



Estudo da eficácia da *Aloe vera* como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos

Study of Aloe vera efficacy as a plant origin extender in the cooling on bovine epididymal spermatozoa

Camilla Flávia Avelino de Farias¹, André Luiz Pereira Tork², Alex Souza Rique², Aline Francelina de Queirós¹, Sildivane Valcácia Silva^{1,2}

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal¹ - Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB.
Centro de Biotecnologia² - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

Resumo

Objetivou-se testar concentrações de *Aloe vera* para produção de diluidor vegetal na refrigeração espermática. Amostras obtidas de epidídimos bovinos foram recuperadas e homogeneizadas para formação do *pool*. Sete grupos experimentais foram formados: GC= Grupo TRIS-Gema; G5= AV5%+1,488g frutose; G10= AV10%+1,488g frutose; G20= AV20%+1,488g frutose; GF5= AV5%+2,976g frutose; GF10= AV10%+2,976g frutose; GF20= AV20%+2,976g frutose. Os grupos foram submetidos às avaliações de quantificação de açúcares redutores; reologia; potencial hidrogeniônico (pH) a 5 °C e 37 °C; motilidade subjetiva, integridade e funcionalidade da membrana plasmática nos períodos T0 (momento diluição) e T2 (ao atingir 5 °C); crescimento microbiológico após 48h e 72h de refrigeração. Os G20 e GF20 apresentaram maior ($p<0,05$) viscosidade que os demais grupos. Os grupos AV apresentaram menor ($p<0,001$) motilidade em comparação ao GC. Não houve diferença ($p>0,05$) na integridade e funcionalidade da membrana plasmática entre grupos e tempo de avaliação. No crescimento microbiológico, após 72h, o G20 apresentou efeito antimicrobiano. Conclui-se que concentrações de extrato de *Aloe vera* interferem negativamente na motilidade de espermatozoides epididimários bovino, porém preservam a integridade e funcionalidade da membrana plasmática e apresentam efeito antimicrobiano. Estudos para determinação da viscosidade ideal do extrato e aprimoramento da confecção deste possível diluidor vegetal devem ser encorajados.

Palavras-chave: babosa, criopreservação, epidídimo.

Abstract

The current study aimed to test concentrations of Aloe vera for production of plant origin extender to sperm cooling. Samples obtained from bovine epididymis were recovered and homogenized for pool formation. Seven groups were performed: GC= TRIS-egg yolk Group; G5= AV5%+1.488g fructose; G10= AV10%+1.488g fructose; G20= AV20%+1.488g fructose; GF5= AV5%+2.976g fructose; GF10= AV10%+2.976g fructose; GF20= AV20%+2.976g fructose. The groups they were submitted to the quantification of sugar reduction; rheology; hydrogenation potential (pH) at 5 °C and 37 °C; subjective motility, integrity and functionality of the plasma membrane at T0 (dilution moment) and T2 (reaching 5 °C) periods; microbiological growth after 48h and 72h by refrigeration. The G20 and GF20 presented higher ($p<0.05$) viscosity than other groups. The AV groups presented lower ($p<0.001$) motility compared to GC. No difference ($p>0.05$) were observed in the integrity and functionality of the plasma membrane among groups and times of evaluation. In the microbiological growth, after 72h, the G20 presented antimicrobial effect. Therefore, concentrations of Aloe vera extract negatively interfere with bovine epididymal sperm motility, but preserve integrity and functionality of spermatozoa plasma membrane and present antimicrobial effect. Studies to determine the ideal viscosity of the extract and improvement of the preparation of this possible plant origin extender should be encouraged.

Keywords: aloe, cryopreservation, epididymis.

Introdução

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo é uma técnica importante para preservar as células de animais valiosos recém-mortos. Os procedimentos de isolamento de espermatozoides do epidídimo, a criopreservação e sua posterior utilização para a fecundação são importantes ferramentas para resgatar material genético que poderia ser perdido, tanto de animais de

¹Correspondência: Camillafarias@gmail.com; Sildivane@cbiotec.ufpb.br

Recebido: 11 de junho de 2019

Aceito: 13 de setembro de 2019



produção, como em espécies em extinção (Muradás et al., 2006; Martins et al., 2007).

