



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAMILLA FLÁVIA AVELINO DE FARIAS**

**ESTUDO DA EFICÁCIA DA ALOE VERA COMO  
CRIOPROTETOR VEGETAL NA REFRIGERAÇÃO DE  
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE BOVINOS**

**JOÃO PESSOA  
2017**

**CAMILLA FLÁVIA AVELINO DE FARIAS**

**ESTUDO DA EFICÁCIA DA ALOE VERA COMO  
CRIOPROTETOR VEGETAL NA REFRIGERAÇÃO DE  
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE BOVINOS**

Documento apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como um dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sildivane Valcácia Silva

**JOÃO PESSOA  
2017**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

F224e Farias, Camilla Flávia Avelino de.

Estudo da eficácia da *Aloe vera* como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos / Camilla Flávia Avelino de Farias. - João Pessoa, 2017.  
68 f. : il.

Orientação: Sildivane Valcácia Silva. Monografia  
(Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Babosa. 2. Aloe vera. 3. Criopreservação de células espermáticas. 4. Epidídimo de bovinos. I. Silva, Sildivane Valcácia. II. Título.

UFPB/BC




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia



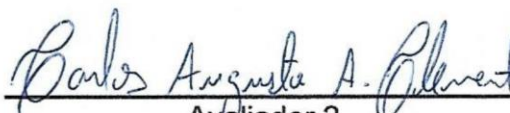
**ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Aos vinte dias do mês de novembro de 2017, às 14:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Sildivane Valcácia Silva e composta pelos avaliadores 1. Prof. Ms. Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva (PPGCAT/UFRPE); 2. Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente (DCA/UFPB), a discente Camilla Flávia Avelino de Farias, matrícula 11225082, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Estudo da eficácia da *Aloe vera* como crioprotetor vegetal na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Sildivane Valcácia Silva, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Avaliador 1

  
\_\_\_\_\_  
Discente

  
\_\_\_\_\_  
Avaliador 2

João Pessoa/PB, 20 de novembro de 2017.

Aos meus pais, irmã e filho pelo  
carinho, compreensão e ajuda.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por tornar isso tudo possível.

A minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup> Sildivane Valcácia Silva, que me acolheu no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal e fez do meu sonho uma possibilidade. Me ensinou a trabalhar da melhor forma possível, sempre com compreensão, carinho e paciência sem fim. Jamais esquecerei seus ensinamentos.

A Banca Examinadora, Robespierre Augusto Joaquim Araujo Silva e Carlos Augusto Alanis Clemente, pela disponibilidade e crescimento ao trabalho em conclusão.

Aos meus pais, Antônio Carlos Alves de Farias e Márcia Suelly Avelino de Farias, pelo dom da vida e por me manterem sempre no bom caminho. Por me ajudarem durante toda minha caminhada acadêmica e por serem um exemplo e inspiração para que eu continuasse.

A minha irmã, Marinna Karla Avelino de Farias, pelo apoio, ajuda e companherismo que vem me dando ao longo desses anos.

A meu filho, Pedro Henrique de Farias Oliveira, por entender que a mamãe tinha que estudar e por sempre renovar minhas energias com o carinho com que me recebia sempre quando eu chegava.

A minha família, em geral, por me motivar e apoiar minhas escolhas, me proporcionando boas energias, principalmente quando eu precisei.

A Alex Souza Rique que ao longo desses anos esteve do meu lado e me deu paciência, conversou comigo e me motivava sempre que precisei. Uma amizade que levarei além da universidade.

A Amanda Freire de Souza pela diversão e brincadeiras durante esse processo, principalmente quando eu estava mais agoniada. Além de se dispor a ajudar no meu trabalho e se preocupar se ia dar certo. Eu não teria conseguido realizar esse trabalho sem você.

Aos demais do curso de biotecnologia, em especial a Andrwey Augusto Galvão Viana, Melina Kehtle Lins de Lima, André Luiz Pereira Tork, Lucemberg Sales Faustino e Napoleão José de Oliveira Neto, que durante essa jornada me proporcionaram momentos de descontração e crescimento.

Para realização deste trabalho, agradeço imensamente:

A minha orientadora, Sildivane Valcácia Silva, por me aceitar e me orientar da melhor forma possível para a conclusão do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal pelo companherismo e por me ajudarem na finalização deste trabalho.

Ao Laboratório de Petróleo, Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), e ao Laboratório de Engenharia em Bioprocessos e Laboratório de Genética Molecular por colaborarem com a realização do trabalho.

A Big Carne que concedeu os testículos utilizados para recuperação dos espermatozoides.

*Don't be a drag, just be a queen  
Whether life's disabilities  
Left you outcast, bullied, or teased  
Rejoice and love yourself today  
'cause baby you were born this way*

*Lady Gaga – Born this way*



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações de *Aloe vera* (AV) para a produção de um diluidor de origem vegetal para a criopreservação de células espermáticas provenientes do epidídimo de bovinos. Amostras obtidas de epidídimos bovinos sem raça definida foram recuperadas e homogeneizadas para formação do *pool*. Sete grupos experimentais foram testados: GC= Grupo Controle; G5= Grupo 5% (5% de AV + 1,488g frutose); G10=Grupo 10% (10% de AV + 1,488g frutose); G20=Grupo 20% (20% de AV + 1,488g frutose); GF5=Grupo 5% (5% de AV + 2,976g frutose); GF10=Grupo 10% (10% de AV + 2,976g frutose); GF20=Grupo 20% (20% de AV + 2,976g frutose). Os extratos bruto e filtrado da AV foram submetidos ao teste de determinação de açúcares redutores. As amostras foram submetidas às avaliações de reologia com extrato de plantas irrigadas e não irrigadas e potencial hidrogeniônico nas temperaturas de refrigeração e a 37 °C; motilidade subjetiva, integridade e funcionalidade da membrana plasmática nos períodos T0, após a formação dos grupos em temperatura ambiente e T2, após atingir a temperatura de 5 °C; e teste de crescimento microbiológico com os diluidores refrigerados por 48h e 72h. Os dados foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com 5% de significância. Para comparações entre os tempos de um mesmo grupo utilizou-se o teste T, e para comparação entre grupos utilizou-se ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para o potencial hidrogeniônico, observou-se pH 6,5 em todos os grupos com o extrato e GC. Houve diferença ( $P < 0,05$ ) na viscosidade entre os grupos com menores concentrações de AV em comparação com os grupos G20 e GF20, nas plantas regadas e não regadas. Houve diferença ( $P < 0,001$ ) na cinética nos grupos com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose em comparação ao GC, com redução nos parâmetros cinéticos. Porém não foi observado diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tempos de avaliação. Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) para parâmetros de integridade e funcionalidade da membrana plasmática entre os grupos experimentais. Para o teste de crescimento microbiológico, observou-se que os grupos G10 e GF5 apresentaram efeito semelhante ao GC; o G20, após 72h de refrigeração, apresentou efeito antimicrobiano. Uma das mais importantes características associadas a capacidade fertilizante do sêmen é a motilidade, pois é essencial para o transporte do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e fertilização. A viscosidade da AV e o alto índice de células espermáticas epididimárias com presença de gotas citoplasmáticas podem prejudicar a movimentação do espermatozoide pelo meio, ocasionando maior gasto de energia. Os antioxidantes presentes na AV protegem os espermatozoides de ROS a baixas temperaturas, mantendo a integridade e funcionalidade da membrana plasmática como observado no GC. Baseado no exposto, conclui-se que a adição do extrato bruto da *Aloe vera* interfere negativamente na motilidade de espermatozoides epididimários de bovino, porém preserva os parâmetros de integridade e funcionalidade da membrana plasmática, assim como apresenta efeito bacteriostático. Estudos devem ser realizados para determinar a viscosidade ideal do extrato e aprimorar a confecção deste diluidor seminal de origem vegetal.

**Palavras-chave:** Babosa, criopreservação, epidídimo.

## ABSTRACT

The aim of this experiment was to test different concentrations of *Aloe vera* (AV) for the production of an aloe-based extender to cryopreservation of bovine sperm cells from epididymis. Samples obtained from epididymis of withoutbred bovine were recovered and homogenized for the formation of a pool. Seven experimental groups were tested: GC = Control Group; G5 = Group 5% (5% AV plus 1.488g fructose); G10 = Group 10% (10% of AV plus 1.488g fructose); G20 = Group 20% (20% of AV plus 1.488g fructose); GF5 = Group 5% (5% AV plus 2,976g fructose); GF10 = Group 10% (10% of AV plus 2,976g fructose); GF20 = Group 20% (20% of AV plus 2,976g fructose). The brute and filtered AV extract was submitted to the test for the reducing sugars determination. The samples were submitted to the hydrogenation and rheology tests at the cooling and 37 °C temperatures; subjective motility, integrity and functionality of the plasmatic membrane at periods T0 (after the groups formation at room temperature), and T2, after reaching 5 °C; and microbiological test to refrigerated diluents during 48h and 72h at 5 °C. The data were evaluated by Kolmogorov-Smirnov test with 5% significance. For comparisons between the times of the same group, T test was used, and ANOVA was used for comparison between groups, followed by Tukey's post-test ( $p \leq 0.05$ ). For the hydrogenation potential, pH 6.5 was observed in all groups with extract and GC. Difference was observed ( $P < 0.05$ ) between groups within lower AV concentrations compared to G20 and GF20 groups, in irrigated and non-irrigated plants. Difference was observed ( $P < 0.001$ ) in the groups with different concentrations of *Aloe vera* and fructose in comparison with the GC, with kinetic parameters reduced. However, no difference ( $P > 0.05$ ) was observed between the evaluation times. No differences were observed ( $P > 0.05$ ) for parameters of plasma membrane integrity and functionality between the groups. For the microbiological test, was observed that the G10 and GF5 groups demonstrated similar effect to GC, on the other hands, G20 after 72h of refrigeration demonstrated antimicrobial effect. The motility is the most important characteristic associated with fertilizing capacity of semen, since it is essential for spermatozoa transport in the female reproductive tract and fertilization. The AV viscosity and the high index of epididymal sperm cells with cytoplasmic droplets can damage sperm movement through the extender, causing a higher energy exhaust. Moreover, antioxidants present in AV may defend ROS attack to spermatozoa at low temperatures, maintaining the integrity and functionality of the plasma membrane as observed in this study. Thus, it is concluded that the addition of crude extract of *Aloe vera* interferes negatively on motility of epididymal bovine spermatozoa, but preserves the integrity and functionality of the plasma membrane and presents bacteriostatic effect. Studies should be carried out to resolves the high viscosity and improve the preparation of this seminal aloe-based extender.

**Keywords:** *Aloe vera*, cryopreservation, epididymis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Sistema reprodutor masculino bovino	19
<b>Figura 2</b>	Divisão do epidídimo bovino	21
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática do epidídimo e regiões da cabeça, corpo e cauda	22
<b>Figura 4</b>	Fases da espermatogênese	23
<b>Figura 5</b>	Estrutura da célula germinativa masculina	24
<b>Figura 6</b>	Representação da estrutura química da D-frutose	28
<b>Figura 7</b>	Metabolismo da frutose para gliceraldeído-3-fosfato para glicólise	29
<b>Figura 8</b>	Planta <i>Aloe barbadensis</i> Miller	31
<b>Figura 9</b>	Estruturas da folha de <i>Aloe vera</i>	31
<b>Figura 10</b>	Etapas da obtenção do extrato bruto da <i>Aloe vera</i>	34
<b>Figura 11</b>	Fitas para mensurar pH	35
<b>Figura 12</b>	Determinação do teor de açúcares redutores presentes nos diluidores espermáticos	35
<b>Figura 13</b>	Espectrofotômetro utilizado para mensuração dos níveis de açúcares de diluidores espermáticos	36
<b>Figura 14</b>	Reômetro Brookfield LVDVIII Ultra	37
<b>Figura 15</b>	Complexo testículo/epidídimo de bovinos previamente abatidos para consumo humano	38
<b>Figura 16</b>	Recuperação dos espermatozoides epididimários por técnica de flutuação	39
<b>Figura 17</b>	Dupla coloração Eosina-Nigrosina para análise de integridade de membrana plasmática espermática	40
<b>Figura 18</b>	Teste de funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários bovinos	41
<b>Figura 19</b>	Anormalidades morfológicas de espermatozoides	41
<b>Figura 20</b>	Caldo de crescimento microbiano	42
<b>Figura 21</b>	Placas contendo meio de crescimento BDA	43
<b>Figura 22</b>	Quantidade de açúcares redutores (glicose e frutose) presentes no extrato da <i>Aloe vera</i> bruto e filtrado	44
<b>Figura 23</b>	Placas de Petri contendo o meio BDA e os diluidores refrigerados por 48h e 72h, colocados em estufa a 37 °C por 24h	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação taxonômica da <i>Aloe barbadenses Miller</i>	30
<b>Tabela 2</b>	Composição do meio BDA	42
<b>Tabela 3</b>	Valores de pH dos diferentes diluidores nas temperaturas 5 °C e 37 °C	44
<b>Tabela 4</b>	Valores da viscosidade do diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato da planta <i>Aloe vera</i> regada e frutose nas temperaturas 10 °C e 37 °C	45
<b>Tabela 5</b>	Valores da viscosidade do diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato da planta <i>Aloe vera</i> sem regar e frutose nas temperaturas 10 °C e 37 °C	46
<b>Tabela 6</b>	Porcentual (média ± desvio padrão) de motilidade total subjetiva de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados com diferentes concentrações de <i>Aloe vera</i> e frutose	46
<b>Tabela 7</b>	Porcentual (média ± desvio padrão) de integridade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados com diferentes concentrações de <i>Aloe vera</i> e frutose	47
<b>Tabela 8</b>	Porcentual (média ± desvio padrão) de funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados com diferentes concentrações de <i>Aloe vera</i> e frutose	47
<b>Tabela 9</b>	Efeito antibiótico de diferentes concentrações de <i>Aloe vera</i> e frutose	48

