



## Uso da polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* como suplemento ao diluente de congelação do sêmen caprino

*Use of dehydrated pulp of Mauritia flexuosa fruit as supplement to freezing extender of goat semen*

Kenney de Paiva Porfírio<sup>1</sup>, Homero Batista da Rocha<sup>1</sup>, Marcimar Silva Souza<sup>2</sup>, Pedro Henrique Fonseca da Silva<sup>1</sup>, Wallisson Bruno de Moraes Pacheco<sup>1</sup>, Misael das Virgens Santana<sup>1</sup>, Letícia Soares de Araújo Teixeira<sup>1</sup>, Nayla Maria da Silva Rezende Amorim<sup>1</sup>, Clarissa de Castro e Braga<sup>1</sup>, Laercio Fontinele Bandeira de Macêdo<sup>1</sup>, Leonardo Lopes Furtado<sup>1</sup>, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro<sup>2</sup>, José Ferreira Nunes<sup>2</sup>, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>1</sup>, José Adalmir Torres Souza<sup>1</sup>, Rômulo José Vieira<sup>1</sup>, Janaína de Fátima Saraiva Cardoso<sup>1</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>1</sup>

Universidade Federal do Piauí<sup>1</sup>, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, PI, Brasil.  
Universidade Estadual do Ceará<sup>2</sup>, Fortaleza, Ceará, Brasil.

### Resumo

Objetivou-se avaliar a qualidade *in vitro* do sêmen caprino descongelado utilizando diluente suplementado com a polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa*. O experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira, foram utilizados 15 pools, fracionados em 13 tratamentos com diferentes concentrações do extrato bruto. Os melhores resultados de viabilidade espermática obtidos na primeira etapa foram utilizadas na segunda etapa (criopreservação). Para isto, foram formados dois grupos utilizando 15 pools, sendo um diluente constituído (TRIS + 7% glicerol + melhores concentrações do extrato bruto) e outro pelo diluente (TRIS + 2,5% gema de ovo + 7% glicerol + melhores concentrações do extrato bruto). Na primeira etapa os grupos contendo baixa quantidade do extrato não diferiram do grupo controle ( $P \leq 0,05$ ). Todavia na segunda etapa, após descongelação, os grupos TRIS contendo 2,5% ou 0% de gema de ovo apresentaram diferença significativa, onde o grupo TB06GLGE foi superior ao grupo controle. Portanto, a polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa*, nas concentrações de 0,25% a 1%, não atuou de forma benéfica sobre parâmetros espermáticos do sêmen caprino após a criopreservação/descongelação.

**Palavras-chaves:** Antioxidante, Criopreservação seminal, Buriti

### Abstract

The objective was to evaluate the *in vitro* quality of the thawed goat semen using diluent supplemented with the dehydrated pulp of the *Mauritia flexuosa* fruit. The experiment was divided into two stages. In the first, 15 fractionated pools were used in 13 treatments with different concentrations of the crude extract. The best results of sperm viability obtained in the first experimental stage were used in the second experimental stage (cryopreservation). Afterwards, two groups were formed using 15 pools, one constituent (TRIS + 7% glycerol + best concentrations of the crude extract) and another by the diluent (TRIS + 2.5% egg yolk + 7% glycerol + best concentrations of the crude extract). In the first stage, the groups containing low amount of extract did not differ from the control group ( $P \leq 0.05$ ). However, in the second stage, after thawing, TRIS groups containing 2.5% or 0% egg yolk presented a significant difference, where the TB06GLGE group was superior to the control group. Therefore, the dehydrated fruit pulp of *Mauritia flexuosa* at concentrations of 0.25% to 1% did not benefit goat semen parameters after cryopreservation/thawing.

**Key words:** Antioxidant, Seminal cryopreservation, Buriti.

### Introdução

O ejaculado dos animais domésticos comumente apresenta uma concentração espermática maior que o necessário para a fecundação. Desse modo, a diluição seminal pode auxiliar no aproveitamento de um ejaculado para um maior número de fêmeas (Bicudo et al., 2003). Esse processo, associado a biotécnica reprodutiva de criopreservação espermática, possibilita o armazenamento dos espermatozoides por longos períodos (Silva e Guerra, 2011), diminui riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores e possibilita acelerada difusão de material genético entre locais distantes (Castelo et al., 2008).

<sup>1</sup>Correspondência: neyromulo@ufpi.edu.br

Recebido: 15 de julho de 2019

Aceito: 25 de outubro de 2019



A diluição do sêmen caprino utilizando diluente de origem animal pode induzir alterações nos espermatozoides, além de ser fonte para a multiplicação microbiana (Câmara et al., 2018). Sendo assim, torna-se necessário a utilização de diluentes alternativos que possam substituir os componentes de origem animal. A polpa do fruto de *Mauritia flexuosa*, composta por carotenoides, polifenóis e ácido ascórbico, pode ser utilizada na prevenção de inúmeras alterações oriundas do estresse oxidativo. Possui também elevadas quantidades de aminoácidos sulfurados e triptofano, precursor de niacina, além de fibras e diversos minerais (Manhães, 2007).