No mercado há diversos diluidores que buscam manter as características seminais essenciais à reprodução, os quais agem sob o ponto de congelamento da solução, momento em que ocorre a formação dos cristais de gelo (Monreal et al., 2013). Estes diluidores têm como crioprotetor extracelular uma base de produtos de origem animal, como a gema de ovo e/ou leite desnatado. Porém esses diluidores de origem animal são difíceis de padronizar e introduzem o risco de contaminação microbiana. Um diluidor bem definido, não originário de tecidos animais, apresentaria uma valiosa contribuição para a indústria de IA (Van Wagtenonk-De Leeuw et al., 2000).

Babosa é o nome popular dado a uma planta africana pertencente à família das Liliáceas e do gênero *Aloe*, à qual pertencem mais de 300 espécies. Uma das espécies mais conhecida é a *Aloe vera*, sendo a mais estudada pelas indústrias. O interior de suas folhas é constituído de um tecido parenquimático rico em polissacarídeos, conhecido como mucilagem, que lhe confere uma consistência viscosa. Nesta mucilagem ou gel encontram-se princípios ativos, que são constituídos de tecidos orgânicos, enzimas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos, dentre os quais 18 são importantes para o homem, e desses, sete pertencem aos oito aminoácidos não sintetizados pelo organismo humano (Bach e Lopes, 2007).

Alguns estudos utilizaram a *Aloe vera* no diluidor para testar seu possível efeito crioprotetor em diferentes espécies. Melo-Maciel et al. (2015), utilizando espermatozoides de peixe tambaqui, observaram que a *Aloe vera* em associação ao diluidor à base de água de coco (ACP®), permitiu a manutenção de taxa de morfologia espermática dentro dos padrões de normalidade e presença de espermatozoides móveis. Melo (2010) mostrou que a utilização do extrato bruto de *Aloe vera* adicionado ao diluidor ACP®, na concentração de 5%, é capaz de manter os parâmetros de viabilidade de espermatozoides caprinos por um período de refrigeração. Em outro estudo, Melo (2015) mostrou que a gema de ovo pode ser substituída por 5% do gel de Aloe vera no diluidor de refrigeração de sêmen de cães.

Devido à utilização da *Aloe vera* pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e fitoterápica (Bach e Lopes, 2007), por conter componentes ativos em seu gel e pela presença de análises satisfatórias em estudos utilizando a *Aloe vera* em espermatozoides de diferentes espécies, a perspectiva deste trabalho é que o diluidor à base de *Aloe vera* possa substituir diluidores à base de origem animal na capacidade de preservar os parâmetros de viabilidade de espermatozoides epididimários bovino, submetidos ao processo de refrigeração.

Material e Métodos

Caracterização do extrato de *Aloe vera*

Para obtenção do extrato bruto foram colhidas folhas de diferentes *Aloe barbadensis* Miller, com cinco dias de restrição hídrica para concentração dos princípios ativos. Realizou-se a retirada da camada externa utilizando faca inox e, em seguida, a extração do parênquima mucilaginoso da folha, com aspecto de gel incolor. Em seguida, o gel foi filtrado em peneira inox e colocado em becker para posteriores análises e divisão dos volumes a serem adicionados às soluções específicas.

Foi avaliado o gel da *Aloe vera* puro e filtrado (filtro de membrana polietersulfona 0,22 µm; com o objetivo de diminuir a viscosidade). Como a filtração pode reter açúcares, utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico), proposta por Miller (1959), baseado na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico, para mensuração dos açúcares redutores.

Para a formação dos grupos experimentais, foram utilizadas diferentes concentrações do extrato de *Aloe vera*, diluídos em tampão TRIS (3,605g Tris; 2,024g ácido cítrico; 1,488g ou 2,976g de frutose; 100 mL de água bidestilada). Diferentes concentrações de frutose foram acrescentadas ao estudo devido aos resultados obtidos no teste de açúcares redutores: GC (Grupo controle, diluidor Tris-gema): TRIS + 20% de gema de ovo; G5: TRIS com 1,488g de frutose + 5% do extrato bruto de AV; G10: TRIS com 1,488g de frutose + 10% do extrato bruto de AV; G20: TRIS com 1,488g de frutose + 20% do extrato bruto de AV; GF5: TRIS com 2,976g de frutose + 5% do extrato bruto de AV; GF10: TRIS com 2,976g de frutose + 10% do extrato bruto de AV; e GF20: TRIS com 2,976g de frutose + 20% do extrato bruto de AV.

