornando-se necessários novos estudos para aprimorar o meio de criopreservação.

REFERÊNCIAS

- AAMDAL, J.; LYGSET, O.; FOSSUM, K. Toxic effect of lysolecithin on sperm a preliminary report. **Nordisk Veterinariaer Medicin**, v.17, p.633-634, 1965.
- ABOAGLA, E.M.E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1160-1172, 2004.
- AFOLABI, A.O.; ADEROJU, H.A.; ALAGBONSI, I.A. Effects of methanolic extract of “Moringa oleifera” leaves on semen and biochemical parameters in cryptorchid rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v.10, p.230-235, 2013.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.317-325, 2004.
- ANDRADE, S.J.; MARQUES JR., A.P.; LEITE, R.C. Sêmen caprino congelado: Efeito de dois diluidores sobre a taxa de fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.245, 1999.
- ANGRIMANI, D.S.R. *et al.* Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.39, n.2, p.277-283, 2015.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinarie**, supl.31, p.226-227, 2003.
- ARRUDA, R.P. *et al.* Técnica para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.168-184, 2010.
- ARRUDA, R.P. *et al.* Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- ASMA, S.; ANWAR, F.; MANZOOR, M.; FATIMA, A. Antioxidant activity of different solvent extracts of “Moringa oleifera” leaves under accelerated storage of sunflower oil. **Asian Journal of Plant Science**, v.6, p.630-635, 2005.
- AZEVEDO, H.C.; MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. **Revista Científica Rural**, v.5, n.2, p.148-157, 2000.

BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v.5, n.3, p.119-126, 2009.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction Technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.255-266, 2004.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 307p.

BECKER-SILVA, S.C. **Limites de tolerância do espermatozoide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes**. 2004.121f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BEZERRA, A.M.E.; MEDEIROS FILHO, S.; FREITAS, J.B.S.; TEOFILO, E.M. Avaliação da qualidade das sementes de "Moringa oleifera" lam. durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.6, p.1240-1246, 2004.

BEZERRA, F.S.B. Inseminação artificial em caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, Supl., p.S26-S29, 2010.

BISPO, C.A. *et al.* Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.100, p.54-58, 2011.

BLUME, H.; MARQUES JR, A.P.V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, p.97-104, 1994.

BOUSSEAU, S. *et al.* Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.

BRITO, B.F. **Criopreservação de sêmen ovino em meio à base de água de coco em pó (acp-102c) adicionada de óleo de coco extra virgem**. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017.

BRITO, B.F. *et al.* Influência do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.47, n.1715, p.1-7, 2019.

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**, v.89, p.24-30, 2010.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, 2011.

CÂMARA, T.S. *et al.* Comparação da qualidade seminal de caprinos das raças Canindé e Alpina Britânica no Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, p.1260-1268, 2019.

CAMPOS, A.C.N. **A água de coco criopreservada, proveniente de frutos de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor do sêmen caprino.** 1999. 45 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1999.

CAMPOS, A.C. N. *et al.* Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.4, p.620-624, 2003.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.384-391, 2006.

CARNEIRO, G. F. Transporte e criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, supl., n.5, p.37-41, 2002.

CARVALHO, M.A.M.; NUNES, J.F.; GONDIM, J.M. Prolongamento da motilidade de espermatozoides de carpa comum, *Cyprinus carpio* L., pelo uso de água de coco (*Coccus nucifera*) como diluidor de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, p.184-186, 2002.

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

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2005.

CELEGHINI, E.C.C. *et al.* Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorometric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.

CELEGHINI, E.C.C. *et al.* Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.536, 2010.

CHEMINEAU, P. *et al.* Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **Animal Production and Health**, n.83, p.222, 1991.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: MAIBDF, 1984. 765p.

CORTEEL, J.M. Viabilité des spermatozoïdes de boue conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal effet du glucose. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v.14, n.1B, p.741-745, 1974.

COSSON, J. A moving of flagella: new and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v.20, n.2, p.83-94, 1994.