Vários estudos estão sendo realizados utilizando diluentes adicionados de compostos de origem vegetal, apresentando resultados satisfatórios na conservação espermática de caprinos utilizando a lecitina de soja (Salmani et al., 2014) e em ovinos utilizando a água de coco em pó (ACP-102c<sup>®</sup>) (Cavalcante et al., 2014).

Neste sentido, objetivou-se avaliar a qualidade *in vitro* do sêmen caprino descongelado, suplementado com a polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa*.

## Material e Métodos

O presente trabalho foi conduzido de acordo com os padrões éticos e aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais, da Universidade Federal do Piauí, sob protocolo n° 484/18. O experimento foi realizado em dois locais, sendo a primeira etapa no setor de Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Petrônio Portela, Teresina, Piauí, Brasil, situado às coordenadas geográficas 5° 03' 23,1'' de Latitude Sul e 42° 47' 27,9'' de Longitude Oeste, com altitude média de 72,7 metros com precipitação média anual em torno de 1.349 mm. A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), Fortaleza, Ceará, Brasil, situado às coordenadas geográficas 3°47'17,7" de Latitude Sul e 38°33'11,2" de Longitude Oeste.

Para realização da pesquisa, utilizou-se três machos caprinos com idade média de 6 anos, clinicamente saudáveis. Os animais foram alimentados diariamente com capim elefante (*Penisetum purpureum*), concentrado (Ração Nativa<sup>®</sup>, 300g/animal/dia), água e sal mineral específico para caprinos *ad libitum*, em sistema confinado.

A polpa do buriti foi comprada de um fornecedor de um mercado em Teresina-PI, sendo os frutos provenientes do estado do Piauí. Para preparação do diluente, a polpa foi triturada com o auxílio de um processador de alimentos e peneirada para a obtenção do extrato bruto, este teve sua composição centesimal determinada de acordo com Freire et al. (2017). Foram coletados 30 ejaculados de cada reprodutor três vezes por semana (totalizando 90 ejaculados), utilizando vagina artificial específica para pequenos ruminantes, durante o segundo semestre de 2018.

Na primeira etapa utilizaram-se 15 *pools* de sêmen que foram divididos em treze alíquotas e diluídos em meio diluente TRIS (Souza et al., 2019). Foram definidos os seguintes tratamentos experimentais: Um grupo controle (TRIS-GEMA) e 12 grupos com diferentes porcentagens de extrato de buriti, 0,25% (TB025); 0,5% (TB05); 0,6% (TB06); 0,7% (TB07); 0,8% (TB08); 0,9% (TB09); 1% (TB1); 2% (TB2); 3% (TB3); 4% (TB4); 5% (TB5); 10% (TB10). Após a distribuição dos tratamentos, foram avaliados os parâmetros espermáticos sob teste de termorresistência após 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação.

As melhores concentrações de *Mauritia flexuosa* encontradas na primeira etapa foram utilizadas na segunda etapa: TB025; TB05; TB06; TB07; TB08; TB09; TB1. Para isso foram utilizados 15 *pools* de sêmen. Definiu-se os seguintes tratamentos experimentais, de acordo com o apresentado nos Quadros 1 e 2.

**Quadro 1.** Grupo controle e tratamentos à base da polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* adicionado 7% de glicerol

Grupo controle	Tratamentos (TB% + 7% glicerol)
TRIS + 7% glicerol (TRIS-GEMA)	TB025; TB05; TB06; TB07; TB08; TB09; TB1

**Quadro 2.** Grupo controle e tratamentos à base de Tris-gema 2,5% contendo diferentes concentrações da polpa desidratada de *Mauritia flexuosa*

Grupo controle	Tratamentos (TB% + 7% glicerol + gema 2,5%)
TRIS + 7% glicerol + gema 2,5% (TRIS-GEMA)	TB025GLGE; TB05GLGE; TB06GLGE; TB07GLGE; TB08GLGE; TB09GLGE; TB1GLGE



Na segunda etapa, após a diluição nos respectivos diluidores as amostras foram envasadas em palhetas de polietileno de 0,25 mL e submetidas à criopreservação com auxílio do aparelho de congelamento automatizado TK 3000<sup>®</sup> (TK Tecnologia em Congelamento LTDA, Uberaba, Brasil), com curva de resfriamento de 0,25 °C/min, com duração em torno de 1 hora e 20 minutos e tempo de estabilização a 5°C por mais 2 horas. Com curva de congelamento de -20°C/min até alcançar -120°C, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos. Após sete dias as amostras foram descongeladas e avaliadas.