O pH foi mensurado com auxílio de fitas de pH (Merck, Alemanha), sendo analisado o grupo controle (Tris-gema) e os grupos com a adição da *Aloe vera* nas temperaturas 5 °C e 37 °C. A mensuração foi realizada adicionando-se 50 µL de cada amostra sobre as fitas e avaliado de acordo com a coloração indicativa ofertada pelo fabricante na caixa.

Para mensuração das viscosidades dos diluidores à base de *Aloe vera* e do Tris-gema de acordo



com a temperatura, foi utilizado o reômetro (Brookfield LVDVIII Ultra, São Paulo), localizado no Laboratório de Petróleo do Centro de Tecnologia na Universidade Federal da Paraíba, Campus I. Quinhentos microlitros da amostra foram colocados no recipiente do reômetro e submetidos a um torque suficiente para manter a rotação do spindle CP51 imerso na amostra nas temperaturas de 5 °C e 37 °C. Foram obtidos 30 pontos de cada amostra e realizada a média da viscosidade dada em centipoise (cP).

Para realização dos ensaios microbiológicos foi preparado o meio de crescimento BDA (batata, dextrose, ágar; Santos et al., 2019). O meio BDA foi distribuído em 14 placas de Petri estéreis, completando-as até sua metade e deixadas em câmara de fluxo laminar até a solubilização. Após a solubilização foram retiradas alíquotas de 50 µL de cada grupo experimental nos tempos 48h e 72h de refrigeração e adicionado nas diferentes placas contendo meio de cultura, espalhando o líquido com auxílio de *swab* estéril. Feito isso, as placas foram fechadas e armazenadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Por fim, as placas foram analisadas através da contagem de UFC (unidade formadora de colônia), a cada 24 horas.

Análise da interação espermática com os diluidores à base de *Aloe vera*

Foram utilizados 26 conjuntos de testículos/epidídimos de bovinos sem raça definida obtidos em matadouros localizados na cidade de João Pessoa-Paraíba (07° 05' 00" S 34° 50' 00" O). Após abate, o conjunto testículo-epidídimo foi separado, armazenado e encaminhado ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da Universidade Federal da Paraíba, Campus I. Os espermatozoides foram recuperados pela técnica de flutuação, através do fatiamento da cauda do epidídimo e em posterior imersão em 2,0 mL de solução fisiológica estéril, aquecida a 37 °C. Os espermatozoides recuperados foram avaliados e os aprovados segundo os critérios de percentual de células móveis, foram homogeneizados para a formação do *pool*, com o intuito de minimizar a variável individualidade. Posteriormente, realizou-se a avaliação da motilidade subjetiva do *pool*. Amostras com motilidade mínima de 50% foram utilizadas neste estudo (Silva et al., 2004).

O *pool* foi então separado em sete alíquotas e diluído nos grupos experimentais. A diluição média final foi de 80×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, os grupos foram acondicionados em tubos plásticos de 1,5 mL e submetidos à curva de refrigeração por duas horas, até alcançar 5 °C. Na sequência, foram submetidos às análises de motilidade subjetiva, integridade e funcionalidade da membrana plasmática e morfologia espermática. O experimento foi realizado quatro vezes, com amostras avaliadas em duplicata.

A motilidade foi realizada por avaliação subjetiva expressa em porcentagem (0-100%), sendo realizada em microscópio óptico (Químis, São Paulo), objetiva de 40x, sendo usada uma alíquota (10 µL) da amostra entre lâmina e a lamínula. A avaliação da motilidade foi expressa em porcentagem, com variação de 0-100%, considerando a média de três avaliadores (CBRA, 2013).

Para o teste de integridade de membrana foi empregada dupla coloração com os corantes eosina e nigrosina; foram diluídos 25 µL de cada grupo experimental em solução contendo 50 µL do corante e 25 µL de solução fisiológica. Após a diluição, foi realizado o estiramento com 10 µL de cada amostra e contadas 200 células, determinando-se a proporção entre células coradas e não coradas (células mortas e vivas, respectivamente) em microscópio de campo claro em aumento de 40x (Murgas et al., 2002).