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AV</b>	<i>Aloe vera</i>
<b>AI</b>	Inseminação artificial
<b>Ph</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ACP</b>	Diluidor à base de água de coco
<b>FSH</b>	Hormônio folículo-estimulante
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>AR</b>	Receptor de androgênio
<b>UV</b>	Raio ultravioleta
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitro salicílico
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>BDA</b>	Batata, dextrose, ágar
<b>HOST</b>	Teste hiposmótico
<b>EN</b>	Eosina-nigrosina
<b>RPM</b>	Número de rotações por minuto
<b>cP</b>	Centipoise
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>UFC/mL</b>	Unidades formadoras por mililitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>%</b>	Porcentagem
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>±</b>	Mais ou menos
<b>10<sup>6</sup></b>	Milhões
<b>sptz/mL</b>	Espermatozoides por mililitros
<b>h</b>	Hora
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mOsmol/Kg</b>	Miliosmoles por quilo
<b>g</b>	Gramas
<b>μL</b>	Micro litro
<b>μm</b>	Micrometro
<b>nm</b>	Nanômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
2.1 Aparelho Reprodutor	19
2.1.1 Epidídimo	20
2.1.2 Espermatogênese e a célula espermática	22
2.2 Biotecnologia do Sêmen	25
2.2.1 Refrigeração	26
2.3 Diluidor	26
2.4 Frutose	28
2.5 <i>Aloe vera</i> ( <i>Aloe barbadenses</i> Miller)	29
<b>3 OBJETIVOS</b>	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
4.1 Obtenção do Extrato Bruto da <i>Aloe vera</i>	34
4.2 Potencial Hidrogeniônico	35
4.3 Determinação do Teor de Açúcares Redutores	35
4.4 Teste de Viscosidade ( <i>Ensaio Reológico</i> )	36
4.5 Obtenção dos Espermatozoides Epididimários	37
4.6 Delineamento do Experimento	38
4.7 Análise Espermática	39
4.7.1 Motilidade espermática	39
4.7.2 Teste de integridade da membrana plasmática	40
4.7.3 Teste de funcionalidade da membrana plasmática	40
4.7.4 Morfologia espermática	41
4.8 Análise Estatística	41
4.9 Teste de Crescimento Microbiológico	42
<b>5 RESULTADOS</b>	44
5.1 Potencial Hidrogeniônico	44
5.2 Determinação do Teor de Açúcares Redutores	44
5.3 Teste de Viscosidade ( <i>Ensaio Reológico</i> )	45
5.4 Análise espermática	46

5.4.1 Motilidade espermática	46
5.4.2 Teste de integridade da membrana plasmática	46
5.4.3 Teste de funcionalidade da membrana plasmática	47
5.5 Teste de Crescimento Microbiológico	48
<b>6 DISCUSSÃO</b>	51
<b>7 CONCLUSÕES</b>	55
<b>REFERÊNCIAS</b>	56
<b>GLOSSÁRIO</b>	65
<b>ANEXO I - PREPARAÇÃO DOS DILUIDORES</b>	66
<b>ANEXO II - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA OS TESTES</b>	67



# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o maior rebanho bovino comercial do planeta, devido a isto, a cadeia produtiva necessita aumentar cada vez mais a eficiência dos processos a um menor custo (FRENEAU, 2011). Para isso estão sendo utilizadas biotécnicas, como inseminação artificial em bovinos que é uma biotécnica aplicada à reprodução com maior difusão e impacto no melhoramento genético de animais de exploração zootécnica (BORGES et al., 2011).

A criopreservação do sêmen tem sido vista como um meio de beneficiar a criação de animais de importância agrícola, reconhecida por contribuir para a conservação de espécies ameaçadas e para superar aspectos da infertilidade masculina em seres humanos (WATSON, 2000). O processo de criopreservação de sêmen, além de possibilitar sua utilização por longo período, reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores; favorece rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes; minimiza a possibilidade de introdução de doenças transmissíveis via sêmen numa região e/ou país e a transmissão e propagação de doenças sexualmente transmissíveis nos rebanhos (TRALDI, 1994).

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo é uma técnica importante para preservar reservas genéticas de animais valiosos recém mortos (MURADÁS et al., 2006). Os procedimentos de isolamento de espermatozoides do epidídimo de animais mortos, a criopreservação e subsequente utilização para a fecundação *in vitro*, são importantes ferramentas para resgatar material genético que poderia ser perdido, tanto de animais de produção, como em espécies em extinção (MARTINS et al., 2007). No touro, a cauda do epidídimo possui a capacidade de armazenar o equivalente a dez ejaculados sucessivos e devido a sua baixa atividade metabólica, os espermatozoides podem sobreviver por até 15 dias, enquanto que após a ejaculação sobrevivem por pouco mais que 24 horas (BEDFORD, 1994).

A descoberta do glicerol como crioprotetor marcou um avanço quântico no sêmen criopreservado, mas pesquisas subsequentes fizeram melhorias relativamente pequenas nas técnicas básicas estabelecidas no início da década de 1950 (HOLT, 2000). Mesmo com as melhores técnicas de preservação, a sobrevivência pós-descongelação ainda é restrita a cerca de 50% da população de espermatozoides. Além disso, a maioria dos espermatozoides sobreviventes apresentam características que os distinguem dos espermatozoides antes da criopreservação. Como consequência, a fertilidade do sêmen criopreservado utilizado na

inseminação artificial (AI) é mais pobre que o sêmen fresco na maioria das espécies, o que pode ser parcialmente compensado pela utilização de um maior número de espermatozoides vivos (WATSON, 1995).

Muitos fatores devem ser considerados quanto a congelação do sêmen, pois durante esse processo os lipídios da membrana plasmática do espermatozoide passam por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (AMANN; PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996). Caso o espermatozoide não seja refrigerado apropriadamente, ocorrerão danos que acarretarão em perda da motilidade e fertilidade, devido ao fenômeno térmico (WATSON, 1995), que causam lesões na membrana plasmática, redução do metabolismo de carboidratos e perda de componentes intracelulares, lipídios e enzimas espermáticas (DROBNIS et al., 1993).

Os diluidores usados para a preservação espermática, de uma forma geral, devem ter pH adequado, capacidade de proteção e manutenção da viabilidade celular, osmolaridade adequada e, ainda, capacidade de proteger o espermatozoide de injúrias criogênicas (SALAMON; MAXWELL, 2000). No mercado há diversos diluidores que buscam manter as características seminais essenciais à reprodução, os quais agem sob o ponto de congelação da solução, momento em que ocorre a formação dos cristais de gelo (MONREAL et al., 2013), esses diluidores têm como crioprotetor extracelular base de produtos de origem animal, como a gema de ovo e/ou leite desnatado.

Os componentes básicos dos diluentes de congelação são substâncias iônicas e não-iônicas que mantêm a osmolaridade e tamponam o meio; uma fonte de lipoproteína de alto peso molecular para proteger contra o choque térmico, como a gema de ovo e o leite; açúcares, glicerol, 1,2-propanodiol ou dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetores; e outros aditivos como enzimas antioxidantes e antibióticos (VISHWANATH; SHANNON, 2000). Porém, extensores de sêmen contendo componentes como gema de ovo e leite desnatado são difíceis de padronizar e introduzem o risco de contaminação microbiana. Um extensor bem definido, não originário de tecidos animais, apresentaria uma valiosa contribuição para a indústria de IA (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000).

A 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. A *Aloe vera* também é conhecida como *Aloe barbadenses*, por crescer, espontânea e abundantemente, na ilha de Barbados. O interior de suas folhas é constituído de um tecido parenquimático rico em polissacarídeos, conhecido como mucilagem, que lhe confere uma consistência viscosa,

semelhante a uma baba, de onde surgiu o nome de Babosa. Nesta mucilagem ou gel encontram-se seus princípios ativos, que são constituídos de tecidos orgânicos, enzimas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos, dentre os quais 18 são importantíssimos para o homem, e desses, sete pertencem aos oito não sintetizados pelo organismo humano (BACH; 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, o ACP, permitiu a obtenção 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.

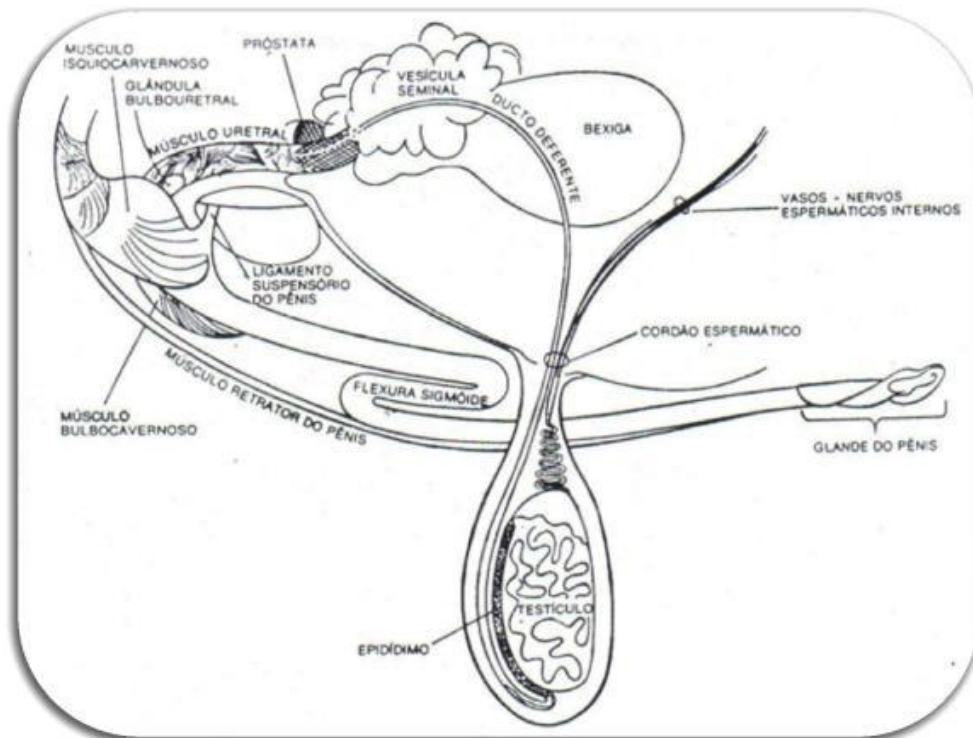
Devido à utilização da *Aloe vera* pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e fitoterápica (BACH; LOPES, 2007) por conter componentes ativos em seu gel e pela presença de análises satisfatórias em estudos utilizando a *Aloe vera* em espermatozoides de diferentes espécies, a perspectiva deste trabalho é que o diluidor a 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 por um período de 48 horas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aparelho Reprodutor

O sistema reprodutivo masculino é constituído de diversos órgãos (Figura 1) que atuam em conjunto para produzir espermatozoides e liberá-los no sistema reprodutor da fêmea. Os órgãos genitais consistem em dois testículos, suspensos dentro da bolsa escrotal por um cordão espermático e pelo músculo cremaster externo; dois epidídimos; dois ductos deferentes; glândulas sexuais acessórias; e o pênis (MARQUES FILHO, 2006).

Figura 1. Sistema reprodutor masculino bovino



Fonte: <http://s3.amazonaws.com/magoo/ABAAAgLoAAG-19.jpg>

O testículo é o local do desenvolvimento de células germinativas, ou seja, a espermatogênese e, portanto, o tecido primário do sistema reprodutor masculino. É também o sítio da síntese e secreção de andrógenos (ROBERTS, 2010). Os testículos estão posicionados dorsoventralmente perpendicular à parede abdominal na região inguinal. Devido aos diferentes formatos entre as subespécies e raças bovinas, podem ser considerados os seguintes formatos: longo, longo/moderado, longo/oval, oval/esférico e esférico (CBRA, 2013).

A bolsa testicular, presente em todos os animais domésticos, é uma evaginação do

períneo composta basicamente por pele, fáscia escrotal e uma camada fibroelástica subcutânea e muscular, a túnica dartos, fundida ao folheto parietal da túnica vaginal. A pele tem uma epiderme fina e alguns poucos pelos. A bolsa testicular regula a temperatura testicular (MARTINS JUNIOR; FEITOSA, 2008).

O epidídimo, adjacente às superfícies dorsal, medial e ventral do testículo, apresenta três partes distintas: cabeça, corpo e cauda (MARTINS JUNIOR; FEITOSA, 2008). O epidídimo não é apenas um conduto para os espermatozoides, mas também proporciona um ambiente especial para que estes se amadureçam e adquiram capacidade de fertilização (MARQUES FILHO, 2006).

O ducto deferente, também chamado de vaso deferente, é uma extensão distal dos ductos epididimários, que transporta espermatozoides e fluidos seminal da cauda do epidídimo para o ducto ejaculatório, onde se une ao ducto excretor da vesícula seminal. É comumente dividido em quatro segmentos - testicular, inguinal, abdominal e pélvico - que correspondem às posições anatômicas de várias partes do ducto deferente (DE KRETZER et al., 1982).