A motilidade espermática foi avaliada em Sistema de Análise de Sêmen Auxiliado por Computador (CASA), com uso do programa *Sperm Class Analyzer*<sup>®</sup> (2013) SCA<sup>®</sup> (Microptic S. L., Barcelona, Espanha). Foram utilizadas as seguintes variáveis do programa: 25 quadros/s, sendo 25 quadros/campo; velocidade limite para espermatozoides lentos de 30µm/s; limite para velocidade média de 60 µm/s; retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos de 80%. Para a avaliação, diluiu-se o sêmen descongelado no diluente (TRIS) a 37 °C, até a concentração de 40 x 10<sup>6</sup> spz/ml. Uma alíquota de 10 µL desta diluição foi colocada em câmara de Makler (Sefi Medical Instruments Ltda., Haifa, Israel), pré-aquecida, para a avaliação dos seguintes parâmetros: percentual de espermatozoides móveis, velocidade curvilínea (VCL - µm/s), velocidade linear (VSL - µm/s), velocidade média do percurso (VAP - µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH - µm/s), frequência de batimento cruzado (BCF - Hz) e índice de oscilação (WOB - %).

A integridade da membrana plasmática foi avaliada com o uso de sondas fluorescentes, conforme descrito por Harrison e Vickers (1990). Após a descongelamento (37° C por 30 segundos), alíquotas de 50 µL de sêmen descongeladas foram acondicionadas em microtubos e diluídas em 150 µL de TRIS contendo 5 µL de Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) (0,5 mg/mL em PBS), seguindo-se de incubação por 10 minutos a 37°C. No total, 200 espermatozoides de cada amostra foram avaliados com auxílio de microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão). As células que apresentaram fluorescência verde foram consideradas íntegras e vermelha danificadas.

A atividade mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie; Welch, 2005). Alíquotas de 50µL de sêmen pós-descongelamento foram diluídas em 150µL de TRIS contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão). As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, e coradas em verde com baixo potencial de membrana. Foram obtidas as médias e desvio-padrão e procedida à análise de variância (ANOVA). Para a comparação das médias foi realizado o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%. Foi utilizado o Software SAS<sup>®</sup> (Statistical Analysis System) para Windows versão 9.0.

## Resultados

Os grupos TB025, TB05, TB06, TB07, TB08, TB09, TB1 apresentaram resultados semelhantes ao controle em todos os tempos de avaliação na primeira parte do experimento (Tab. 1). Os parâmetros de cinética espermática pós-descongelamento estão sumarizados na Tab.2.

Para os parâmetros de motilidade (MT) e motilidade progressiva (MP) verificou-se diferença significativa entre o grupo contendo TRIS + 2,5% gema de ovo e os demais grupos testados contendo diferentes concentrações do extrato bruto isento ou não de gema de ovo. Para a velocidade curvilínea (VCL) verificou-se que o grupo TB06GLGE apresentou resultados superiores e diferiu significativamente dos grupos TRIS + 2,5% gema de ovo, TB025, TB05, TB06, TB07GLGE e TB07.

Para o parâmetro velocidade linear (VSL) os grupos TB025GLGE, TB06 apresentaram-se superiores quando comparado aos grupos TB025, TB05, TB06GLGE, TB07, TB09, TB1. O grupo TB06GLGE apresentou maior velocidade média de percurso (VAP) quando comparado aos grupos TB025, TB05, TB06, TB07, TB09, TB1.



**Tabela 1.** Motilidade (%) e vigor (0-5) do *pool* do sêmen caprino submetido ao teste de termorresistência (TTR) lento, pós diluição em TRIS contendo ou não diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia flexuosa*.