Para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática, foram utilizados 10 µL de cada grupo diluído em 100 µL de solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H₂O), composta por citrato de sódio e água destilada. A solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação foram colocados 50 µL de solução formol-salina para parar a reação osmótica espermática. O HOST foi avaliado colocando 10 µL de sêmen com solução entre lâmina e lamínula e observado através de microscopia ótica com aumento de 40x. Foram contadas 200 células, considerando funcionais aquelas com cauda enrolada e não-funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada (Fagundes et al., 2010).

Para avaliação da morfologia espermática, utilizou-se a Câmara Úmida, onde 10 µL do *pool* foram diluídos em uma solução de formol-salina (1:10). Foram contadas 100 células em microscópio óptico (40x). Este teste foi realizado para contabilizar as anormalidades morfológicas presentes, com o intuito de subtrair do total de alterações de cauda observadas no teste hiposmótico, evitando valores percentuais superestimados de células reativas (Melo et al., 2005).

Os dados foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos dados. Identificado os dados como paramétricos, para comparações entre os grupos experimentais foi utilizado o teste ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey e para comparação entre os tempos de um mesmo tratamento, foi utilizado o teste t pelo software da IBM, SPSS Statistics (versão 18.0 para Windows). Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5% e os dados foram expressos na forma de média e desvio padrão.



Resultados

No resultado da determinação de açúcares redutores, notou-se diminuição dos açúcares (glicose e frutose) após a filtração (0,175 g/L) em comparação com o extrato bruto (0,205 g/L) da *Aloe vera*.

Não houve variação do potencial hidrogeniônico entre o grupo controle e os grupos com o diluidor com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose independentemente da temperatura, mantendo-se pH 6,5.

Na viscosidade do extrato (Tabela 1), todos os grupos obtiveram uma diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura. Também foi observado que os grupos com as menores quantidades de *Aloe vera* (G5, G10, GF5 e GF10) mostraram menor ($P<0,05$) viscosidade quando comparados aos grupos com maiores concentrações de *Aloe vera* (G20 e GF20). Entretanto, os grupos com a adição de 2,976g de frutose mostraram menor ($P<0,05$) viscosidade em comparação com os grupos com a adição de 1,488g de frutose.

Tabela 1. Valores da viscosidade do diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato concentrado de *Aloe vera* e frutose nas temperaturas 5 °C e 37 °C.

Grupos	Viscosidade do extrato de <i>Aloe vera</i> (cP)	
	5 °C	37 °C
GC	3,00±0,33 ^{Aa}	1,67±0,20 ^{Ba}
G5	3,64±0,14 ^{Aac}	0,78±0,16 ^{Bb}
G10	2,57±0,57 ^{Aad}	0,91±0,11 ^{Bbc}
G20	5,54±1,96 ^{Ac}	1,08±0,18 ^{Bc}
GF5	1,47±0,09 ^{Ab}	0,64±0,14 ^{Bd}
GF10	1,67±0,07 ^{Abd}	0,77±0,13 ^{Bbd}
GF20	4,56±2,23 ^{Aac}	0,97±0,15 ^{Bc}

GC= Grupo Controle (TRIS-Gema); G5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); GF5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 2,976g frutose). T10=10 °C; T37=37 °C. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos ($p<0,05$).

Nas colônias formadas ao decorrer de 24h a 37 °C (Tabela 2), percebeu-se que o GF5 apresentou efeito antibiótico igual ao diluidor controle com adição de antibiótico. Também, observou-se que o G10 teve efeito próximo ao GC, mostrando ação antibiótica, enquanto no grupo com G20 não foi observado crescimento após 72h de refrigeração. Ainda, observa-se maior presença de microrganismos nos GF10 e GF20.

Tabela 2. Efeito antimicrobiano do diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato concentrado de *Aloe vera* e frutose, mantidos sob refrigeração a 5 °C durante 48 e 72 horas

Grupos	Unidades Formadoras de Colônias por mililitros (UFC/mL)	
	T48	T72
GC	160	40
G5	60	400
G10	60	60
G20	140	0
GF5	40	40
GF10	640	160
GF20	160	220

GC= Grupo Controle (TRIS-Gema); G5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); GF5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 2,976g frutose). T48= Refrigeração dos diluidores à 5 °C por 48 horas; T72=Refrigeração dos diluidores à 5 °C por 72 horas.