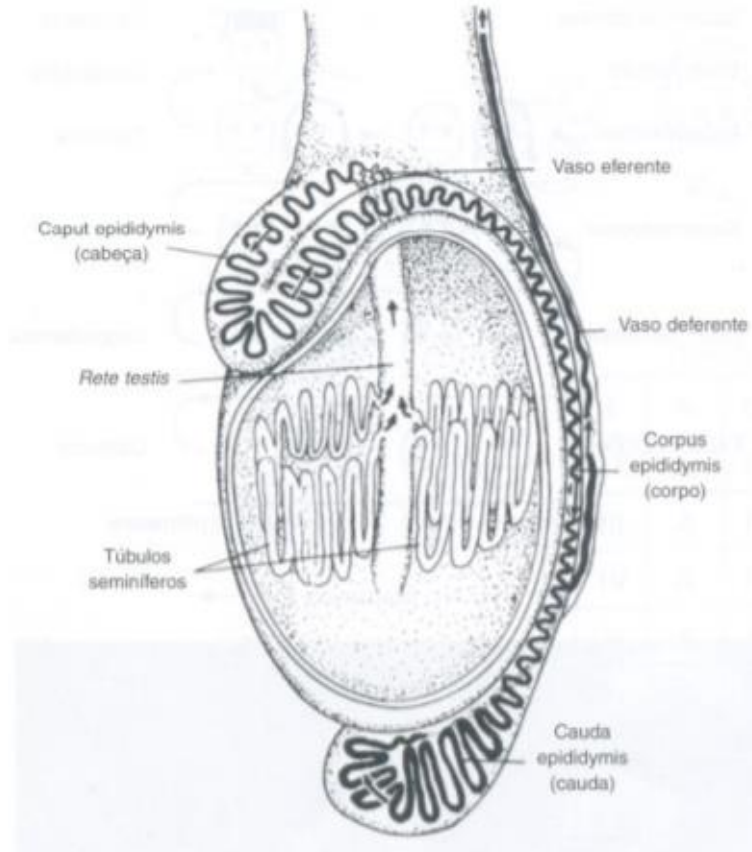
O sêmen é composto de secreções das glândulas sexuais acessórias (próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais), as quais acrescentam volume, nutrientes, tampões e outras substâncias, cujas funções ainda permanecem desconhecidas. Essas secreções são chamadas de plasma ou líquido seminal. A presença, o tamanho e a localização dessas glândulas variam consideravelmente com a espécie (JUNIOR; FEITOSA, 2014). O pênis é o órgão copulador, formado por uma porção denominada corpo, pelo músculo retrator e pela glândula (MARQUES FILHO, 2006). O pênis bovino apresenta uma flexura sigmoide ou "S" peniano em situação pós-escrotal (CBRA, 2013).

### **2.1.1 Epidídimo**

O epidídimo é constituído de cabeça, corpo e cauda (Figura 2). Dentro de cada região, existem vários segmentos separados por septos, sendo variável os números de segmentos dentro de cada região (HINTON, 2010). Nos dois primeiros ocorrem o transporte e a maturação dos espermatozoides. A cauda tem a função de armazenar os espermatozoides maturados até o momento da ejaculação. A passagem do espermatozoide através do epidídimo dura cerca de 10 dias no bovino (MARQUES FILHO, 2006). A partir da cauda, origina-se o ducto deferente, o qual irá se ligar à uretra pélvica (MARTINS JUNIOR; FEITOSA, 2008). Proximamente, os ductos eferentes conectam o testículo ao epidídimo e distalmente, o canal deferente se estende da região cauda. A cabeça do epidídimo absorve uma quantidade

considerável de líquido originado nos túbulos seminíferos, resultando em aumento da concentração de espermatozoides. A cauda armazena cerca de 80% das células germinativas maduras, as quais, pela ejaculação, são direcionadas à uretra através dos ductos deferentes. Não havendo ejaculação, o principal destino dos espermatozoides é a descarga espontânea na uretra e eliminação na urina (MARTINS JUNIOR; FEITOSA, 2008).

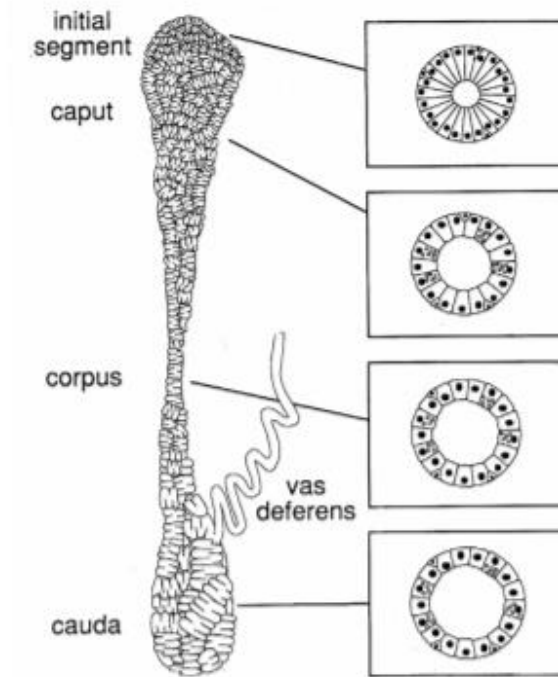
Figura 2. Divisão do epidídimo bovino



Fonte: Hafez; Hafez, Reprodução Animal, 2004, p. 104.

O epitélio do epidídimo é composto por vários tipos de células (Figura 3), incluindo: células principais, basais, apicais, halo, células claras e estreitas, cada uma das quais varia em número e tamanho ao longo do ducto epididimário (HINTON, 2010), sendo cada um com suas funções imune, manutenção, secreção, absorção, entre outros. Nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções, ressaltando-se a reabsorção dos fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, o transporte dos espermatozoides, a eliminação dos espermatozoides defeituosos, a maturação e o armazenamento dos espermatozoides (MURADÁS et al., 2006).

Figura 3. Representação esquemática do epidídimo e regiões da cabeça, corpo e cauda



Fonte: Hilton, B. T., Handbook of Andrology, 2010, p. 10-2.

Durante o armazenamento, o epidídimo acumula espermatozoides que podem ou não ser utilizados na cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozoides do macho. Em touros e garanhões, o número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculações sucessivas, dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (BEDFORD, 1994). A função de armazenamento é ilustrada pelo fato dos espermatozoides ejaculados sobreviverem por 24 horas ou mais fora do epidídimo; entretanto os que são mantidos na cauda do epidídimo (*in vivo*) permanecem vivos por mais de 15 dias. Esta funcionalidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozoides (MURADÁS et al., 2006).

A colheita e a criopreservação dos espermatozoides da cauda do epidídimo podem ser a última chance e opção para preservação de células germinativas de animais de alto valor genético, reprodutores de idade avançada ou após a morte do animal (BARBOSA et al., 2012).

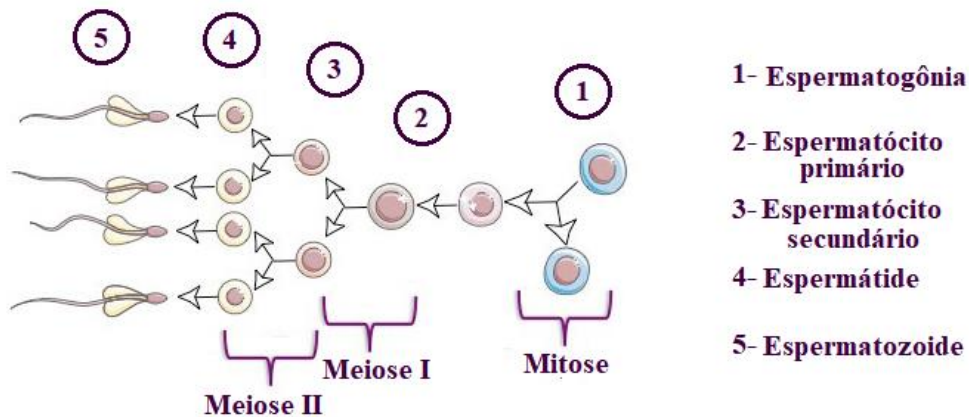
### 2.1.2 Espermatogênese e a célula espermática

Alguns animais iniciam a produção de espermatozoides ainda jovens. Nos bovinos o processo de espermatogênese tem duração de 61 dias, desde a célula primordial até

sua maturação (MARQUES FILHO, 2006). O testículo é o local do desenvolvimento de células germinativas e, portanto, o tecido primário do sistema reprodutor masculino (ROBERTS, 2010). A diferenciação da célula espermática envolve três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermatídes (COUROT et al., 1970). A produção normal de espermatozoides depende de fatores ambientais, como a luminosidade, temperatura, estresse, nutrição, assim como dos fatores genéticos (MARQUES FILHO, 2006).

Nos adultos a espermatogênese é dividida em três fases: a mitótica, a meiótica e a espermiogênese (Figura 4), sendo cada fase caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular (COUROT et al., 1970).

Figura 4. Fases da espermatogênese



Fonte: Adaptado de [www.repropeia.org/sites/repropeia/files/spermatogenesis.jpg](http://www.repropeia.org/sites/repropeia/files/spermatogenesis.jpg)

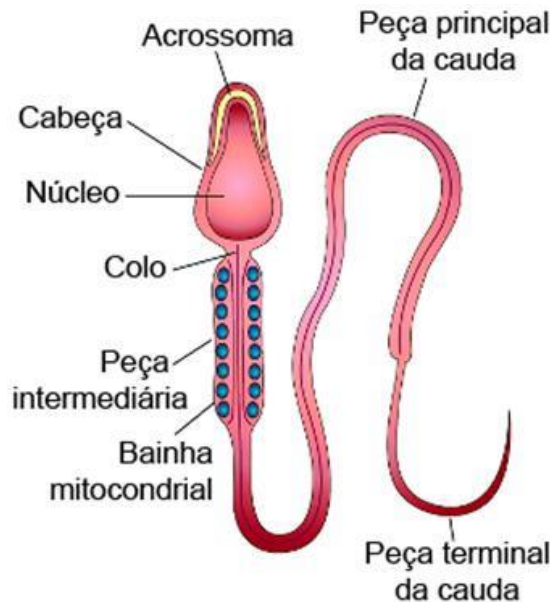
A primeira fase envolve a proliferação mitótica das espermatogônias ( $2n$ ) e a diferenciação de parte delas em espermatócitos primários ( $2n$ ), que seguem para a meiose; a segunda fase, para formar espermatídes haploides ( $n$ ) (SILVA, 2012). O próximo passo na maturação é a espermiogênese, a diferenciação do espermatozoide. Os primeiros passos envolvem a construção da vesícula acrossomal do aparelho de Golgi. O acrossoma forma uma estrutura semelhante a um "boné", cobrindo o núcleo. À medida que a cápsula acrossomal é formada, o núcleo gira de modo que a face fique de frente para a membrana basal do túbulo seminífero. Esta rotação é necessária devido ao início da formação do flagelo, a partir do centríolo distal, e este flagelo se estenderá para o lúmen. Durante o último estágio de espermiogênese, o núcleo se achata e se condensa, o citoplasma restante, a "gota citoplasmática", é absorvido pelas células de Sertoli e as mitocôndrias formam um anel em torno da base do flagelo (GILBERT; BARRESI, 2010).



Todo o trato reprodutivo masculino depende dos hormônios para a função adequada. A hipófise produz gonadotrofinas, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), sob o controle do hipotálamo. O LH, liberado da adenohipófise em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) do hipotálamo, liga-se aos receptores acoplados à proteína G na membrana citoplasmática das células de Leydig no compartimento intersticial do testículo e, assim, estimula estas células a converter o colesterol em testosterona (ROBERTS, 2010; ZIRKIN, 2010).

As principais células alvo para testosterona dentro do testículo são as células de Sertoli, contendo receptores de androgênio (AR). O FSH, produzido pela adenohipófise, atua nos receptores de células de Sertoli para promover a espermatogênese. O testículo requer altas concentrações de testosterona para manter o processo de espermatogênese e os órgãos acessórios dependem do andrógeno para a função secretora adequada. Além do controle hormonal, os órgãos reprodutivos também estão sujeitos ao controle nervoso simpático e parassimpático. Assim, para a produção adequada de gametas, deve haver integração do hipotálamo, da hipófise e do testículo (ROBERTS, 2010; ZIRKIN, 2010).

Figura 5. Estrutura da célula germinativa masculina



Fonte: Moore et al., Embriologia Básica, 2013, p. 11.

Os espermatozoides (Figura 5) completamente desenvolvidos são células alongadas, consistindo de uma cabeça achatada contendo o núcleo e de uma cauda com o aparelho necessário para a motilidade celular. O espermatozoide é todo recoberto pelo plasmalema, ou membrana plasmática. O acrossoma, ou capa acrossomal, é uma estrutura de

parede dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior da cabeça. O colo conecta a cabeça do espermatozoide com a cauda (flagelo), que é subdividida em peças intermediária, principal e terminal (GARNER; HAFEZ, 2004).