Tratamentos	TTR (minutos)											
	05 min.		10 min.		15 min.		30 min.		60 min.		120 min.	
	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.	Mot.	Vig.
TRIS	78,7 ± 9,1 <sup>Aa</sup>	4,5 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	73,7 ± 9,9 <sup>Aa</sup>	3,5 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	61,7 ± 11,7 <sup>Aa</sup>	3,5 ± 0,9 <sup>Aa</sup>	52,3 ± 8,6 <sup>Ab</sup>	3,2 ± 0,86 <sup>Ab</sup>	49,0 ± 18,6 <sup>Ab</sup>	2,6 ± 1,0 <sup>Ab</sup>	29,7 ± 16,0 <sup>Ab</sup>	2,0 ± 1,0 <sup>Ab</sup>
TB025	76,3 ± 9,1 <sup>Aa</sup>	4,1 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	70,7 ± 6,8 <sup>Aa</sup>	3,9 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	67,0 ± 9,6 <sup>Aa</sup>	3,6 ± 0,6 <sup>Aa</sup>	58,3 ± 7,9 <sup>Ab</sup>	3,3 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	46,7 ± 9,4 <sup>Ab</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>Ab</sup>	29,0 ± 7,60 <sup>Ac</sup>	2,0 ± 0,5 <sup>Ab</sup>
TB05	75,0 ± 13,2 <sup>A</sup>	4,1 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	72,3 ± 11,6 <sup>Aa</sup>	3,7 ± 0,6 <sup>Aa</sup>	70,0 ± 12,5 <sup>Aa</sup>	3,7 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	58,3 ± 11,9 <sup>Aa</sup>	3,2 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	50,0 ± 13,1 <sup>Aa</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>Ab</sup>	40,3 ± 16,08 <sup>Ab</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>Ab</sup>
TB6	77,3 ± 10,7 <sup>A</sup>	4,0 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	74,7 ± 6,9 <sup>Aa</sup>	3,9 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	69,3 ± 9,6 <sup>Aa</sup>	3,4 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	61,0 ± 11,9 <sup>Aa</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>Ab</sup>	48,7 ± 4,3 <sup>Ab</sup>	2,3 ± 0,4 <sup>Ab</sup>	31,0 ± 11,52 <sup>Ab</sup>	2,0 ± 0,9 <sup>Ab</sup>
TB7	79,0 ± 10,2 <sup>A</sup>	4,1 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	75,3 ± 8,9 <sup>Aa</sup>	3,6 ± 0,8 <sup>Aab</sup>	68,7 ± 9,1 <sup>Aa</sup>	3,0 ± 1,0 <sup>Aab</sup>	64,3 ± 8,6 <sup>Aa</sup>	3,1 ± 0,6 <sup>Aab</sup>	54,3 ± 11,0 <sup>Aa</sup>	2,5 ± 0,8 <sup>Ab</sup>	39,0 ± 10,72 <sup>Ab</sup>	2,3 ± 0,8 <sup>Ab</sup>
TB8	84,0 ± 7,6 <sup>A</sup>	4,1 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	80,0 ± 8,2 <sup>Aa</sup>	3,9 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	73,0 ± 6,8 <sup>Aa</sup>	3,7 ± 0,6 <sup>Aa</sup>	67,3 ± 8,2 <sup>Aa</sup>	3,2 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	49,3 ± 7,0 <sup>Ab</sup>	2,3 ± 0,5 <sup>Ab</sup>	28,7 ± 14,32 <sup>Ac</sup>	1,8 ± 0,4 <sup>Bb</sup>
TB9	77,0 ± 11,1 <sup>Aa</sup>	4,1 ± 0,8 <sup>Az</sup>	75,7 ± 8,2 <sup>Aa</sup>	4,1 ± 0,9 <sup>Az</sup>	67,0 ± 11,1 <sup>Aa</sup>	3,6 ± 0,7 <sup>Az</sup>	60,0 ± 14,6 <sup>Aa</sup>	3,4 ± 0,6 <sup>Az</sup>	42,0 ± 20,9 <sup>Ab</sup>	2,9 ± 0,8 <sup>Ab</sup>	27,3 ± 17,59 <sup>Ab</sup>	1,9 ± 0,9 <sup>Bb</sup>
TB1	82,7 ± 7,8 <sup>Aa</sup>	4,3 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	78,0 ± 5,6 <sup>Aa</sup>	4,1 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	71,3 ± 9,3 <sup>Aa</sup>	3,8 ± 0,9 <sup>Aa</sup>	59,3 ± 13,2 <sup>Ab</sup>	3,6 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	50,0 ± 15,5 <sup>Ab</sup>	2,7 ± 0,7 <sup>Ab</sup>	30,3 ± 9,53 <sup>Ab</sup>	1,9 ± 0,7 <sup>Bb</sup>
TB2	62,0 ± 11,1 <sup>Ba</sup>	3,4 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	65,3 ± 8,5 <sup>Aa</sup>	3,3 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	54,0 ± 12,8 <sup>Aa</sup>	3,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>	36,3 ± 7,9 <sup>Bb</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>Ab</sup>	28,7 ± 13,1 <sup>Bb</sup>	2,1 ± 0,7 <sup>Ab</sup>	9,7 ± 4,0 <sup>Bc</sup>	1,3 ± 0,5 <sup>Bb</sup>
TB3	55,7 ± 11,1 <sup>Ba</sup>	3,2 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	40,0 ± 9,8 <sup>Ba</sup>	2,7 ± 0,5 <sup>Ba</sup>	31,0 ± 12,4 <sup>Ba</sup>	2,33 ± 0,7 <sup>Bba</sup>	19,7 ± 8,7 <sup>Bb</sup>	1,7 ± 0,6 <sup>Bb</sup>	11,3 ± 7,7 <sup>Bbc</sup>	1,3 ± 0,8 <sup>Bb</sup>	5,0 ± 4,6 <sup>Bc</sup>	0,5 ± 0,5 <sup>Cc</sup>
TB4	40,7 ± 15,2 <sup>Ba</sup>	1,9 ± 0,8 <sup>Ba</sup>	26,1 ± 15,1 <sup>Ba</sup>	1,7 ± 0,7 <sup>Ba</sup>	16,7 ± 16,0 <sup>Ba</sup>	1,20 ± 0,9 <sup>Ba</sup>	9,2 ± 9,4 <sup>Bb</sup>	1,0 ± 0,6 <sup>Ba</sup>	2,2 ± 2,0 <sup>Cc</sup>	0,7 ± 0,5 <sup>Cb</sup>	00,0 ± 00,0 <sup>Cc</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Cc</sup>
TB5	44,0 ± 11,0 <sup>Ba</sup>	1,9 ± 0,8 <sup>Ba</sup>	29,3 ± 14,9 <sup>Ba</sup>	1,7 ± 0,7 <sup>Ba</sup>	17,0 ± 10,7 <sup>Bab</sup>	1,20 ± 0,9 <sup>Ba</sup>	5,0 ± 4,4 <sup>Cb</sup>	1,0 ± 0,6 <sup>Ba</sup>	00,0 ± 00,0 <sup>Cc</sup>	0,6 ± 0,5 <sup>Cb</sup>	00,0 ± 00,0 <sup>Cc</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Cc</sup>
TB10	00,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	00,0 ± 00,0 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	00,0 ± 00,0 <sup>C</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	00,0 ± 00,0 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>	00,0 ± 00,0 <sup>Ca</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>Ca</sup>