Foi observada menor ($P<0,001$) motilidade entre os grupos AV em comparação ao GC, porém



não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os tempos de avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual (média \pm desvio padrão) de motilidade total subjetiva de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados em diluidor padrão (Tris-gema) e diluidores com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose

Grupos	Motilidade Total (%)	
	T0	T2
GC	57,50 \pm 5,24 ^a	54,17 \pm 9,70 ^a
G5	17,50 \pm 9,35 ^b	6,67 \pm 2,58 ^b
G10	18,33 \pm 10,80 ^b	11,16 \pm 5,31 ^b
G20	10,83 \pm 2,04 ^b	5,83 \pm 3,76 ^b
GF5	10,00 \pm 5,48 ^b	8,33 \pm 4,08 ^b
GF10	10,33 \pm 7,53 ^b	10,83 \pm 6,65 ^b
GF20	8,83 \pm 6,18 ^b	3,83 \pm 2,04 ^b

GC= Grupo Controle (TRIS-Gema); G5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); GF5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 2,976g frutose). T0=Momento de avaliação após a formação dos grupos em temperatura ambiente; T2 (5 °C) =Momento de avaliação 0 hora após atingir a temperatura 5 °C. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos ($p<0,05$).

Na integridade da membrana plasmática (Tabela 4), o percentual de espermatozoides com membranas íntegras se manteve estável ($P>0,05$), mostrando que os grupos AV e diferentes concentrações de frutose foram capazes de preservar a estrutura da membrana plasmática, como o tris-gema, diluidor universalmente utilizado na refrigeração de sêmen bovino, mesmo comportamento observado para a funcionalidade da membrana (Tabela 4), independente do diluidor e do tempo.

Tabela 4. Percentual (média \pm desvio padrão) de integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose

Grupos	Membrana Plasmática Inteira (%)		Membrana Plasmática Funcional (%)	
	T0	T2	T0	T2
GC	84,40 \pm 7,68	79,90 \pm 7,49	75,00 \pm 12,18	69,08 \pm 11,92
G5	87,70 \pm 7,56	83,70 \pm 4,96	64,50 \pm 14,43	60,25 \pm 11,67
G10	82,70 \pm 9,23	82,00 \pm 4,62	63,75 \pm 17,30	56,83 \pm 7,79
G20	88,60 \pm 6,80	80,60 \pm 6,40	60,75 \pm 16,11	66,41 \pm 11,67
GF5	87,10 \pm 7,17	86,20 \pm 5,12	63,91 \pm 7,51	57,91 \pm 2,35
GF10	87,30 \pm 2,86	84,10 \pm 4,08	55,33 \pm 12,32	57,41 \pm 9,71
GF20	81,10 \pm 6,34	83,60 \pm 2,88	62,41 \pm 11,67	55,41 \pm 10,59

GC= Grupo Controle (TRIS-Gema); G5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); G20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); GF5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); GF20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 2,976g frutose). T0=Momento de avaliação após a formação dos grupos em temperatura ambiente; T2 (5 °C) =Momento de avaliação 0h após atingir a temperatura 5 °C.

Discussão

Devido à baixa quantidade de açúcares (frutose e glicose) observados no extrato bruto e filtrado, optou-se por utilizar o extrato bruto e acrescentar grupos com diferentes concentrações de frutose para proporcionar suporte energético às células espermáticas.

Nos resultados do pH, os diluidores Tris com diferentes concentrações de AV conseguiram manter o pH 6,5, também observado no grupo com diluidor tris-gema, tornando aceitável para a preservação do espermatozoide nas diferentes temperaturas de refrigeração. A congelação dos espermatozoides ocorre na presença de diluidores compostos por substâncias crioprotetoras que têm como função minimizar os danos causados pelo choque térmico, manter o pH e a osmolaridade adequada (Wolfe e Bryant, 2001). Os sistemas tampões são utilizados para que o pH da solução seja mantido



próximo à neutralidade (6,8 a 7,1), pH ótimo para os espermatozoides, neutralizando os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozoides (Borges et al., 2011). Devido a *Aloe vera* conseguir manter o pH aceitável para criopreservação, permanecendo na média do crioprotetor comumente utilizado, torna os diluidores acrescidos com o extrato da *Aloe vera* uma alternativa promissora como substituto de diluidores com macromoléculas de origem animal.