COSTA, J.M.S. *et al.* Efeito da adição dos antioxidantes Trolox C e ácido ascórbico no sêmen fresco de carneiros sobre a integridade acrossomal dos espermatozoides. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.18, p.306-310, 2015.

COX, J.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p.860-867, 2006.

DANTAS, C.C.O.; NEGRÃO, F.M. Biotecnologias na reprodução de caprinos. **PUBVET**, v.4, n.29, p.1-13, 2010.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos Animais Domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1980. 192p.

EL-HARAIRY, M.A.; SHAMIAH, S.H.M.; GHODAI, A.E. Influence of oral whole extract from “Moringa oleifera” on semen characteristics of rabbits. **Journal of Animal and Poultry Production**, v.7, n.6, p.217-224, 2016.

EVANS G.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of semen. In: **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Wellington: Butterworths, 1987. p.122-141.

FARREL, P.B. *et al.* Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.

FAUSTINO, L.R. **Sêmen humano criopreservado em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-113)**. 2007. 58 f. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2007.

FERNANDES, C.E.; PIMENTEL, C.A. Anormalidades de acrossomo e fertilidade em um garanhão: relato de um caso. **Ciência Rural**, v.27, n.2., 1997.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. Moringa oleifera: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.21, n.4, p.431-437, 2008.

FIGUEIREDO, E.A.P.; PANT, K.P.; LIMA, F.A.M.; FERNANDES, A.A.O. Brazilian goats: genetics resources. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-DDT, 1987. p.683-699.

FONSECA, J.F. *et al.* **Bioteecnologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2014. 108p.

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. A caprinocultura leiteira no Brasil: uma visão histórica. In: FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. **Produção de caprinos na região da Mata Atlântica**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. p.15-24.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, p.277-284, 1977.

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

GIL, J.L.; NIELS, S.L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241-1255, 2003.

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

GONZALEZ, C.I.M.; OBA, E.; BICUDO, S.D. Avaliação do sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e "pellets" com diferentes meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.280-281, 1999.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozoide bovino**. 2004. 92 f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GRANADOS, L.B.C.; DIAS A.J.B.; SALES, M.P. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos**. Campos dos Goytacazes-RJ: Proj. Proex/UENF, 2006. 54p.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed., Barueri, SP: Manole, 2004. 530p.

HALANGY, W.; FRANK, K.; BOHNEENSACK, R. Zur bestimmungder mengeintakter spermien in bullenejakulaten. **Archiv für Experimentelle Veterinaermedizin**, v.38, n.1, p.105-114, 1984.

- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.
- HANCOCK, J.L.; TREVAN, D.J. The acrossoma and post-nuclear cap of bull spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v.76, p.77, 1957.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.
- HOWARD, T.W.; PACE, M.M. Seminal evaluations and artificial examination. In: LAING, J.A.; MORGAN, W.J.B.; WAGNER, W.C. **Fertility and infertility in veterinary practice**. 4.ed. London: Bailliere Tindall, 1988. p.39-51.
- HURTGEN, J.P.; JOHNSON, L.A. Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrossoma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.32, p.15-20, 1982.
- IRITANI, A.J.; NISHIKAWA, Y. **Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation**. Kyoto: Proc. Kyoto, 1961. p.97-104.
- JAHN, S.A.A.; MUSNAD, H.A.; BURGSTALLER, H. A árvore que purifica a água. Cultivando Moringaceae multiuso no Sudão. **Unasyiva**, v.38, n.152, p.23-28, 1986.
- JORDAN, F.T.W.; PATTISON, M. **Poultry diseases**, 4 ed. Londres: W B Saunders Company Ltd., 1996. 546p.
- KUNDU, C.N. *et al.* Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p.117-125, 2000.
- LALAS, S.; TSAKNIS, J. Characterization of Moringa oleifera seed oil variety "Periyakulam 1". **Journal of Food Composition and Analysis**, v.15, p.65-77, 2002.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.
- LINHARES, F.R.A. *et al.* Effect of vitamins added to the ACP-104 extender on the quality of cryopreserved semen of common carp (*Cyprinus carpio*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, p.980-988, 2017.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 347p.
- MACHADO, L.S.; CARNEIRO, J.G.M. **Semente de moringa: avaliação das farinhas integral e desengordurada, caracterização da fração lipídica e ação coagulante da farinha desengordurada sobre a água turva do Rio Poti**. Teresina: UFPI, 2000. 13p.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Effects of two washing solutions on sperm survival of bucks. In: BATTACHARYA, L.; SAHNI, P. K. **Recent advances in goat production**. New Delhi: International Goat Association, 1992. p.1089-1094.