A condição morfológica das células espermáticas é uma reflexão da espermatogênese, a qual, se prejudicada, resulta na produção anormal de células espermáticas. Os chamados defeitos primários ocorrem nos testículos durante a espermatogênese e são sempre defeitos maiores, afetando seriamente a fertilidade. Já defeitos que aparecem nos espermatozoides após a saída dos testículos, são chamados de defeitos secundários e são de menor importância, os defeitos menores (JÚNIOR; FEITOSA, 2014). A produção diária de espermatozoides no touro adulto é da ordem de 12 a 14 bilhões de células (MARQUES FILHO, 2006).

## **2.2 Biotecnologia do Sêmen**

Dentre as biotecnologias da reprodução animal, a criopreservação é a ferramenta que oferece vantagens para preservar a viabilidade espermática por longos períodos (OSORIO, 2006). A criopreservação de espermatozoides de mamífero é um processo complexo que envolve equilibrar muitos fatores para obter resultados satisfatórios (PURDY, 2006). O protocolo de criopreservação é composto de etapas potencialmente prejudiciais, primeiramente a mudança na temperatura; seguida pelas tensões osmóticas e tóxicas apresentadas por exposição a concentrações molares de crioprotetores; e ainda, a formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000).

O processo de criopreservação representa uma interrupção artificial do progresso do espermatozoide para a maturação pós-ejaculação e fertilização (WATSON, 1995). Esta manipulação requer que as amostras de espermatozoides sejam submetidas à refrigeração moderada e controlada, visando preservar a sua função, que é a fecundação do oócito após o restabelecimento da temperatura (HOLT, 2000).

Para que o espermatozoide fertilize o oócito, deve reter pelo menos quatro atributos gerais após congelação/descongelação: a) Metabolismo para produção de energia; b) Motilidade progressiva; c) Enzimas, localizadas dentro do acrossoma, que são essenciais para a penetração do espermatozoide através das estruturas que cercam o oócito; d) Proteínas sobre a membrana plasmática, importantes para a sobrevivência de um espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a fixação do espermatozoide na membrana plasmática do

oócito na fertilização (AMANN; PICKETT, 1987).

No entanto, para assegurar o mínimo de sucesso na criopreservação, não apenas a composição do diluidor, a taxa de diluição e a curva de congelamento/descongelamento são importantes, como também o conhecimento da fisiologia espermática da espécie em questão (MAIA, 2014).

### **2.2.1 Refrigeração**

O espermatozoide de mamíferos é muito sensível à refrigeração rápida, ou seja, da temperatura ambiente até próximo ao ponto de congelamento da água. O dano causado pela redução da temperatura durante a refrigeração até 4 °C ou 5 °C é denominado choque térmico e ocasiona perda irreversível da viabilidade dos espermatozoides, pela rápida diminuição da motilidade ou surgimento de padrão anormal da mesma, que passa a ser circular ou retrógrada (LEITE et al., 2011).

O modelo mosaico da membrana é fluido, devido às interações entre os lipídios e as proteínas não serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas se movam lateralmente no plano da membrana (BORGES et al., 2011). À temperatura em torno de 5 °C, a água intracelular permanece refrigerada, mas não cristalizada (OSORIO, 2006). Nesta faixa de temperatura ocorre a fase de transição da membrana plasmática que passa de uma fase líquida cristalina para o estado de gel (GRAHAM, 1996).

A diminuição da produção de energia, que caracteriza movimento circular ou perda prematura de motilidade espermática, e aumento da permeabilidade da membrana estão associados a essas alterações da membrana plasmática (WATSON, 1995). Entretanto este efeito pode ser minimizado se controlar a taxa de refrigeração entre as temperaturas 19 °C e 8 °C e pela adição de lipídeos e lipoproteínas ao diluente visando maior proteção a membrana da célula (GRAHAM, 1996).

Para minimizar os efeitos deletérios da criopreservação vêm sendo testados, através das décadas, inúmeros diluentes e crioprotetores, além de aditivos para proteger as células e fornecer substratos para sua manutenção durante e após a congelamento (LEITE et al., 2011).

## **2.3 Diluidor**

Os ejaculados da maioria dos animais domésticos contem mais espermatozoides

que o necessário para uma fecundação. Diluindo-se o sêmen, ele pode ser utilizado para uma série de inseminações (CASTELO et al., 2008).

Para recuperação e conservação da célula espermática faz-se necessário o emprego de um meio diluidor (MOTA FILHO et al., 2013). A composição do meio diluidor é de vital importância para criopreservação do sêmen e deve ser específica para cada espécie (CHIRINÉA, 2004). Na criopreservação, são utilizadas substâncias para proteger a estrutura dos espermatozoides, como os agentes crioprotetores (OSORIO, 2006). Esses componentes são classificados como penetrantes, quando exercem sua ação crioprotetora dentro da célula, ou não penetrantes, cuja atividade de crioproteção ocorre fora da célula ou na sua superfície (BITTENCOURT et al., 2013).

Crioprotetor é a nomenclatura dada a qualquer substância que ofereça, temporariamente, energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006).

Ao longo dos últimos 65 anos, diluidores crioprotetores para o armazenamento de espermatozoide foram revisados continuamente, mas os ingredientes básicos permanecem inalterados, com gema de ovo e/ou leite e glicerol representando os compostos indispensáveis de praticamente todos os meios utilizados para a preservação do espermatozoide de touro no estado líquido ou congelado. Os diluidores utilizados para a diluição do sêmen de touro são tipicamente tampões à base de gema de ovo e/ou de leite/leite desnatado - citrato/tampão à base de Tris com açúcares e antibióticos simples adicionados, com ou sem crioprotetores penetrantes. Esses componentes fornecem uma capacidade tampão aceitável, osmolaridade e energia sob a forma de substratos metabolizáveis, minimizando o crescimento bacteriano e também protegem o espermatozoide das diminuições de temperatura (SATHE; SHIPLEY, 2014).

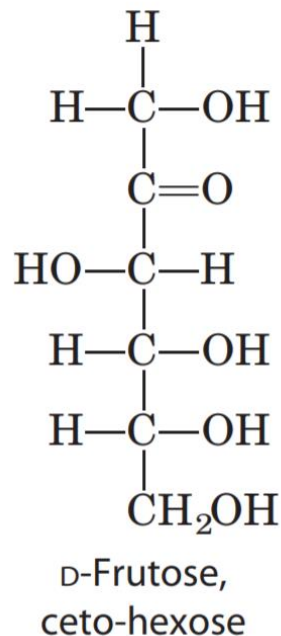
Por apresentarem características crioprotetoras, a gema de ovo é comumente utilizada nos diluidores de sêmen para minimizar os efeitos deletérios do choque térmico (CORADIN, 2011). A maior desvantagem do uso de diluentes à base de leite é a baixa visibilidade do espermatozoide ao microscópio, tornando as avaliações pós-descongelamento mais difíceis. A gema de ovo em combinação com o TRIS e o citrato é a formulação mais utilizada (LEITE et al., 2011).

Do ponto de vista criobiológico, os efeitos osmóticos das concentrações molares de crioprotetores podem resultar em danos à membrana, tanto durante a introdução do crioprotetor quanto na sua remoção, dependendo da permeabilidade da membrana celular ao crioprotetor (WATSON, 1995).

## 2.4 Frutose

O nome frutose é originário da palavra latina *fructus*, já que as frutas são uma importante fonte de frutose. Ela é considerada um açúcar, sendo um composto sólido, incolor, cristalino e solúvel em água. Como componente de frutas e outros vegetais, é ingerida regularmente com a dieta. Também é sintetizada no organismo a partir da glicose, via sorbitol, e esse processo se relaciona com a manutenção do equilíbrio óxido-redutivo (BARREIROS et al., 2005).

Figura 6. Representação da estrutura química da D-frutose

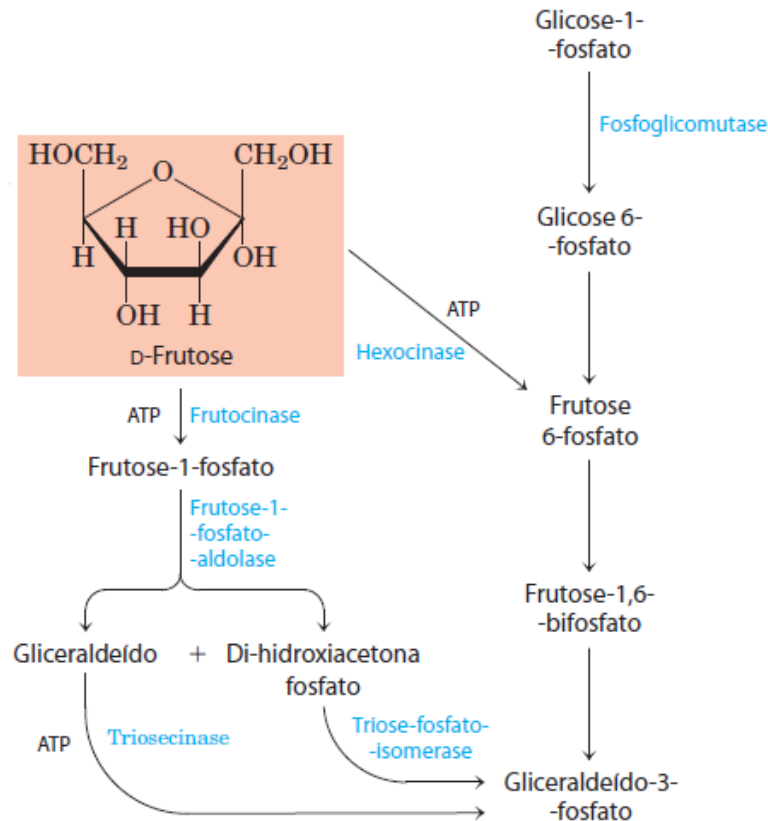


Fonte: Nelson. Cox, Princípios de bioquímica de Lehninger, 2014, p. 244.

A frutose é um monossacarídeo (Figura 6), sendo composta por seis átomos de carbono unidos em ligações covalentes simples, apresentando grupamentos hidroxila, formados por hidrogênio e oxigênio e um grupamento carbonila, formado por ligação dupla entre o carbono e o oxigênio (NELSON; COX, 2014).

A frutose é um componente essencial no metabolismo e motilidade dos espermatozoides. Durante o período de formação e maturação dos gametas masculinos, a glicose é a principal fonte de energia durante o período de imobilidade. Na fase ativa de motilidade, quando o metabolismo dos espermatozoides se torna anaeróbico, a frutose passa a ser a principal fonte de energia (Figura 7) (PIVA; DONIDA, 1980).

Figura 7. Metabolismo da frutose para gliceraldeído-3-fosfato para glicólise



Fonte: Adaptado de Nelson. Cox, Princípios de bioquímica de Lehninger, 2014, p. 560

As secreções de vesículas seminais são ricas em frutose (ROBERTS, 2010), sendo o principal açúcar do plasma seminal e estando presente no ejaculado de cão, carneiro, varrão, touro e homem. O espermatozoide tem capacidade para realizar frutólise anaeróbica e produzir lactato e energia, ainda aceita a glicose como substrato energético, porém a frutose está em maior quantidade no sêmen, provavelmente para evitar que outras células possam competir pelo substrato energético com os espermatozoides (GONZÁLEZ, 2002) e a concentração de frutose dentro do plasma seminal serve como indicador para a função das vesículas seminais (WEIDNER, 2011).

## 2.5 *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller)

A planta *Aloe vera* tem sido conhecida e usada há séculos por suas propriedades de saúde, beleza, medicina e cuidados com a pele. O nome *Aloe vera* deriva da palavra árabe "Alloeh" que significa "substância amarga brilhante", enquanto "vera" em latim significa "verdade". Há 2000 anos, os cientistas gregos consideravam a *Aloe vera* universalmente como

Panacea. Os egípcios chamaram Aloe de "a planta da imortalidade". O nome botânico de *Aloe vera* é *Aloe barbadensis* Miller, sendo uma planta arbustiva ou arborescente, perene, xerofítica, suculenta, de coloração verde. Cresce principalmente nas regiões secas da África, Ásia, Europa e América (SURJUSHE et al., 2008). A Tabela 1 mostra a classificação taxonômica da *Aloe barbadenses* Miller.

Tabela 1. Classificação taxonômica da *Aloe barbadenses* Miller

Classificação taxonômica	
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sub-reino</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Super divisão</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Divisão</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Liliopsida</i>
<b>Subclasse</b>	<i>Liliidae</i>
<b>Ordem</b>	<i>Liliales</i>
<b>Família</b>	<i>Aloaceae</i>
<b>Gênero</b>	<i>Aloe</i> L.
<b>Espécie</b>	<i>Aloe barbadenses</i> Miller

Fonte: Eloy (2012).

Apesar de sua aparência (Figura 8), a *Aloe* não é um cacto e cresce melhor quando for fornecido um excesso de 50 cm de água por ano e um ligeiro excesso de nitrogênio. Devido ao seu sistema radicular bastante incomum, as *Aloe* exigem solos bem drenados e não toleram o preparo profundo (WALLER et al., 2004). O interior de suas folhas é constituído de um tecido parenquimatoso (Figura 9) rico em polissacarídeos, mucilagem, que lhe confere uma consistência viscosa, semelhante à baba, de onde surgiu o nome de Babosa. Nessa mucilagem ou gel encontram-se seus princípios ativos, que são constituídos de tecidos orgânicos, enzimas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos, dentre os quais 18 são importantíssimos para o homem, e desses, sete pertencem aos oito não sintetizados pelo nosso organismo (BACH; LOPES, 2007).