Pode-se observar um aumento considerável da viscosidade com a diminuição da temperatura, principalmente nos grupos com a maior concentração do extrato da *Aloe vera*. A viscosidade de um líquido é uma resposta das forças intermoleculares que restringem o movimento molecular. Essas forças dependem dos espaçamentos intermoleculares que determinam o volume livre e são afetados pelas mudanças na temperatura e na pressão (Holdsworth, 1971). Essas informações corroboram com os resultados obtidos. Apesar da viscosidade aparentemente mais alta na maioria dos grupos contendo a *Aloe vera* em comparação ao grupo controle a 5 °C, todos os grupos diminuíram a viscosidade a 37 °C, tornando a viscosidade entre os grupos de valor aproximado nesta temperatura.

Da mesma forma, os grupos com menor quantidade de frutose (G5, G10 e G20) apresentaram viscosidades superiores aos grupos com maiores concentrações de frutose (GF5, GF10 e GF20), pois a depressão do ponto de congelamento aumenta com a concentração, enquanto que a atividade da água diminui, ou seja, o ponto de congelamento é dependente da quantidade de soluto não-volátil presente na solução (Lago et al., 2011). Desta forma, quanto menor a quantidade de solutos e/ou sólidos solúveis, como a frutose, menor será o tempo requerido para atingir o ponto de início de congelamento e, conseqüentemente, maior será a viscosidade. Desta forma, a maior concentração de frutose pode agir como crioprotetor externo.

Segundo Melo (2010), a substituição da gema de ovo presente no diluidor auxilia na redução dos eventuais problemas de contaminação e disseminação de doenças, por esta ser um produto de origem animal. Para isso têm-se buscado substâncias de origem vegetal, que possam conferir proteção semelhante ou superior às células, quando comparados com outros crioprotetores. Esta afirmação é comprovada nos testes de integridade e funcionalidade da célula espermática realizados neste estudo, uma vez que a *Aloe vera* foi capaz de manter estes parâmetros similares ao diluidor padrão para refrigeração de sêmen.

A *Aloe vera* possui amplo espectro antimicrobiano atuando em fungos, vírus e em bactérias Gram positivas e Gram negativas (Freitas et al., 2014). O mecanismo das propriedades antimicrobianas de *aloés* não está bem estabelecido, mas a saponina, um dos produtos químicos do *Aloe*, é indicada por essas ações (Obeng et al., 2004). Além disso, outros compostos como antraquinonas e acemanas atuam como agentes antibacterianos (Barreto et al., 2005). Essa característica da *Aloe vera*, de ter em sua composição agentes antimicrobianos, torna o extrato da planta um composto menos propício a contaminação para produção de diluidor para criopreservação. Estes dados foram verificados neste estudo, ao observar que os grupos com AV tiveram ação antimicrobiana.

Verificou-se diminuição da motilidade nos grupos *Aloe vera*. A motilidade é uma característica importante para a célula espermática, pois esta deve ser capaz de se locomover para fertilização (Kastelic et al., 1997). Vários fatores do meio de criopreservação podem prejudicar a motilidade, um desses fatores é a viscosidade (Hirai et al., 1997). Gastal (2012), em seu trabalho com xantana para congelamento de sêmen ovino, observou uma queda da motilidade e atribuiu essa diminuição à ação de viscosidade que a xantana produziu nas soluções. Em estudos com a adição da *Aloe vera*, Lima e Cardoso (2013) observaram uma queda da motilidade contendo 10% de extrato bruto da *Aloe vera*.

As propriedades reológicas do sêmen de algumas espécies como humano (Owen e Katz, 2005) e suíno (Corcini et al., 2011) mudam radicalmente após a ejaculação, onde o ejaculado primeiramente é líquido, mas rapidamente se coagula em um material gelatinoso para posteriormente se liquefazer. Esta liquefação ocorre durante um período de cinco minutos *in vivo*, mas pode demorar entre 20 a 30 minutos *in vitro* (Owen e Katz, 2005), apresentando comportamento pseudoplástico, onde a viscosidade aparentemente decresce com o aumento da taxa de deformação (Holdsworth, 1971). O extrato da *Aloe vera* mostra um comportamento pseudoplástico, devido à presença de mananas no gel (Yaron, 1993) que são polissacarídeos de armazenamento (Ni et al., 2004). Provavelmente o comportamento do extrato da *Aloe vera* está ligado à fraca rede de estrutura fibrosa de polissacarídeos presente no *Aloe vera* (Lad e Murthy, 2013).