\*\*Mot.: Motilidade; Vig.: Vigor. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e minúscula na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).



**Tabela 2.** Média ( $\pm$  d. p.) dos parâmetros de cinética espermática do sêmen caprino criopreservado em meio TRIS + gema de ovo 2,5% e TRIS com diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia Flexuosa* avaliados acrescido ou não de glicerol 7,5% e gema de ovo 2,5%.

Parâmetros										
Tratamentos	MT (%)	MP (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	BCF (Hz)	WOB (%)
TRIS – GEMA	1,4 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	48,1 $\pm$ 29,6 <sup>bc</sup>	23,6 $\pm$ 20,2 <sup>abc</sup>	29,5 $\pm$ 18,8 <sup>bcde</sup>	42,3 $\pm$ 12,9 <sup>abc</sup>	70,2 $\pm$ 19,3 <sup>ab</sup>	1,1 $\pm$ 1,4 <sup>bc</sup>	3,3 $\pm$ 5,4 <sup>ab</sup>	57,3 $\pm$ 12,0 <sup>abc</sup>
TB025GLGE	5,2 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	52,2 $\pm$ 40,3 <sup>abc</sup>	25,5 $\pm$ 18,3 <sup>a</sup>	34,2 $\pm$ 24,5 <sup>abcde</sup>	58,5 $\pm$ 19,0 <sup>c</sup>	78,1 $\pm$ 12,2 <sup>ab</sup>	1,5 $\pm$ 1,4 <sup>abc</sup>	3,8 $\pm$ 4,9 <sup>ab</sup>	73,9 $\pm$ 17,4 <sup>ab</sup>
TB025	4,0 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	45,7 $\pm$ 20,3 <sup>bc</sup>	19,8 $\pm$ 17,5 <sup>c</sup>	26,9 $\pm$ 17,0 <sup>cde</sup>	37,5 $\pm$ 21,2 <sup>abc</sup>	63,1 $\pm$ 22,1 <sup>ab</sup>	1,5 $\pm$ 1,3 <sup>abc</sup>	5,1 $\pm$ 5,7 <sup>ab</sup>	56,8 $\pm$ 13,5 <sup>abc</sup>
TB05GLGE	8,6 $\pm$ 8,0 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	59,6 $\pm$ 18,5 <sup>abc</sup>	32,0 $\pm$ 16,8 <sup>abc</sup>	40,3 $\pm$ 15,5 <sup>abcde</sup>	50,3 $\pm$ 17,3 <sup>abc</sup>	74,3 $\pm$ 16,5 <sup>ab</sup>	2,5 $\pm$ 1,3 <sup>ab</sup>	7,4 $\pm$ 3,9 <sup>ab</sup>	66,2 $\pm$ 9,9 <sup>abc</sup>
TB05	2,0 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	42,7 $\pm$ 15,1 <sup>bc</sup>	19,4 $\pm$ 5,9 <sup>c</sup>	25,7 $\pm$ 9,1 <sup>de</sup>	45,8 $\pm$ 8,3 <sup>abc</sup>	75,0 $\pm$ 9,4 <sup>ab</sup>	1,1 $\pm$ 1,0 <sup>bc</sup>	4,9 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	59,7 $\pm$ 5,2 <sup>ab</sup>
TB06GLGE	6,4 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	78,6 $\pm$ 14,4 <sup>a</sup>	43,4 $\pm$ 12,6 <sup>c</sup>	53,8 $\pm$ 12,8 <sup>a</sup>	55,0 $\pm$ 13,8 <sup>abc</sup>	79,7 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	68,2 $\pm$ 11,5 <sup>abc</sup>
TB06	1,4 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	24,9 $\pm$ 22,8 <sup>c</sup>	13,4 $\pm$ 12,7 <sup>a</sup>	16,4 $\pm$ 14,8 <sup>c</sup>	36,2 $\pm$ 29,1 <sup>abc</sup>	53,7 $\pm$ 42,4 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	0,5 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	46,8 $\pm$ 37,1 <sup>c</sup>
TB07GLGE	5,1 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	49,0 $\pm$ 22,7 <sup>bc</sup>	28,0 $\pm$ 12,6 <sup>abc</sup>	34,9 $\pm$ 15,4 <sup>abcde</sup>	64,4 $\pm$ 21,8 <sup>a</sup>	82,5 $\pm$ 10,6 <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>	6,8 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	76,4 $\pm$ 16,2 <sup>a</sup>