Figura 8. Planta *Aloe barbadensis* Miller

Fonte: <http://www.ceasacampinas.com.br/userfiles/babosa%20not.jpg>.

As *Aloe* contêm derivados de antraquinona (10% a 40%), como aloína, mucilagem (30%), substâncias resinosas (16% a 63%) como aloesina e aloesona, açúcares (cerca de 25%), polissacarídeos como acemannan e betamannan, ácidos graxos e colesterol, campesterol,  $\beta$ -sisterol, glicoproteínas (aloctinas A e B), lectinas, uma substância de tipo giberelina, enzimas tais como ciclo-oxigenase e bradquininase, juntamente com outros compostos como lupeol, ácido salicílico, ureia, ácido cinâmico, fenol, enxofre, lactato de magnésio, salicilatos e aminoácidos (MASCOLO et al., 2004).

Figura 9. Estruturas da folha de *Aloe vera*

Fonte: Autor (2017).



O interesse no gel do parênquima centrou-se nas suas propriedades terapêuticas bem conhecidas (REYNOLDS, 2004), sendo estudada pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e fitoterápica (BACH; LOPES, 2007) por conter mecanismos de ação já conhecidos, como: propriedade de cura, efeitos na exposição da pele à radiação ultravioleta (UV) e gama, ação anti-inflamatória, efeitos no sistema imunológico, efeitos laxantes, atividade antiviral e antitumoral, efeito hidratante e antienvhecimento, efeito antisséptico (SURJUSHE et al., 2008), entre outros.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do diluidor a base de diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose na refrigeração de espermatozoides epididimários de bovinos a 5 °C.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

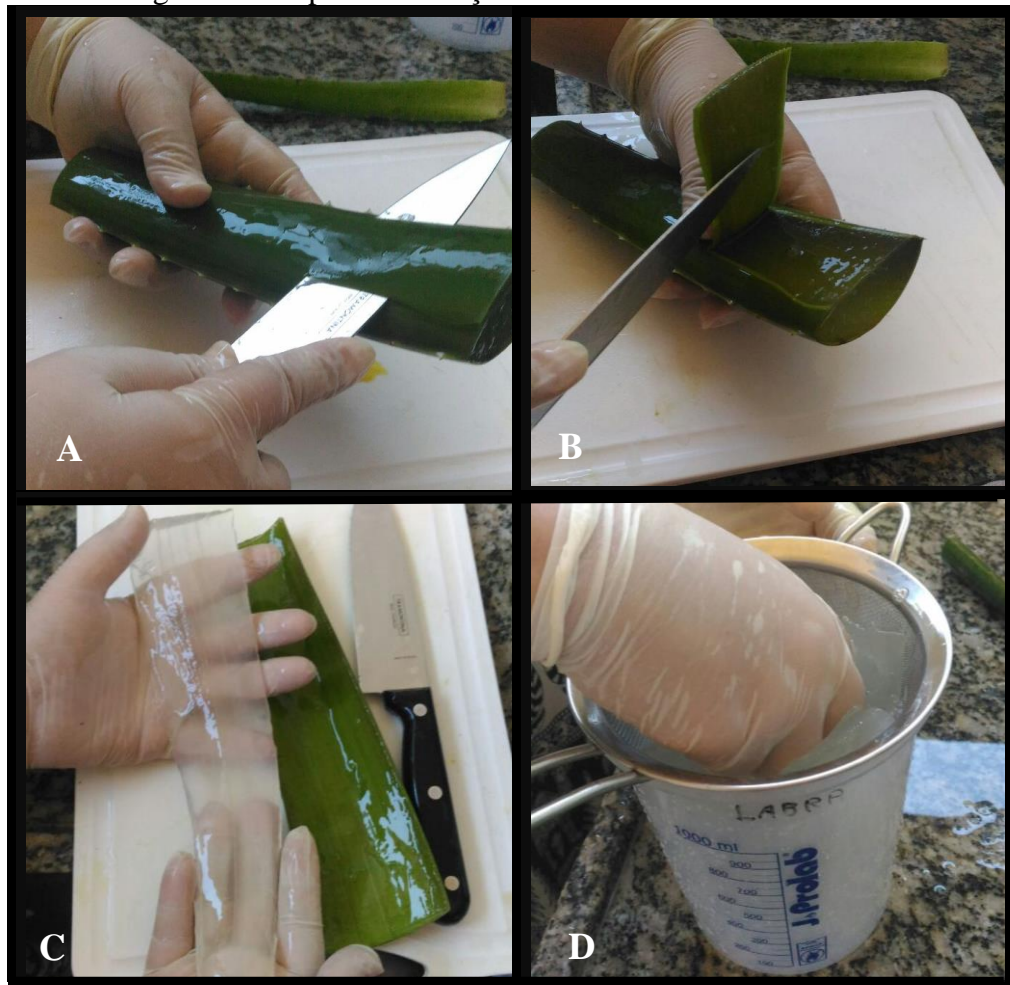
- a) Mensurar a viscosidade do diluidor Tris-gema e dos diluidores contendo 5%, 10% e 20% de *Aloe vera* com diferentes concentrações de frutose;
- b) Observar a motilidade espermática subjetiva de espermatozoides epididimários de bovino refrigerados a 5 °C, nos diluidores contendo 5%, 10% e 20% de *Aloe vera* com diferentes concentrações de frutose;
- c) Examinar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovino refrigerados a 5 °C, nos diluidores contendo 5%, 10% e 20% de *Aloe vera* com diferentes concentrações de frutose;
- d) Analisar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovino refrigerados a 5 °C, nos diluidores contendo 5%, 10% e 20% de *Aloe vera* com diferentes concentrações de frutose.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do Extrato Bruto da *Aloe vera*

Para obtenção do extrato bruto foram colhidas folhas de diferentes *Aloe barbadensis Miller* com cinco dias sem regar para concentrar seus princípios ativos. Realizou-se a retirada da camada externa utilizando uma faca inox (Figura 10A; 10B) e, em seguida, a extração do parênquima mucilaginoso da folha, com aspecto de gel incolor (Figura 10C). Em seguida, foi filtrado com o auxílio de uma peneira inox e colocado em um recipiente Becker para posteriores análises e divisão dos volumes a serem adicionados às soluções específicas (Figura 10D).

Figura 10. Etapas da obtenção do extrato bruto da *Aloe vera*



Fonte: Autor (2017).

## 4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH foi mensurado com auxílio de fitas de pH (Merck, figura 11), 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 avaliar de acordo com a coloração indicativa ofertada pelo fabricante na caixa.

Figura 11. Fitas para mensuração do pH

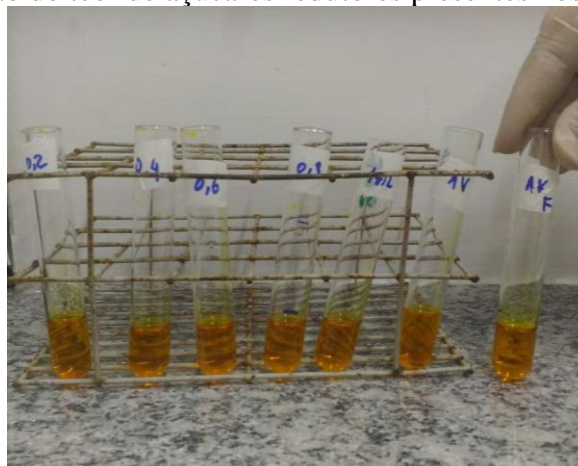


Fonte: Autor (2017).

## 4.3 Determinação do Teor de Açúcares Redutores

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico), proposta por Miller (1959), baseado na redução do ácido 3-amino-5nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Figura 12. Determinação do teor de açúcares redutores presentes nos diluidores espermáticos



Fonte: Autor (2017).

Foi realizada uma diluição de 1:1 do extrato bruto da *Aloe vera* e água destilada e previamente homogeneizada em um vórtex (Warmnest, Araucária). Posteriormente, metade foi filtrada por uma membrana de esterilização (0,22  $\mu\text{m}$ ) e acondicionados em tubos Falcons de 15 mL. A curva padrão foi obtida pelo teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de frutose e glicose a 1 g/L. Tomou-se 0,5 mL das soluções e adicionou-se 2,5 mL do reagente DNS, em triplicata. Os tubos foram aquecidos a 100 °C por dez minutos e refrigerados em banho de gelo por cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 3 mL de água destilada, homogeneizados e realizada a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION, Kleve) a 540 nm (Figura 13). A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/g amostra). Com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração.

Figura 13. Espectrofotômetro utilizado para mensuração dos níveis de açúcares de diluidores espermáticos



Fonte: Autor (2017).

#### 4.4 Teste de Viscosidade (*Ensaio Reológico*)

As viscosidades dos diluidores a base de plantas de *Aloe vera* regadas e não regadas e do Tris-gema foram determinados através do reômetro (Brookfield LVDVIII Ultra, São Paulo; figura 14) 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 10 °C e 37 °C. Foram obtidos 30 pontos de cada amostra e realizada a média da viscosidade dada em centipoise (cP). Este estudo foi realizado para verificar a viscosidade dos diferentes diluidores a base de *Aloe vera* e comparar com o diluidor mais utilizado (Tris-gema) em função da variação de temperatura.

Figura 14. Reômetro Brookfield LVDVIII Ultra



Fonte: Autor (2017).

#### 4.5 Obtenção dos Espermatozoides Epididimários

Foram utilizados 26 complexos de testículos/epidídimos de bovinos sem raça definida (Figura 15) obtidos em matadouros localizados na cidade de João Pessoa-Paraíba (07° 05' 00" S 34° 50' 00" O). Após o abate, o complexo testículo-epidídimo foi separado, armazenado e encaminhado ao laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal da Universidade Federal da Paraíba, Campus I. No laboratório, o epidídimo e o ducto deferente foram separados do testículo, amarrados com um barbante para não extravasar o conteúdo da cauda do epidídimo e foram posteriormente isolados. Os espermatozoides foram recuperados pela técnica de flutuação, através do fatiamento da cauda do epidídimo e em seguida sua imersão em 2,0 mL de solução fisiológica estéril, aquecida a 37 °C (Figura 16). Os espermatozoides recuperados foram avaliados e os aprovados segundo os critérios de percentual de células móveis, acima de 50%, e homogeneizados para a formação do *pool*.

Figura 15. Complexo testículo/epidídimo de bovinos previamente abatidos para consumo humano



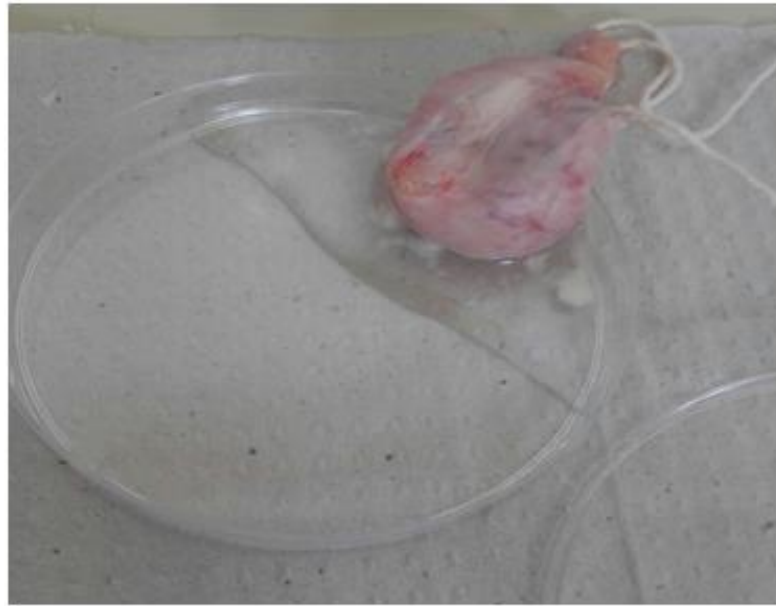
Fonte: Rique, 2017.

#### 4.6 Delineamento Experimental

Após formação do *pool*, realizou-se a avaliação da motilidade subjetiva. Amostras com motilidade mínima de 50% foram utilizadas neste estudo. Todos os grupos foram diluídos em TRIS (3,605g Tris; 2,024g ácido cítrico; 1,488g ou 2,976g de frutose; 100 mL de água bidestilada) para a formação dos diferentes grupos experimentais:

- ✓ GC (Grupo controle): TRIS com 1,488g de frutose + 20% de gema de ovo;
- ✓ G5: TRIS com 1,488g de frutose + 5% do extrato bruto de AV não regadas;
- ✓ G10: TRIS com 1,488g de frutose + 10% do extrato bruto de AV não regadas;
- ✓ G20: TRIS com 1,488g de frutose + 20% do extrato bruto de AV não regadas;
- ✓ GF5: TRIS com 2,976g de frutose + 5% do extrato bruto de AV não regadas;
- ✓ GF10: TRIS com 2,976g de frutose + 10% do extrato bruto de AV não regadas;
- ✓ GF20: TRIS com 2,976g de frutose + 20% do extrato bruto de AV não regadas.

Figura 16. Recuperação dos espermatozoides epididimários por técnica de flutuação



Fonte: Rique, 2017.

A diluição média final foi de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Posteriormente, os grupos foram acondicionados em tubos plásticos de 1,5 mL e submetidos à curva de refrigeração por 2 horas, até alcançar  $5^\circ\text{C}$ . Em seguida, alíquotas de  $10\ \mu\text{L}$  de cada grupo foram utilizadas para avaliação subjetiva de motilidade e teste hiposmótico (HOST) e  $25\ \mu\text{L}$  foi utilizado para a avaliação com o corante Eosina-Nigrosina (EN) nos momentos imediatos de diluição e ao alcançar  $5^\circ\text{C}$ .