A diminuição da motilidade observada neste experimento pode ser atribuída à ação da viscosidade que o extrato da *Aloe vera* apresentou em baixas temperaturas juntamente às gotas citoplasmáticas comumente encontrada nos espermatozoides oriundos do epidídimo (Savi et al., 2015), que pode dificultar a motilidade. Devido a esses fatores, pode-se ter esgotado as fontes energéticas do



espermatozoide, potencializando a diminuição da motilidade.

Porém, como observado nos resultados de integridade e funcionalidade da membrana plasmática, não houve alterações nesses parâmetros, indicando que os grupos com a presença do extrato da *Aloe vera* conseguiram manter a funcionalidade e integridade da membrana plasmática dessas células, resultado que também é observado nos grupos contendo tris-gema.

Antioxidantes são utilizados em espermatozoides submetidos à criopreservação por estes garantirem a proteção da estrutura das membranas das células de espermatozoides durante o processo de criopreservação (Tuncer et al., 2011). Desta forma, a adição de substâncias antioxidantes, que é qualquer substância que regule, iniba ou elimine de forma direta ou indireta as espécies reativas de oxigênio (ERO), podem contribuir para a sobrevivência das células espermáticas durante a conservação (Møller e Loft, 2006). Quimicamente, a *Aloe vera* é caracterizada pela presença de compostos fenólicos de grande poder antioxidante (Lee et al., 2000). Essa composição rica da *Aloe vera*, como também os açúcares presentes podem ter garantido a proteção da membrana plasmática, mantendo os parâmetros, sendo uma das características indispensáveis para um bom crioprotetor.

Considerações finais

O extrato de *Aloe vera* é uma alternativa para a demanda de diluidores provenientes de origem vegetal, pois apesar de se obter resultados inferiores de motilidade total dos espermatozoides nos grupos com o diluidor à base de *Aloe vera* em comparação ao diluidor tris-gema, a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides foram preservadas.

Assim, há a necessidade de novas pesquisas para que se possam realizar ajustes na composição do diluente em estudo, como formas para melhorar o comportamento reológico do fluido e a caracterização do extrato. Com isso há a possibilidade de se conseguir um extrato padronizado, que possa efetivamente substituir os diluidores à base de produtos de origem animal.

Referências

- Bach DB, Lopes MA.** Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (*Aloe vera* L.). *Cienc Agrotec*, v.31, p.1136-1144, 2007.
- Barreto LV, Feitosa MSCA, Araújo JT, Chagas KF, Costa KL.** Acción antimicrobiana in vitro de dentífricos conteniendo fitoterápicos. *Av Odontostomatol*, v.21, n.4, p.195-201, 2005.
- Borges JC, Silva MR, Guimarães JD, Esper CR, Franceschini PH.** Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.303-314, 2011.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*: manual de orientação. Belo Horizonte, 2013.
- Corcini CD, Valela Junior, AS, Pigozzo, R, Bongalhardo, DC, Lucia, TJ.** Comparação de diferentes diluentes na mensuração da concentração espermática de suínos em espectrofotômetro. *Semin Cienc Agrar*, v.32, n.1, p.1965-1968, 2011.
- Fagundes B, Tilburg MFV, Silva JFS, Shimoya A, Barreto MAP, Ferreiva VM.** Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. *Rev Bras Zootec*, v.39, n.2, p.273-278, 2010.
- Freitas VS, Rodrigues RAF, Gaspi FOG.** Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f. *Rev Bras Plantas Med*, v.16, n.2, p.299-307, 2014.
- Gastal GDA.** Xantana como aditivo crioprotetor externo para congelamento de sêmen ovino. 2012. *Dissertação (Mestrado em Veterinária)* - Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS, 2012.
- Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MPB, Braun J, Leidl W, Ohsaki K, Matsuzawa T, Miyazawa K, Sato K.** The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.47, p.1463-1478, 1997.
- Holdsworth SD.** Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products. *J Texture Stud*, v.2, p.393-418, 1971.
- Kastelic JP, Silva AEDF, Barbosa RT, Machado R.** Novos métodos de avaliação da capacidade reprodutiva de touros. In: Barbosa RT, Esteves SN, Barbosa PF. *Intensificação da bovinocultura de corte: estratégias de manejo reprodutivo e sanitário*. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, p.41-57, 1997.
- Lad VN, Murthy ZVP.** Rheology of Aloe barbadensis Miller: A naturally available material of high therapeutic and nutrient value for food applications. *J Food Eng*, v.115, p.279-284, 2013.