TB07	3,3 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	37,4 $\pm$ 25,5 <sup>bc</sup>	15,8 $\pm$ 15,0 <sup>c</sup>	23,2 $\pm$ 16,6 <sup>cde</sup>	31,6 $\pm$ 20,5 <sup>c</sup>	50,3 $\pm$ 30,3 <sup>ab</sup>	1,3 $\pm$ 1,7 <sup>abc</sup>	4,2 $\pm$ 5,6 <sup>ab</sup>	53,7 $\pm$ 27,3 <sup>bc</sup>
TB08GLGE	9,0 $\pm$ 10,5 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	68,7 $\pm$ 17,2 <sup>abc</sup>	39,5 $\pm$ 18,4 <sup>abc</sup>	48,0 $\pm$ 17,0 <sup>abc</sup>	54,1 $\pm$ 18,1 <sup>abc</sup>	77,7 $\pm$ 16,4 <sup>ab</sup>	2,1 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>	6,0 $\pm$ 3,7 <sup>ab</sup>	66,2 $\pm$ 10,4 <sup>abc</sup>
TB08	4,9 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	3,9 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	62,2 $\pm$ 11,4 <sup>abc</sup>	30,7 $\pm$ 13,0 <sup>abc</sup>	38,6 $\pm$ 9,4 <sup>abcde</sup>	48,9 $\pm$ 17,4 <sup>abc</sup>	76,2 $\pm$ 19,0 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 2,2 <sup>ab</sup>	8,0 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	59,7 $\pm$ 11,1 <sup>abc</sup>
TB09GLGE	4,4 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	67,5 $\pm$ 18,1 <sup>abc</sup>	42,1 $\pm$ 16,5 <sup>ab</sup>	50,3 $\pm$ 16,9 <sup>ab</sup>	60,0 $\pm$ 10,7 <sup>ab</sup>	81,6 $\pm$ 7,3 <sup>ab</sup>	2,6 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	8,7 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	72,4 $\pm$ 7,3 <sup>abc</sup>
TB09	4,3 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	93,0 $\pm$ 87,0 <sup>abc</sup>	22,4 $\pm$ 13,0 <sup>bc</sup>	31,0 $\pm$ 14,3 <sup>bcde</sup>	40,4 $\pm$ 12,4 <sup>bc</sup>	68,9 $\pm$ 10,6 <sup>ab</sup>	1,8 $\pm$ 1,3 <sup>ab</sup>	6,2 $\pm$ 4,5 <sup>ab</sup>	57,7 $\pm$ 9,0 <sup>abc</sup>
TB1GLGE	5,7 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	67,6 $\pm$ 20,1 <sup>ab</sup>	37,7 $\pm$ 15,9 <sup>abc</sup>	47,2 $\pm$ 17,9 <sup>abcde</sup>	54,6 $\pm$ 11,1 <sup>abc</sup>	79,1 $\pm$ 6,4 <sup>ab</sup>	2,6 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>	8,0 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	68,5 $\pm$ 10,2 <sup>abc</sup>
TB1	4,7 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	51,0 $\pm$ 6,5 <sup>abc</sup>	20,5 $\pm$ 6,1 <sup>c</sup>	28,1 $\pm$ 5,6 <sup>de</sup>	39,3 $\pm$ 7,9 <sup>bc</sup>	71,4 $\pm$ 9,3 <sup>ab</sup>	1,4 $\pm$ 1,0 <sup>abc</sup>	6,1 $\pm$ 4,4 <sup>ab</sup>	54,8 $\pm$ 6,5 <sup>abc</sup>

<sup>a, b, c, d, e</sup> Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna significa que houve diferença estatística entre os diluentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

MT = motilidade, MP = motilidade progressiva, VCL = velocidade curvilinear, VSL = velocidade linear, VAP = velocidade média do percurso, LIN = Linearidade, STR = Retilinearidade, ALH = Deslocamento lateral de cabeça, BCF = Frequência de batimento cruzado, WOB = Índice de oscilação.



A linearidade (LIN) foi significativamente superior para o grupo TB07GLGE quando comparado aos grupos TB025GLGE, TB07, TB09, TB1. Para o parâmetro retilinearidade (STR) verificou-se que os grupos TB06GLGE, TB06 e TB08 apresentaram maior percentual quando comparado ao grupo TB07GLGE.