O experimento foi realizado três vezes e as avaliações foram realizadas em duplicata. Em todas as repetições foi realizada avaliação da morfologia espermática a fim de subtrair a porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada dos resultados obtidos na avaliação de funcionalidade de membrana plasmática.

## **4.7 Análise Espermática**

### **4.7.1 Motilidade espermática**

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 ( $10\ \mu\text{L}$ ) 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).



#### 4.7.2 Teste de integridade da membrana plasmática

Para este teste foi empregada dupla coloração (Figura 17) com os corantes eosina e nigrosina (CBRA, 2013). Para esta técnica foram diluídos 25  $\mu\text{L}$  de cada grupo experimental em solução contendo 50  $\mu\text{L}$  do corante e 25  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica. Após a diluição, foi realizado o estiramento com 10  $\mu\text{L}$  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).

Figura 17. Dupla coloração Eosina-Nigrosina para análise de integridade de membrana plasmática espermática

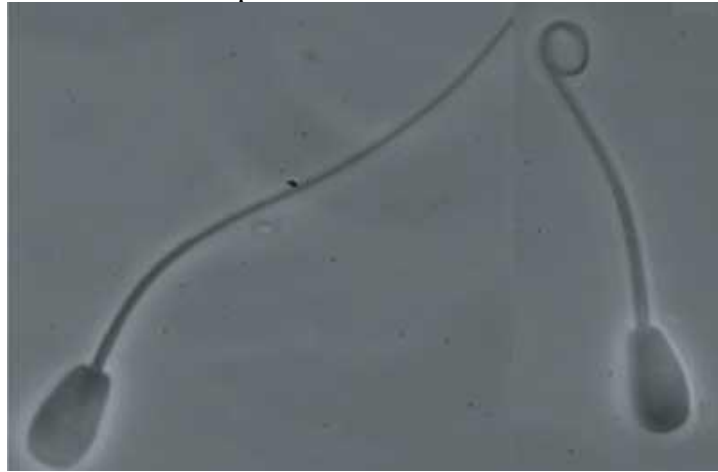


Fonte: <http://www.cvsanfernando.com/wp-content/uploads/criadero2.jpg>

#### 4.7.3 Teste de funcionalidade da membrana plasmática

O teste hiposmótico (*HOST*) visa avaliar a funcionalidade da membrana plasmática baseando-se nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular (CBRA, 2013). Foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de cada grupo diluído em 100  $\mu\text{L}$  de solução hiposmótica (50 mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ ), composta por citrato de sódio e água destilada. A solução foi incubada a 37  $^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Após a incubação foram colocados 50  $\mu\text{L}$  de solução formol-salina para parar a reação osmótica dos espermatozoides. O HOST foi avaliado colocando 10  $\mu\text{L}$  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 (Figura 18) (FAGUNDES et al., 2010).

Figura 18. Teste de funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários bovinos



Fonte: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=01495>

#### 4.7.4 Morfologia espermática

Nesta avaliação utilizou-se o método da Câmara Úmida (CBRA, 2013), onde 10  $\mu\text{L}$  do *pool* foram diluídos em uma solução de formol-salina (1:10). Foram contadas 100 células em microscópio ótico (40x). Este teste foi realizado para contabilizar as anormalidades morfológicas presentes (Figura 19), assim como para diminuir as alterações prévias presentes na cauda em relação ao teste de funcionalidade da membrana (MELO et al., 2005).

Figura 19. Anormalidades morfológicas de espermatozoides



Fonte: <http://www.androfert.com.br/img/Image/Morfologia%20Espermatoz%C3%B3ides.jpg>

#### 4.8 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos dados. Para comparações entre os tempos do mesmo tratamento e

comparações entre os tratamentos em um mesmo tempo foi utilizado o teste ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) pelo software da IBM, SPSS Statistics (versão 18.0 para Windows).

#### 4.9 Teste de Crescimento Microbiológico

Para realização dos ensaios microbiológicos foi preparado o meio de crescimento BDA (batata, dextrose, ágar). A batata é usada como fonte de nutrientes, a dextrose como fonte de açúcar simples e o ágar para solidificar o meio. A tabela 2 mostra os componentes utilizados para um litro de meio de crescimento.

Tabela 2. Composição do meio BDA

Composição	g/L
Batata inglesa	200g
Dextrose	20g
Ágar	20g

As batatas foram lavadas, descascadas, cortadas em fatias finas e cozinhadas em 0,5 litro de água destilada por cerca de 40 minutos até ficarem bem cozinhadas. Após isso, o caldo foi filtrado, acrescentada a dextrose, o ágar e em seguida, autoclavado (Figura 20).

Em seguida o caldo foi aquecido em micro-ondas e distribuído em placas de Petri estéreis, completando-as até sua metade e deixadas em câmara de fluxo laminar até a solubilização (Figura 21).

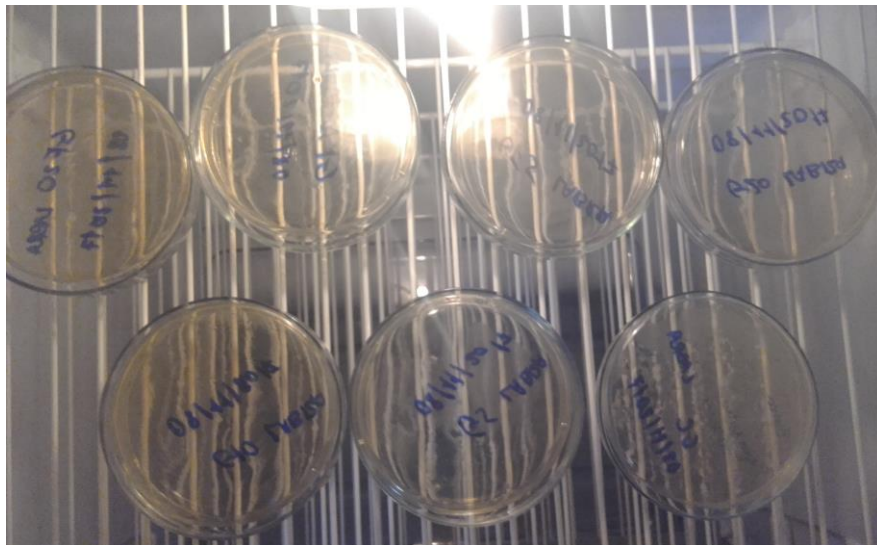
Figura 20. Caldo de crescimento microbiano



Fonte: Autor (2017).

Após a solubilização foram retiradas alíquotas de 50  $\mu$ L de cada grupo experimental 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).

Figura 21. Placas contendo meio de crescimento BDA



Fonte: Autor (2017).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

Observa-se na Tabela 3 os resultados da mensuração do potencial hidrogeniônico do diluidor padrão, à base de tris e gema de ovo, e dos diluidores tris com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose. Nota-se que não houve variação entre o grupo padrão e os grupos com o diluidor com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose independentemente da temperatura.

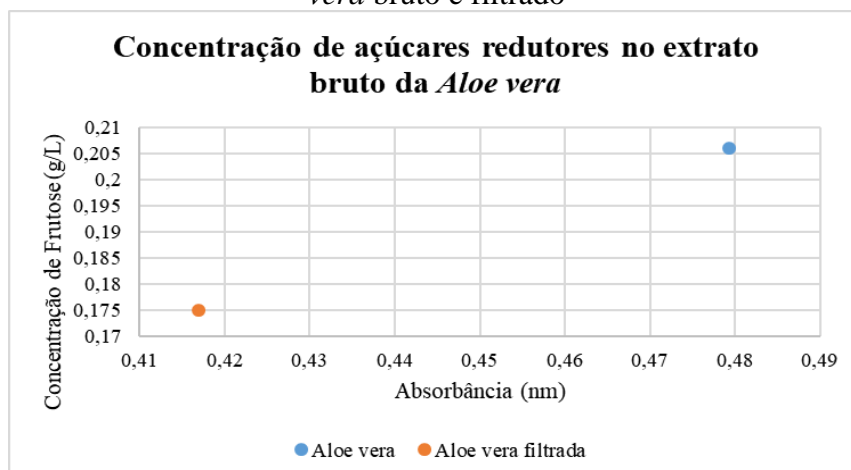
Tabela 3. Valores de pH dos diferentes diluidores nas temperaturas 5 °C e 37 °C

Grupos	pH	
	5 °C	37 °C
Tris-Gema	6,5	6,5
5% <i>Aloe vera</i> + 1488g frutose	6,5	6,5
10% <i>Aloe vera</i> + 1488g frutose	6,5	6,5
20% <i>Aloe vera</i> + 1488g frutose	6,5	6,5
5% <i>Aloe vera</i> + 2,976g frutose	6,5	6,5
10% <i>Aloe vera</i> + 2,976g frutose	6,5	6,5
20% <i>Aloe vera</i> + 2,976g frutose	6,5	6,5

### 5.2 Determinação do Teor de Açúcares Redutores

A figura 22 mostra a média dos açúcares redutores do extrato bruto da *Aloe vera* não filtrado e filtrado, onde nota-se diminuição dos açúcares (glicose e frutose) após a filtração dos extratos.

Figura 22. Quantidade de açúcares redutores (glicose e frutose) presentes no extrato da *Aloe vera* bruto e filtrado



### 5.3 Teste de Viscosidade

Os valores referentes a viscosidade dos diferentes diluidores estão expressos na forma de média e desvio padrão, analisados na Tabela 4 e Tabela 5. Pode-se observar que independente do diluidor, a viscosidade aumentou com a redução da temperatura.

Em plantas mais regadas (Tabela 4), o grupo contendo 20% de *Aloe vera* (G20) na composição mostrou-se mais viscosa ( $P<0,001$ ) do que os demais grupos, obtendo a maior viscosidade a 10 °C. Em contrapartida, os grupos com as menores quantidades de *Aloe vera* (G5, G10, GF5 e GF10) mostraram-se menos viscosos ( $P<0,001$ ), comparados com os grupos nas maiores concentrações de *Aloe vera* (G20 e GF20) e o grupo Tris-gema (GC), independentemente da temperatura.

Tabela 4. Valores da viscosidade do diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato da planta *Aloe vera* regada e frutose nas temperaturas 10 °C e 37 °C

Grupos	Viscosidade <i>Aloe vera</i> regada (cP)	
	T10	T37
GC	3,00±0,33Ab	1,67±0,20Ba
G5	2,34±0,18Ac	0,83±0,17Bb
G10	2,12±0,18Ac	0,89±0,19Bb
G20	3,62±0,42Aa	1,34±0,23Ba
GF5	2,77±0,56Ac	0,99±0,24Ab
GF10	1,52±0,08Ac	0,72±0,21Ab
GF20	2,78±0,23Ab	1,39±0,36Ba

GC= Grupo Controle; 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.

Nas plantas não regadas (Tabela 5), nota-se 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 nas maiores concentrações de *Aloe vera* (G20 e GF20), assim como observado em plantas mais regadas (Tabela 4). 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 5. Valores da viscosidade do diluidor padrão (Tris-gema) e dos diluidores com diferentes concentrações do extrato da planta *Aloe vera* sem regar e frutose nas temperaturas 10 °C e 37 °C.

Grupos	Viscosidade <i>Aloe vera</i> não regada (cP)	
	T10	T37
GC	3,00±0,33 <sup>Abc</sup>	1,67±0,20 <sup>Ba</sup>
G5	3,64±0,14 <sup>Ab</sup>	0,78±0,16 <sup>Bb</sup>
G10	2,57±0,57 <sup>Ab</sup>	0,91±0,11 <sup>Bb</sup>
G20	5,54±1,96 <sup>Aa</sup>	1,08±0,18 <sup>Ba</sup>
GF5	1,47±0,09 <sup>Ad</sup>	0,64±0,14 <sup>Bd</sup>
GF10	1,67±0,07 <sup>Ad</sup>	0,77±0,13 <sup>Bd</sup>
GF20	4,56±2,23 <sup>Ac</sup>	0,97±0,15 <sup>Bc</sup>

GC= Grupo Controle; 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.

## 5.4 Análises espermáticas

### 5.4.1 Motilidade Espermática

Os resultados de motilidade foram expressos na forma de média e desvio padrão e estão expostos na tabela 6. Foi observada diferença ( $P < 0,001$ ) entre os grupos com diferentes concentrações de *Aloe vera* em comparação ao GC, mostrando redução nos parâmetros cinéticos. Porém não foi observado diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tempos de avaliação.

Tabela 6. Porcentual (média ± desvio padrão) de motilidade total subjetiva de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose

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

GC= Grupo Controle; 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 maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os grupos.

### 5.4.2 Teste de Integridade da Membrana Plasmática

Ao analisar a integridade de membrana plasmática de espermatozoides

submetidos à refrigeração (Tabela 7), o percentual de espermatozoides com membranas íntegras se manteve estável ( $P>0,05$ ), mostrando que os grupos com a *Aloe vera* 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.