MAIA, M.S. **Considerações sobre a caprinocultura no Brasil**. Rio Branco: EMBRAPA-CPAF-Acre, 1994. 28p.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-C e catalase**. 2006. 163 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2006.

MAIA, M.S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl.2, p.389-395, 2014.

MANUAL para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

MASCARENHAS, R. Inseminação artificial em caprinos: produção e conservação de sêmen. **Veterinária Técnica**, p.14-17, 1994.

MATOS, F.J.; ABREU. **Farmácias vivas**: sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 220p.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A., ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction of Fertility and Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, v.247, n.3, p.125-C142, 1984.

MELO, C.C.S. **Conservação de sêmen caprino a 4°C utilizando ACP-101 com duas concentrações de Aloe vera ou gema de ovo**. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95 p.755-763, 1992.

MORTIMER, S.T. CASA – Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v.21, p.515-524, 2000.

MORTON J. F. A árvore de rábano, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae): um benefício para as terras áridas. **Economic Botany**, v.45, n.3, p.318-333, 1991.

NEVES, J.P.; BLAYA, M.C.R.; TEIXEIRA, P.R. Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. **A Hora Veterinária**, v.14, p.11-14, 1983.

NEVES, J.P. *et al.* Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca Ltda., 2008. p.83-103.

NOGUEIRA FILHO, A.; KASPRZYKOWSKI, J.W.A. **O agronegócio da caprino-ovinocultura no Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2006. 54p.

NUNES, J.F.; CORTEEL, J. M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.22, p.76-86, 1982.

NUNES J.F.; COMBARNOUS Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1., 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, 1995. p.53-64.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, p.109-112, 1998.

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

PELLICER-RUBIO, M.T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60- kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1023-1031, 1997.

PETERSON, R.N.; SILVERSTEIN, K.; FEUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.41, p.485-488, 1974.

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

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K.V.; GOPALAKRISHNAN, P.K. Drumstick (*Moringa oleifera*) a multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, v.34, p.276-283, 1980.

RANGEL, M. S. **Moringa oleifera: um purificador natural de água e complemento alimentar para o nordeste do Brasil**. 2003. Disponível em:

<http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/A10moringa.htm>. Acesso em: 18 set. 2019.

REDDY, V.S. *et al.* Effect of sericin supplementation on heat shock protein 70 (HSP70) expression, redox status and post thaw semen quality in goat. **Cryobiology**, v.84, p.33-39, 2018.

RICARTE, A.R.F.; SILVA, A.R. Morfofisiologia da reprodução de caprinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, Supl., p.S8-S13, 2010.

ROBERTA, C.; PETER, K.V.; GOPALAKRISHNAN, P.K. Drumstick (*Moringa oleifera*): um vegetal indiano multiuso. **Economic Botany**, n.3, p.276-283, 1980.

ROCA, J. *et al.* Viability and fertility of unwashed Murciano Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5 °C. **Small Ruminant Research**, v.25, n.2, p.147-153, 1997.

ROCA, J. *et al.* Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.103-112, 2000.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. 8p.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. **Nature**, v.159, p.318-319, 1957.

SAACKE, R.G.; AMANN, R.P.; MARSHALL, C.E. Acrossomal cap abnormalities of sperm from sub fertile bulls. **Journal of Animal Science**, v.27, p.1391-1399, 1968.