O deslocamento lateral de cabeça (ALH) foi superior no grupo TB06GLGE, comparado aos grupos TRIS contendo 2,5% gema, TB05 e TB06. Para o parâmetro de frequência de batimento cruzado (BCF) verificou-se que os grupos TB05, TB06GLGE, TB07GLGE, TB08, TB09GLGE e TB1GLGE diferiram do grupo TB06 com resultados superiores. O índice de oscilação (WOB) foi significativamente superior para o grupo TB025GLGE quando comparado ao grupo TB06

Os dados referentes às análises da viabilidade espermática utilizando sondas fluorescentes estão dispostos na Tab. 3, onde os grupos tratamentos não diferiram do grupo controle para as avaliações de integridade de membrana e potencial mitocondrial. O grupo controle apresentou maior percentual de espermatozoides com membrana íntegra quando comparado aos grupos testados. Em contrapartida, os resultados para atividade mitocondrial revelaram que os grupos TB025GLGE, TB025, TB05GLGE, TB05, TB06, TB08GLGE, TB08, TB09GLGE, TB09, TB1 não demonstram diferença significativa em comparação ao grupo controle.

**Tabela 3.** Média ( $\pm$  d. p.) dos percentuais de integridade de membrana plasmática (MP) e potencial de membrana mitocondrial (MM), pós-descongelamento de espermatozoides caprinos no grupo controle e em meio TRIS com diferentes concentrações do extrato bruto da polpa do fruto de *Mauritia Flexuosa* acrescidos ou não de 2,5% gema de ovo e 7% de glicerol

Tratamentos	Parâmetros	
	Integridade de MP*	Potencial MM**
TRISGLGE	34,26 $\pm$ 10,40 <sup>a</sup>	21,60 $\pm$ 7,89 <sup>a</sup>
TB025GLGE	16,80 $\pm$ 8,12 <sup>b</sup>	20,26 $\pm$ 6,09 <sup>a</sup>
TB025	17,80 $\pm$ 5,43 <sup>b</sup>	14,80 $\pm$ 10,63 <sup>a</sup>
TB05GLGE	21,80 $\pm$ 13,17 <sup>b</sup>	15,86 $\pm$ 6,56 <sup>a</sup>
TB05	21,53 $\pm$ 7,47 <sup>b</sup>	16,53 $\pm$ 9,52 <sup>a</sup>
TB06GLGE	16,00 $\pm$ 5,07 <sup>b</sup>	12,53 $\pm$ 2,57 <sup>b</sup>
TB06	17,56 $\pm$ 6,89 <sup>b</sup>	14,00 $\pm$ 7,62 <sup>ab</sup>
TB07GLGE	13,50 $\pm$ 8,12 <sup>b</sup>	13,46 $\pm$ 2,82 <sup>b</sup>
TB07	14,13 $\pm$ 6,33 <sup>b</sup>	11,26 $\pm$ 4,66 <sup>b</sup>
TB08GLGE	16,06 $\pm$ 6,79 <sup>b</sup>	14,66 $\pm$ 6,25 <sup>ab</sup>
TB08	17,01 $\pm$ 8,86 <sup>b</sup>	16,33 $\pm$ 12,21 <sup>a</sup>
TB09GLGE	20,00 $\pm$ 6,04 <sup>b</sup>	16,26 $\pm$ 9,60 <sup>a</sup>
TB09	19,50 $\pm$ 5,32 <sup>b</sup>	15,86 $\pm$ 10,76 <sup>a</sup>
TB1GLGE	18,50 $\pm$ 5,96 <sup>b</sup>	19,33 $\pm$ 7,06 <sup>a</sup>
TB1	17,60 $\pm$ 4,30 <sup>b</sup>	14,60 $\pm$ 6,42 <sup>ab</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

\*Membrana plasmática/\*\*Membrana mitocondrial.

## Discussão

Observou-se nessa pesquisa a viabilidade espermática do *pool* do sêmen caprino utilizando diluente a base da polpa do fruto *Mauritia flexuosa* em baixas concentrações através das duas etapas de avaliação dos parâmetros espermáticos em relação aos grupos controles a base de TRIS (Etapa 1) e TRIS contendo 2,5% gema de ovo (Etapa 2).

Ao final do TTR (Etapa 1) observou-se o diluente e o tempo de análise, onde a motilidade aos cinco minutos de incubação apresentou a média de 64% e aos 120 minutos com média de 20%. O vigor aos cinco minutos de incubação apresentou a média 3 e aos 120 minutos apresentou 1,3. Isso pode ser devido à baixa absorção de açúcares, lipídeos, minerais e proteínas pelos espermatozoides ou mesmo pela baixa disponibilidade destes no diluente.

O sistema CASA contribuiu significativamente na determinação da qualidade do ejaculado, pelas repetidas análises de várias características da motilidade dos espermatozoides (Oliveira et al., 2013). A velocidade curvilínea (VCL) em todos os grupos não ultrapassou os 100  $\mu$ m/s, apesar de haver diferença significativa, sendo esse parâmetro indesejável (Mortimer e Maxwell, 2004). Em casos onde



esses valores ultrapassam os 250  $\mu\text{m/s}$  pode-se inferir que houve hiperativação dos espermatozoides, deste modo, a capacitação antecipada diminui as chances de fecundação (Verstegen et al., 2002).