Tabela 7. Porcentual (média  $\pm$  desvio padrão) de integridade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose

Grupos	Membrana Plasmática Íntegras (%)	
	T0	T2
GC	84,40 $\pm$ 7,68	79,90 $\pm$ 7,49
G5	87,70 $\pm$ 7,56	83,70 $\pm$ 4,96
G10	82,70 $\pm$ 9,23	82,00 $\pm$ 4,62
G20	88,60 $\pm$ 6,80	80,60 $\pm$ 6,40
GF5	87,10 $\pm$ 7,17	86,20 $\pm$ 5,12
GF10	87,30 $\pm$ 2,86	84,10 $\pm$ 4,08
GF20	81,10 $\pm$ 6,34	83,60 $\pm$ 2,88

GC= Grupo Controle; 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.

### 5.4.3 Teste de Funcionalidade da Membrana Plasmática

Assim como observado nos dados de integridade de membrana (Tabela 7), na avaliação de funcionalidade de membrana (Tabela 8), o percentual de espermatozoides com membranas íntegras se manteve estável ( $P>0,05$ ), independente do diluidor e do tempo.

Tabela 8. Porcentual (média  $\pm$  desvio padrão) de funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de bovinos refrigerados com diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose

Grupos	Membrana Plasmática Funcional (%)	
	T0	T2
GC	75,00 $\pm$ 12,18	69,08 $\pm$ 11,92
G5	64,50 $\pm$ 14,43	60,25 $\pm$ 11,67
G10	63,75 $\pm$ 17,30	56,83 $\pm$ 7,79
G20	60,75 $\pm$ 16,11	66,41 $\pm$ 11,67
GF5	63,91 $\pm$ 7,51	57,91 $\pm$ 2,35
GF10	55,33 $\pm$ 12,32	57,41 $\pm$ 9,71
GF20	62,41 $\pm$ 11,67	55,41 $\pm$ 10,59

GC= Grupo Controle; 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.



### 5.5 Teste de crescimento microbiológico

Os resultados referentes a tabela 9 mostram a quantidade de colônias formadas ao decorrer de 24h a 37 °C. O grupo 5% de *Aloe vera* com 2,976g de frutose (GF5; Figura 23E) apresentou efeito antibiótico igual ao diluidor padrão (GC; Figura 23A) com adição de antibiótico. Também, observa-se que o grupo com 10% de *Aloe vera* (G10; Figura 23C) obteve um efeito próximo ao GC, mostrando ação antibiótica, enquanto no grupo com 20% de *Aloe vera* (G20; Figura 23D) não foi observado crescimento após 72 h de refrigeração.

Ainda, observa-se maior presença de micro-organismos nos grupos 10% de *Aloe vera* com 2,976g de frutose (GF10; Figura 23F) e 20% de *Aloe vera* com 2,976g de frutose (GF20; Figura 23G).

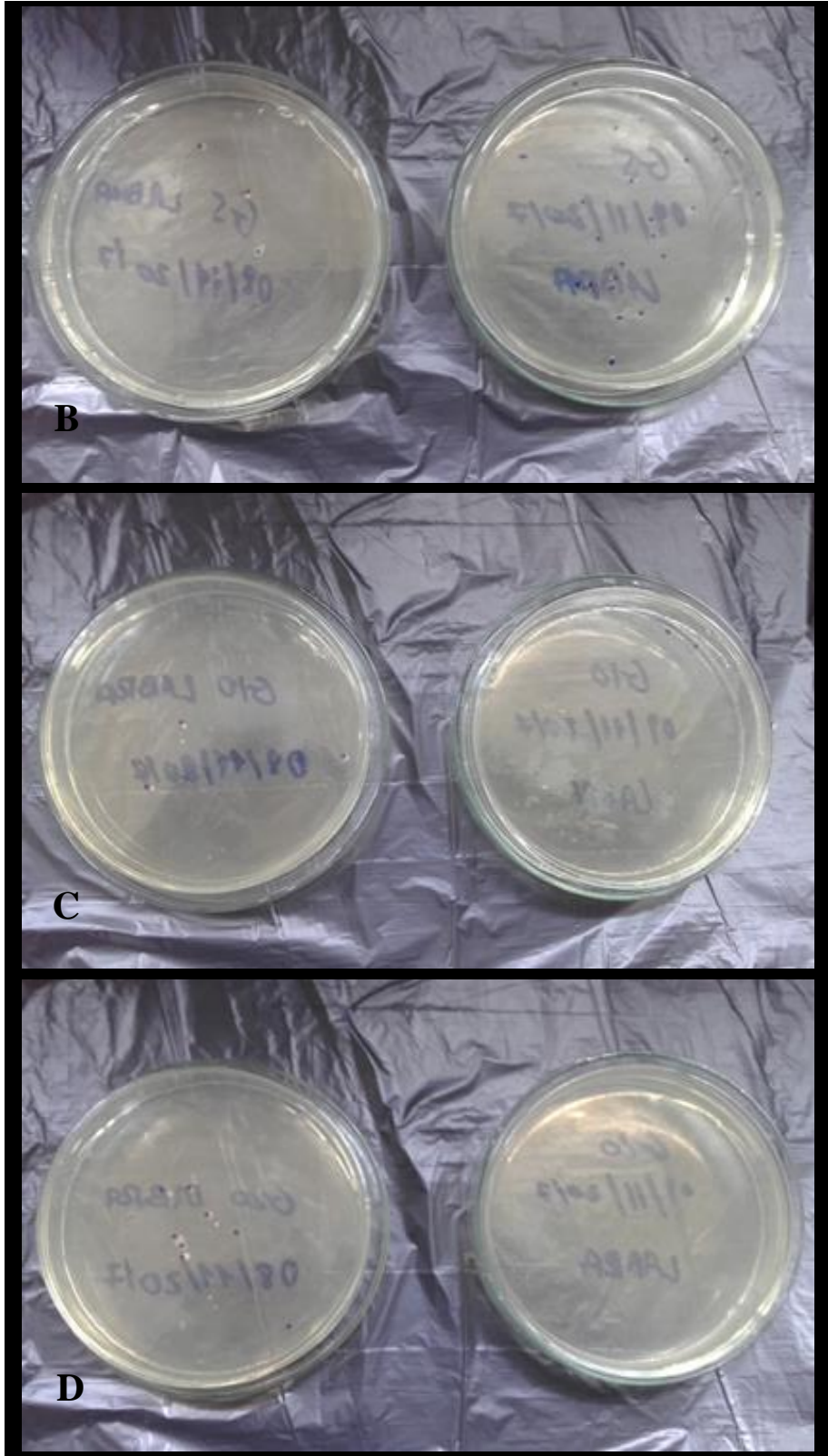
Tabela 9. Efeito antimicrobiológico de diferentes concentrações de *Aloe vera* e frutose

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; 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.

Figura 23. Placas de Petri contendo o meio BDA e os diluidores refrigerados por 48h e 72h, colocados em estufa a 37 °C por 24h







(A) GC=Grupo Controle; (B) G5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); (C) G10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); (D) G20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 1,488g frutose); (E) GF5=Grupo 5% (5% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); (F) GF10=Grupo 10% (10% de *Aloe vera* + 2,976g frutose); (G) GF20=Grupo 20% (20% de *Aloe vera* + 2,976g frutose). T48 (Esquerda)=Refrigeração dos diluidores à 5 °C por 48 horas; T72 (Direita)=Refrigeração dos diluidores à 5 °C por 72 horas.

## 6 DISCUSSÃO

Como observado nos resultados do potencial hidrogeniônico, os diluidores Tris com diferentes concentrações de *Aloe vera* conseguiram manter o pH 6,5, também observado no grupo com diluidor tris-gema, tornando aceitável para o espermatozoide nas diferentes temperaturas de refrigeração.

A congelação dos espermatozoides deve ocorrer na presença de diluidores, adicionados de substâncias crioprotetoras que têm como função minimizar os danos causados pelo choque térmico, manter o pH e a osmolaridade adequada (WOLFE; BRYANT, 2001). Os sistemas tampões devem ser um dos constituintes dos diluidores, para que os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozoides sejam neutralizados, fazendo com que o pH da solução seja mantido próximo à neutralidade (6,8 a 7,1), pH ótimo para os espermatozoides. Os meios tampões mais utilizados nos diluentes para sêmen de bovinos são o citrato e o Tris (BORGES, 2003). 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 de origem animal.

Na avaliação da viscosidade, plantas que foram mais irrigadas apresentam uma viscosidade menor em comparação com plantas não irrigadas. Também 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*.

O interior das folhas da *Aloe vera* é constituído por um tecido parenquimático rico em polissacarídeos, que lhe confere uma consistência viscosa (BACH; LOPES, 2007). Os níveis de polissacarídeos são menores nas plantas bem irrigadas. O processamento das folhas também deve ser feito logo após a colheita, pois o gel oxida rapidamente quando entra em contato com o ar (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2011), apresentando uma coloração amarelada.

Além disso, 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 mostrados. Apesar da viscosidade aparentemente mais alta na maioria dos grupos contendo a *Aloe vera* do que no grupo controle, os grupos com a presença do extrato da *Aloe vera* apresentam uma viscosidade próxima do grupo controle, proporcionando um ambiente

próximo ao diluidor tris-gema.

Verificou-se diminuição da motilidade nos grupos tratados com a *Aloe vera*. A motilidade é uma característica importante para a célula espermática, pois esta deve ser capaz de se locomover até o sítio da 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 congelação 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 et al. (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; KATZ, 2005), suíno (CORCINI et al., 2011) e equino (FILHO et al., 1999) 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 5 minutos *in vivo*, mas pode demorar entre 20 a 30 minutos *in vitro* (OWEN; KATZ, 2005), apresentando comportamento pseudoplástico, onde a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de deformação (HOLDSWORTH, 1971). O extrato da *Aloe vera* mostra um comportamento pseudoplástico, devido a presença de mananas no gel (YARON, 1993) que são polissacarídeos de armazenamento (YAWEI 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; MURTHY, 2013).

A diminuição da motilidade observada neste experimento pode ser atribuída à ação da viscosidade que o extrato da *Aloe vera* não regada apresentou em baixas temperaturas associada a 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 biológicas de células de espermatozoides durante o processo de conservação pelo frio (TUNCER et al., 2011). Desta forma, a adição de substâncias antioxidantes, que são qualquer substância que retarde,

previna, regule, iniba e/ou elimine, de forma direta ou indireta, os danos ou agentes oxidativos, podem contribuir para a sobrevivência das células espermáticas durante a criopreservação (FARRÁS, 2015). Quimicamente, a *Aloe vera* é caracterizada pela presença de compostos fenólicos de grande poder antioxidante (VERA et al., 2005). Essa composição rica da *Aloe vera* pode ter garantido a proteção da membrana plasmática, mantendo os parâmetros, sendo uma das características indispensáveis para um bom crioprotetor.

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 ao sêmen, 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.

Não foi observado um crescimento microbiológico no grupo 5% de *Aloe vera* com 2,976g de frutose, apresentando efeito antibiótico igual ao diluidor padrão com adição de antibiótico, como também o grupo com 10% de *Aloe vera* obteve um efeito próximo ao GC, demonstrando ação antibiótica, enquanto no grupo com 20% de *Aloe vera* não foi observado crescimento após 72 horas de refrigeração.

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.

Estudos estruturais sobre polissacarídeos de gel de *Aloe vera* mostraram que o gel é composto por pelo menos quatro glucomanas parcialmente acetilados, sendo polímeros lineares sem ramificação e com 1,4 ligações glicosídicas com glicose e manose na proporção de 1:2:8 (AHLAWAT; KHATKAR, 2011). Quando dissolvido, a manana isolada da polpa fresca produz uma solução muito viscosa (YAWEI et al., 2004).

Como observado neste estudo, o extrato da *Aloe vera* pode ser uma alternativa para composição de diluidores de origem vegetal, porém há a necessidade de pesquisas para que sejam realizados ajustes na composição do diluente em estudo. O controle da irrigação

poderia auxiliar na padronização da composição do gel (YARON, 1993), também a seleção de plantas entre quatro a cinco anos de idade e folhas mais baixas, que geralmente são as mais antigas e as mais ricas em princípios ativos (MOLEZZI; ALBEDAÑO, 2002). Outros estudos apontam o pré-tratamento do gel para a diminuição da viscosidade. Gowda et al. (1979) observaram que o tratamento alcalino do glucomanana acetilado faz com que o manana se torne insolúvel e perca a capacidade de formar uma solução viscosa, pois uma vez extraídos da planta, suas características viscosas se degradam rapidamente (AHLAWAT; KHATKAR, 2011), mostrando que é possível reduzir a viscosidade do extrato.

## 7 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

AHLAWAT, K. S.; KHATKAR, B. S. Processing, food applications and safety of aloe vera products: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, p.525–533, 2011.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

BACH, D.B.; LOPES, M. A. Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (Aloe vera L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1136-1144, 2007.

BARBOSA, L. M.; KANAZAWA, M. Y.; PERES, A. R.; SOUZA, F. F. Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo de touros post-mortem. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, Suplemento 1, p. 14, 2012.

BARREIROS R. C.; BOSSOLAN G.; TRINDADE C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**. v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BARRETO, L. V.; FEITOSA M. S. C. A.; ARAÚJO, J. T.; CHAGAS, K. F.; COSTA, K. L. Acción antimicrobiana in vitro de dentífricos conteniendo fitoterápicos. **Avances En Odontostomatología**. v. 21, n. 4, p. 195-201, 2005.

BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v. 9, Issue 11, n. 1, p. 2187–2199, 1994.