SAKASHITA, S.M. *et al.* Inseminação artificial em caprinos: Associação das técnicas de diluição e refrigeração do sêmen. **PUBVET**, Londrina, v.6, n.14, Ed. 201, Art.1345, 2012.

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

SALGUEIRO, C.C.M. *et al.* Utilização de diluentes à base de água de coco "in natura" e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, p.96-8, 2002.

SAMPAIO NETO, J.C. *et al.* Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.5, p.137-139, 2002.

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**, Belo Horizonte, v.42, n.3-4, p.96-100, 2018.

SANTOS, R.L. **Diagnóstico da cadeia produtiva da caprinocultura de corte no Estado da Bahia**. 2001. 40 f. Monografia (Especialização em Administração em Agribusiness), Faculdade São Francisco de Barreiras, Barreiras, 2001.

SILVA, A.R.; KERR, W.E. **Moringa**: uma nova hortaliça para o Brasil. Uberlândia: UFU/DIRIU, 1999. 95p.

SILVA, M.R. *et al.* Longevidade do sêmen ovino criopreservado em diluidor tris-gema suplementado com ácido linoleico conjugado (CLA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 28., 2018, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: Congresso de Brasileiro de Zootecnia, 2018. p.1-5.

SILVA NETO, J.M.R. **Em torno da origem do caprino nacional Moxotó**. Recife: Ass. dos Eng. Agr. do Nordeste, 1950. 43p.

SILVA, R.A.C.; SOUZA, T.O.; DIAS, L.P.; ANDRADE, T.J.A.S. Ação do extrato metanólico da Moringa oleifera sobre o crescimento micelial de fitopatógenos. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 4., 2009, Belém-PA. **Anais...** Belém: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Inovação Tecnológica, 2009.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista de Brasileira Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.370-384, 2011.

SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1989, Belo Horizonte, MG. Anais [...] Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.171-177.

SMITH, A.H.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p.668-671, 1950.

SOBREIRA NETO, J. A. **Avaliação in vitro do sêmen equino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, M.S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu-SP, v.20, p.649-657, 2012.

ST. JOHN, J.C. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v.57, p.109-123, 2002.

TRALDI, A.S. **Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – Manual técnico**.1994. 54p. Apostila.

- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2002.
- VIVEIROS, A.T.M. *et al.* Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: ISRPF, 8., 2008, Santo Malo, França. **Anais...** Santo Malo: ISRPF, 2008. p.137.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.1, p.183-350, 1979.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, n.4, p.871-91, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.
- ZEDER, M.A.; HESSE, B. The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros mountains 10000 years ago. **Science**, v.287, p.2254-2257, 2000.
- ZEUNER, F.E. **A history of domesticated animals**. New York: Harper & Row, 1963. 560 p.
- ZHANG, B.R. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-program. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi CEP 60740-903 – fone 3101-9890 ceua.ueca@uece.br – www.uece.br/ceua	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ <small>Secretaria de Ciência, Tecnologia e Educação Superior</small>
--	--	--

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Desenvolvimento de meio de criopreservação de sêmen caprino à base de água de coco adicionado de óleo de *Maringa oleifera* como substância de origem vegetal com ação crioprotetora da membrana espermática” registrado sob o número 4244862/2018, tendo como pesquisador principal José Ferreira Nunes está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de agosto de 2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled “Desenvolvimento de meio de criopreservação de sêmen caprino à base de água de coco adicionado de óleo de *Maringa oleifera* como substância de origem vegetal com ação crioprotetora da membrana espermática” registered with the protocol 4244862/2018, under the supervision of José Ferreira Nunes is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on August 31st, 2019.

RESUMO

Vigência do projeto	01/02/2018 a 28/02/2019
Espécie/inibição	Caprino
Número de animais	5
Peso/idade	40-60 kg, até dois meses
Sexo	Machos
Origem	Laboratório de Tecnologia de Sêmen de Caprino

Fortaleza, 13 de maio de 2018.


 Maria Erivalda Farias de Aragão
 Presidente CEUA-UECE