Os valores encontrados para a velocidade linear (VSL) em todos os grupos testados estão abaixo do que condiz com a hiperativação das células espermáticas que é  $\leq 100 \mu\text{m/s}$  (Mortimer e Maxwell, 2004). Para a velocidade média de percurso (VAP), verificou-se pelos resultados apresentados que a ausência de gema de ovo pode ter afetado de forma negativa a viabilidade dos espermatozoides após a criopreservação. Os valores encontrados neste trabalho não ultrapassaram 50,80  $\mu\text{m/s}$  diferindo das médias encontradas por Maia (2011) utilizando diluente aditivado de Lauril sulfato de sódio, Trolox, catalase e a incorporação de colesterol, demosterol, ácido oleico-linoleico e  $\alpha$ -lactoalbumina onde verificaram a VAP 93,9  $\mu\text{m/s}$  e 93,0  $\mu\text{m/s}$ .

Os resultados obtidos para o parâmetro retilinearidade (STR) em todos os grupos estão relativamente baixos que podem ter sido influenciados pela pouca integridade de membrana. Segundo Leite (2010), altos valores de STR demonstram que o trajeto realizado pela célula espermática é mais uniforme e com menor amplitude.

Casos onde há aumento do deslocamento lateral de cabeça (ALH) relacionado à diminuição do VSL e STR podem estar associados com a capacitação do espermatozoide, e também com modificação em nível de membrana, intracelular, metabólicas ou anormalidades mitocondriais (Vidament et al., 2012).

Segundo Mortimer (1997), a WOB, em casos onde o ALH é elevado pode apresentar-se baixa em percursos em que a célula espermática percorre uma área ampla em seu trajeto, porém alta em percursos circulares ou retilíneos visto que a VAP e a VCL apresentam-se de forma semelhante.

Os grupos testados com as menores concentrações de *Mauritia flexuosa* (0,25% a 0,5%), apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle para o parâmetro de potencial de membrana mitocondrial. Esses mesmos grupos diferiram significativamente ao grupo controle para o parâmetro integridade de membrana plasmática, todavia por apresentarem semelhanças no parâmetro anterior, tenderam a ser os melhores avaliados nos grupos testados.

### Conclusões

A polpa desidratada do fruto de *Mauritia flexuosa* nas concentrações de 0,25% à 1% em solução tampão TRIS adicionados a *apool* de sêmen caprino não influenciou positivamente todos os parâmetros espermáticos avaliados após o processo de congelamento/descongelamento. Devido a isso, novos estudos são necessários a fim de validar o uso da polpa do buriti como uma alternativa viável para aplicação a campo em tecnologias reprodutivas como a inseminação artificial.

### Referências

- Bicudo SD, Sousa DB, Takada L.** Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.120-127, 2003.
- Câmara TS, Nunes TGP, Toniolli R.** Diluentes seminais para pequenos ruminantes. *Cienc Anim*, v.28, p.67-83, 2018.
- Castelo TS, Frota TR, Silva AR.** Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*, v.2, p.67-75, 2008.
- Cavalcante JM, Brasil OO, Salgueiro CCM, Salmito-Vanderley CSB, Nunes JF.** Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). *Cienc Anim Bras*, v.3, p.344-353, 2014.
- Freire JAP.** Caracterização nutricional, potencial quimioterápico e toxicidade de *Mauritia flexuosa* (Buriti): Incentivo a biotecnologia sustentável e bioprospecção de frutos regionais. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, UFPI, Teresina – PI, 2017.
- Guthrie HD, Welch GR.** Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, v.63, p.396-410, 2005.
- Harrison RAP, Vickers SE.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.88, p.343-352, 1990.
- Leite TG, Filho VRV, Arruda RP, Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JAM, Andrade VJ.** Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, v.120, p.31-38,



2010.

**Maia MS.** Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Rum Res*, v.95, p144-149, 2011.

**Sandri DO, Xisto ALRP, Rodrigues EC, Morais EC, Barros WM.** Atividade antioxidante e caracterização físico química de polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*) coletado na cidade de Diamantino-MT. *Rev Bras Frutic*, v.39, n.3, p.1-7, 2017.

**Mortimer ST.** A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*, v.3, p.403-439, 1997.

**Mortimer ST, Maxwell WMC.** Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, v.72, p.285-291, 2004.

**Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, Santos, RMS, Beletti ME, Peres RFG, Monteiro FM, Lima VFMH.** Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine tamed-AI program. *Anim Repro Sci*, v.137, p.145-155, 2013.

**Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M.** In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, v.68, p.276-280, 2014.

**Silva SV, Guerra MMP.** Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.370-384, 2011.

**Souza CV, Brandão FZ, Santos JDR, Alfradique, VAP, Santos VMB, Morais, MCC, Rangel PSC, Silva A A, Souza-Fabjan JMG.** Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*, v.89, p.104-108, 2019.

**Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.

**Vidament M, Magistrini M, Le Foll Y, Levillain N, Yvon JM, Duchamp G, Blesbois E.** Temperatures from 4 to 15°C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA 96 extender. *Theriogenology*, v.78, p.297-307, 2012.

---