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira** (UFG. Impresso), v. 14, p. 522-536, 2013.

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do semen bovino**. 2003. 73 f. Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Tese) – Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa-MG. 2003.

BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H.

Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 303-314, 2011.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; BASPINAR, N.; TASPINAR, M.; ÇOYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P. P.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROGLU, A.; ÖZTUNA, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, p. 248-253, 2010.

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

CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal: manual de orientação**. Belo Horizonte, 2013.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

CHIRINÉA, V.H. **Efeito do meio de congelamento sobre as características morfofuncionais do sêmen canino**. 2004. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo. 2004.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v. 1, cap. 6, p. 339-432.

CORCINI, C.D. et al. Comparação de diferentes diluentes na mensuração da concentração espermática de suínos em espectrofotômetro. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.1, p.1965-1968, 2011.

CORADIN, E. M. **Sêmen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos**. 2011. 35 f. Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Seminário), Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia-GO, 2011.

DE KRETZER, D. M.; TEMPLE-SMITH, P. D.; KERR, J. B. Anatomical and functional aspects of the male reproductive organs. In **Disturbances in Male Fertility** (ed. K. Bandhauer & J. Frick), p. 1-131, 1982.

DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREET, J. W.; CROWE, J. H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432–437, 1993.

ELOY, Y. R. G. **Caracterização Físico-Química e Estrutural De Polissacarídeos Obtidos de Folhas da Planta Aloe barbadensis Miller e Avaliação de suas Atividades Antiviral e Anti-Hemorragica**. 2012. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará – UFCe. 2012. 187 p.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.243-255, 1993.

FAGUNDES, B.; TILBURG, M. F. V.; SILVA, J. F. S.; SHIMOYA, A.; BARRETO, M. A. P.; FERREIRA, V. M. Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.273-278, 2010.

FOOTE, R.H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. **Journal of Andrology**, v.3, p.85-100, 1982.

FREITAS, V.S.; RODRIGUES, R.A.F.; GASPI, F.O.G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, v.16, n.2, p.299-307, 2014.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 160-170, 2011.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. Cap. 7, p.97-140.

GASTAL, G. D. A. **Xantana como aditivo crioprotetor externo para congelamento de sêmen ovino**. 2012. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas-RS. 2012.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. The saga of the germ line. In: \_\_\_\_\_. **Developmental Biology**, ed. 11. 2010. Cap. 19, p. 523-554.

GONZÁLEZ, F.H.D. Endocrinologia Reprodutiva do Macho – In: \_\_\_\_\_. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Laboratório de Bioquímica Clínica Animal. Porto Alegre, 2002. Cap. 4, p. IV-1-IV-13.

GOWDA, D. C.; NEELISIDDAIAH, B.; ANJANEYALU, Y. V. Structural studies of polysaccharides from *Aloe vera*. **Carbohydrate Research**. v. 72, p. 201–205, 1979.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion sêmen and ist relation to fertily. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.119-130, 1996.

GRIFFIN, J.E. Male reproductive funtion. In: GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R (Eds.). **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, p.165-185, 1988.

HINTON, B. T. What does the epididymis do and how does it do it?. In: The American Society of Andrology. **Handbook Of Andrology**. ed. 2, p. 10-1–10-5, 2010.

HIRAI, M., CERBITO, W.A., WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B., BRAUN, J., LEIDL, W., OHOSAKI, 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, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products, **Journal of Texture Studies**, vol. 2, p. 393–418, 1971.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1/3, p. 2-22, 2000.

JUNIOR, A. M.; FEITOSA, F.L.F. Semiologia do sistema reprodutor masculino. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária – a arte do diagnóstico**. Ed. Roca. 3ª. ed. 2014. Cap. 8, p. 401-425.

KASTELIC, J. P.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. Novos métodos de avaliação da capacidade reprodutiva de touros. In: BARBOSA, R. T.; ESTEVES, S. N.; BARBOSA, P. F. **Intensificação da bovinocultura de corte: estratégias de manejo reprodutivo e sanitário**. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, p.41-57, 1997.

LAD, V. N.; MURTHY, Z. V. P. Rheology of Aloe barbadensis Miller: A naturally available material of high therapeutic and nutrient value for food applications. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 279–284, 2013.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 279-286, 2011.

LIMA, D. S.; CARDOSO, J. F. S. 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.

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

MARQUES FILHO, W. C. Espermatogênese em bovinos. 2006. 25 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia)** - Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, Botucatu 2006.

MARTINS, C.F., RUMPF, R., PEREIRA, D.C., DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, p. 326–331, 2007.

MARTINS JÚNIOR, A.; FEITOSA, F. L. F. Semiologia do Sistema Reprodutor Masculino. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a Arte do Diagnóstico**. 2ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 8, p. 399-425.

MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; BORRELI, F.; CAPASSO, F. Healing powers of aloes. In: Reynolds, t. **Aloes: the genus aloe**. Ed. 3. CRC Press, 2004. Cap. 9, p. 222-251.

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

MELO, C. C. S. **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, C. C. S. **Avaliação da eficácia dos diluidores tris ou água de coco em pó (ACP-106), associado à Aloe vera (Aloe barbadensis Miller), na conservação de sêmen canino**. 2015. 89 f. Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Agropecuária (Tese), Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife-PE, 2015.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MELO-MACIEL M. A. P.; LEITE, L. V.; LEITE, J. S.; OLIVEIRA, M. S.; ALMEIDA, P. S.; NUNES, J. F.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Aloe vera na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)**, v. 67, p. 945-949, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-429, 1959.

MOLEZZI, A.; ALBEDAÑO, A. Fitomedicina: usos más comunes en Dermatología. **Dermatología Argentina**. v. 8, n. 3, p. 123-131, 2002.

MONREAL, A. C. D.; LIMA, N. N.; SOUZA, A. S.; SOUZA, M. I. L.; CARAMALAC, S. M.; CARAMALAC, S. M.; URT, M.A.G. Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida. **Agrarian (Dourados. Online)**, v. 7, p. 124-131, 2013.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. et al. Reprodução Humana. In: \_\_\_\_\_ . **Embriologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elviesier, 2013. Cap. 2, p. 6-20.

MOTA FILHO, A. C.; SILVA, H. V. R.; FREITAS, L. A.; NUNES, T. G. P.; ARAÚJO, A. A.; SILVA, L. D. M. Refrigeração do epidídimo canino a 4 °C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 9, p. 1155-1160, 2013.

MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equínos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.3, p.62-68, 2006.

MURGAS, L.D.S.; ZANGERÔNIMO, M.G.; SANTOS, A. G. O.; OLIVEIRA, S. L. Oxitocina no Sêmen Suíno Heterospermico Resfriado à 15 °C. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 33-40, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carboidratos e Glicobiologia. In: \_\_\_\_\_. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 7, p. 243-280.

OBENG, M. K.; MOTYKIE, G. D.; DASTGIR, A; McCAULEY, R. L.; HEGGERS, J. P. Healing powers of aloes. In: Reynolds, t. **Aloes: the genus aloe**. Ed. 3. CRC Press, 2004. Cap. 11, p. 264-277.

OSORIO, J.P. **Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade in vitro pós-descongelamento do espermatozoide equino**. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte - MG.

OWEN, D. H.; KATZ, D. F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 459–469, 2005.

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

PIVA, S.; DONIDA, L. G. Dosagem da frutose espermática: método simplificado. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 12, n. 1/4, p.43-47, 1980.

REYNOLDS, T. Aloe chemistry. In: \_\_\_\_\_. **Aloes: the genus aloe**. Ed. 3. CRC Press, 2004. Cap. 3, p. 54-89.

RODRÍGUEZ-GONZALES, V.M. et al. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Polymers**, v.86, n.4, p.1675-83, 2011.

ROBERTS, K. P. What are the components of the male reproductive system? In: The American Society of Andrology. **Handbook Of Andrology**. ed. 2, p. 1-1-1-5, 2010.

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

SAVI, P.A.P.; MOTHEO, T.F.; PADILHA-NAKAGI, L.C.; PIRES-BUTTLER, E.A.; VICENTE, W.R.R. Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. **Investigação**, v.44, n.1, p18- 22, 2015.

SATHE, S.; SHIPLEY, C.F. Applied andrology in sheep, goats and selected cervids. In: P.J. Chenoweth, S. Lorton (Eds.) **Animal Andrology: Theories and Applications**. p. 226-253, 2014.

SILVA, A. E. D. F.; DIAS, A. L.; UNANIAN, M. M.; FREITAS, A. R.; BLOCH JUNIOR, C. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1890-1900, 2003.

SILVA FILHO, J.M.; VALLE, G.R.; VIANA, W.S.; VIANNA, L.R.; PALHARES, M.S. Utilização de manequim para coleta de sêmen equino e sua influência sobre características reprodutivas do garanhão **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.51, n.5, 1999.

SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 614-620, 1972.

SURJUSHE, A.; VASANI, R.; SAPLE, D. G. Aloe Vera: A Short Review. **Indian Journal of Dermatology**. v.53, n.4, p. 163-166, 2008.



TRALDI, A.S., Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – **Manual técnico. Texto apostilado**, 1994.

TUNCER, P. B., SARIÖZKAN, S., BUCAK, M. N., ULUTAS, P. A., AKALIN, P. P., BÜYÜKLEBLEBICI, S., CANTURK, F. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. **Theriogenology**, v. 75, p. 1459–1465, 2011.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; HARING, R. M.; KAALLANSBERGEN, L. M. T. E.; DEN DAAS, J. H. G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, v. 54, p. 57-67, 2000.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

WALLER, T. A.; PELLELY, R. P.; STRICKLAND, F. M. Industrial processing and quality control of Aloe barbadensis (Aloe vera) gel. In: Reynolds, t. **Aloes: the genus aloe**. Ed. 3. CRC Press, 2004. Cap. 8, p. 154-220.

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

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

WEIDNER. **Practical Urology: Essential Principles and Practice**, 2011.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

YARON, A. Characterization of Aloe vera gel before and after autodegradation, and stabilization of the natural fresh gel. **Phytotherapy Research**, v. 7, S11-S3, 1993.

ZIRKIN, B. R. What compounds mediate communication within the testis? Where and how are male-associated hormones produced? **Handbook of Andrology**. ed. 2, p. 4-1–4-4, 2010.

## GLOSSÁRIO

<i>Aloe vera</i>	Planta suculenta constituída no interior das folhas por um tecido parenquimatoso
<b>Andrógenos</b>	Hormônios esteroides da classe dos hormônios sexuais masculinos
<b>Centrifugação</b>	Separação pela força centrífuga
<b>Crioprotetor</b>	Qualquer substância que ofereça energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada
<b>Ejaculado</b>	Flexão de ejacular. Libera o sêmen em um ato sexual.
<b>Epididimário</b>	Provenientes do epidídimo
<b>Extrato</b>	Substância solúvel e concentrada que se extraiu de uma planta
<b>Fertilização</b>	Consiste na junção de gametas que originam o zigoto
<b>Forças Intermoleculares</b>	Diferentes formas de interação (aproximação) entre moléculas formadas por ligações covalentes
<b>Frutose</b>	Açúcar presente nas frutas
<b>Gonócitos</b>	Célula reprodutora masculina inicial
<b>Haploide</b>	Possui n cromossomo (metade de um ovo fecundado)
<b>Liquefação</b>	Transição de uma substância que se encontra no estado gasoso ou sólido para o estado líquido
<b>Monossacarídeo</b>	Carboidratos simples com apenas uma molécula de açúcar
<b>Motilidade</b>	Competência para se mover; mobilidade
<b>Osmolaridade</b>	Número de partículas de soluto contidas num volume
<b>Parenquimático</b>	Relativo ao parênquima; Parenquimatoso
<b>Permeabilidade</b>	Qualidade dos corpos que se deixam atravessar
<b>Polissacarídeo</b>	Compostos por grande quantidade de moléculas de monossacarídeos (açúcares simples)
<b>Pseudoplástico</b>	Fluido não-newtoniano onde a viscosidade diminui com o aumento da tensão de corte (ou de cisalhamento)
<b>Reologia</b>	Estudo das deformações e escoamentos das matérias
<b>Viscosidade</b>	Propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento

## ANEXO I - PREPARAÇÃO DOS DILUIDORES

Preparação para 100 mL de Tris

COMPONENTES	QUANTIDADE
Tris	3,605g
Ácido cítrico	2,024g
Frutose	1,488g
Água bidestilada	100 mL

Preparação para 100 mL de Tris Teste

COMPONENTES	QUANTIDADE
Tris	3,605g
Ácido cítrico	2,024g
Frutose	2,976g
Água bidestilada	100 mL

Preparação para 100 mL do diluidor padrão Tris-Gema

COMPONENTES	QUANTIDADE
Tris	80 mL
Gema de ovo	20 mL
Antibiótico	3 mg

## ANEXO II - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA OS TESTES

Preparação para 250 mL de DNS

COMPONENTES	QUANTIDADE
ácido 3,5 dinitrossalicílico	2,5g
NaOH (2N)	50 mL
Água destilada	200mL
Sal de Rochelle	75g

Preparação para 50 mL de Eosina-Nigrosina

COMPONENTES	QUANTIDADE
Eosina	0,5g
Nigrosina	2,5g
Citrato de sódio	1,5g
Água destilada	50 mL

Preparação para 100 mL de Solução Hiposmótica (50 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O)

COMPONENTES	QUANTIDADE
Citrato de sódio	0,464g
Água destilada	100 mL