- Lago CC, Bernstein A, Brandelli A, Noreña CZ.** Estudo do comportamento reológico, da atividade de água e do ponto de início de congelamento do suco de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) a diferentes concentrações. *Brazilian J Food Technol*, v.14, n.1, p.1-9, 2011.
- Lee KY, Weintraub, ST, Yu, BP.** Isolation and identification of a phenolic antioxidant from Aloe Vera barbadensis. *Free Radical Bio Med*, v.28, p.261-265, 2000.
- Lima DS, Cardoso JFS.** Criopreservação do Sêmen de ovinos em diluente Tris suplementado com de extrato de buriti (*Mauritia flexuosa*) ou Aloe vera. In: XXII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Piauí, 2013, Teresina. *XXII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Piauí*, 2013.
- Martins CF, Rumpf R, Pereira DC, Dode MN.** Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim Reprod Sci*, v.101, p.326–331, 2007.
- Melo CCS.** Criopreservação do sêmen caprino a 4°C utilizando ACP-101 com duas concentrações de Aloe vera ou gema de ovo. 2010. 73 f. *Mestrado em Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (Dissertação)*, Universidade Estadual do Ceará – UFC, Fortaleza-CE, 2010.
- Melo MIV, Henry M, Beker ARCL.** Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v.57, n.6, p.757-763, 2005.
- Melo-Maciél MAP, Leite LV, Leite JS, Oliveira MS, Almeida PS, Nunes JF, Salmito-Vanderley, CSB.** Aloe vera na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arq Bras Med Vet Zoot*, v.67, p.945-949, 2015.
- Miller GL.** Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, v.31, p.426-429, 1959.
- Møller P, Loft A.** Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radical Bio Med*, v.41, p. 388–415, 2006.
- Monreal ACD, Lima NN, Souza AS, Souza MIL, Caramalac SM, Caramalac SM, Urt MAG.** Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida. *Agrarian (Dourados. Online)*, v.7, p.124-131, 2013.
- Muradás PR, Weiss RR, Kozicki LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT.** Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Arch Vet Sci*, v.11, n.3, p.62-68, 2006.
- Murgas LDS, Zangerônimo MG, Santos AGO, Oliveira SL.** Oxitocina no sêmen suíno heterospermico resfriado à 15 °C. *Cienc Anim Bras*, v.3, n.2, p.33-40, 2002.
- Ni Y, Yates KM, Tizard IR.** *Aloe polysaccharides*. In: Reynolds, t. *Aloes: the genus aloe*. Ed. 3. CRC Press, Cap.4, p.75-87, 2004.
- Obeng MK, Motykie GD, Dastgir A, Mccauley RL, Heggers JP.** *Healing powers of aloes*. In: Reynolds, t. *Aloes: the genus aloe*. Ed.3. CRC Press, Cap.11, p.264-277, 2004
- Owen DH, Katz DF.** A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl*, v.26, p.459-469, 2005.
- Savi PAP, Motheo TF, Padilha-Nakagi LC, Pires-Buttler EA, Vicente WRR.** Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. *Invest*, v.44, n.1, p.18-22, 2015.
- Silva AEDF, Dias AL, Unanian MM, Freitas AR, Bloch Junior C.** Conteúdo de peptídeos e avaliações morfológicas dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Rev Bras Zootec*, v.32, p.1890-1900, 2004.
- Tuncer PB, Sariözkan S, Bucak MN, Ulutas PA, Akalin PP, Büyükleblebici S, Canturk F.** Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*, v.75, p.1459–1465, 2011.
- Van Wagendonk-De Leeuw AM, Haring RM, Kaallansbergen LMTE, Den Daas JHG.** Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*, v.54, p.57-67, 2000.
- Yaron A.** Characterization of Aloe vera gel before and after auto degradation, and stabilization of the natural fresh gel. *Phytother Res*, v.7, S.11-S13, 1993.
-