



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

ANDRÉ LUIZ PEREIRA TORK

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE HIBISCO
(*Hibiscus sabdariffa*) EM ESPERMATOZOIDES CAPRINO
PÓS-DESCONGELAÇÃO**

JOÃO PESSOA

2018

ANDRÉ LUIZ PEREIRA TORK

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE EXTRATO DE HIBISCO
(*Hibiscus sabdariffa*) EM ESPERMATOZOIDES CAPRINO
PÓS-DESCONGELAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Disciplina “Trabalho de Conclusão de Curso”, do
Bacharelado em Biotecnologia da Universidade
Federal da Paraíba, como pré-requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

T683e Tork, André Luiz Pereira.

Efeito da utilização de extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) em espermatozoides caprino pós-descongelamento / André Luiz Pereira Tork. - João Pessoa, 2018.

42 f. : il.

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

1. Criopreservação. 2. Bioativos. 3. Malvacea. I. Silva, Sildivane Valcácia. II. Título.

UFPB/BC

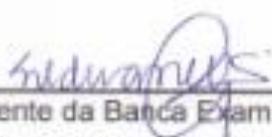


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos trinta dias do mês de outubro de 2018, às 16:00h, 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 Dra. Sildivane Valcácia Silva e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida (CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (CBIOTEC/UFPB), o discente André Luiz Pereira Tork, matrícula 11402053, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Efeito da utilização de extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) em espermatozoides caprino pós-descongelamento**, 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 pelo discente.



Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 30 de outubro de 2018.

Dedico este trabalho às minhas famílias: aquela em que eu nasci fisicamente, mãe, pai e irmão; aquela que eu nasci academicamente, minha turma e professores; e aquela em que nasci socialmente, aqueles que me apoiam e me dão forças, a quem eu posso chamar de amigos.

RESUMO

O processo de criopreservação causa efeitos deletérios para a célula devido à grande produção de espécies reativas de oxigênio e o hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) é um arbusto de ciclo anual, pouco ramificado e com flores na forma de taça vermelha, possui potencial tanto antioxidante quanto antibiótico, tornando o extrato de hibisco um potencial aditivo no processo de criopreservação. O objetivo deste trabalho foi testar diferentes extratos de hibisco, metanólico e etanólico, em diferentes concentrações, nas células espermáticas descongeladas de reprodutores caprinos nos períodos de zero e duas horas pós-descongelação. Após a descongelação do sêmen, foi formado um *pool* para evitar a interferência individual, e este *pool* foi fracionado em cinco alíquotas, de modo que cada uma, ao ser adicionada ao extrato, formassem diferentes porcentagens: GC (grupo controle; sem a adição de extrato); M5 (grupo com 5% de adição do extrato metanólico; 190 μ L de sêmen e 10 μ L de extrato); M10 (grupo com 10% de adição do extrato metanólico; 180 μ L de sêmen e 20 μ L de extrato); E10 (grupo com 10% de adição do extrato etanólico; 180 μ L de sêmen e 20 μ L de extrato); E15 (grupo com 15% de adição do extrato etanólico; 170 μ L de sêmen e 30 μ L de extrato). Foram analisados os padrões cinéticos das células espermáticas (motilidades subjetiva e objetiva), verificadas a integridade de membrana plasmática, pela dupla coloração com eosina-nigrosina, assim como a funcionalidade da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST). Quanto a integridade da membrana plasmática no primeiro tempo de análise (0h), o GC apresentou resultados superiores ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos E10 e E15; o Grupo M10 também diferiu ($p < 0,05$) dos grupos E10 e E15, que apresentaram mais espermatozoides com membrana lesada; os grupos M5 e E10 diferiram ($p < 0,05$) do grupo E15, que apresentou menores resultados de integridade. Duas horas após a incubação, o GC apresentou resultados superiores ($p < 0,05$) a todos os grupos contendo hibisco (M5, M10, E10 e E15), enquanto que o grupo M10 apresentou resultados intermediários, diferindo ($p < 0,05$) dos grupos GC e E15. No HOST, o GC apresentou-se superior ($p < 0,05$) ao grupo E15 no primeiro tempo de avaliação; na análise de 2h foi observada diferença entre o GC e os grupos E10 e E15, que apresentaram menores valores, além disso, foi vista diferença ($p < 0,05$) entre os grupos M10 e E15, sendo o E15 o grupo que apresentou menores valores de funcionalidade. Para os parâmetros de motilidade total (MT) e progressiva (MP) observou-se redução ($p < 0,05$) para o GC entre os dois tempos de avaliação, o que não foi observado nos grupos acrescidos do extrato de hibisco. Houve, ainda, redução ($p < 0,05$) na velocidade curvilínea (VCL) no grupo M5, entre os dois tempos avaliados. Não foram observadas interferências do extrato para os demais parâmetros avaliados. Baseado no exposto, é possível inferir que apesar do dano a membrana do espermatozoide dependendo do solvente, o extrato de hibisco preserva a motilidade espermática durante o período pós-descongelação. Desta forma, a utilização de sêmen acrescido de hibisco pode ser benéfica para a fertilização e utilização em programas de inseminação artificial.

Palavras chave: Criopreservação, bioativos, malvácea

ABSTRACT

The hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) is an annual, little branched shrub with flowers in the shape of a red beaker, has both antioxidant and antibiotic potential. The cryopreservation process causes deleterious effects to the cell due to the large production of reactive oxygen species, making the hibiscus extract a potential ally in the this process. The objective of this work was to test different extracts of hibiscus, methanolic and ethanolic, in different concentrations, in the thawed sperm cells of goat in the immediate period and two hours after incubation. After thawing of the semen, a pool was formed to avoid individual interference, and this pool was fractionated in five aliquots, so that each one, when added to the extract, formed different percentages: GC (control group; extract); M5 (group with 5% addition of the methanolic extract, 190 μL of semen and 10 μL of extract); M10 (group with 10% addition of the methanolic extract, 180 μL of semen and 20 μL of extract); E10 (10% addition of ethanolic extract, 180 μL of semen and 20 μL of extract); E15 (group with 15% addition of the ethanolic extract, 170 μL of semen and 30 μL of extract). The kinetic patterns of sperm cells (subjective and objective motility), plasma membrane integrity verification, by staining with eosin-nigrosin, as well as the functionality of the plasma membrane by the hyposmotic test (HOST) were analysed. Regarding the integrity of the plasma membrane in the first analysis time (0h), the GC presented superior results ($p < 0.05$) when compared to the groups E10 and E15; Group M10 also differed ($p < 0.05$) from groups E10 and E15, which presented more spermatozoa with damaged membrane; the groups M5 and E10 differed ($p < 0.05$) from the E15 group, which presented lower integrity results. Two hours after incubation, GC presented superior results ($p < 0.05$) to all groups containing hibiscus (M5, M10, E10 and E15), whereas the M10 group presented intermediate results, differing ($p < 0.05$) of the GC and E15 groups. In the HOST, the GC was superior ($p < 0.05$) to the group E15 in the first evaluation time; in the 2h analysis, a difference was observed between the GC and the E10 and E15 groups, which presented lower values; in addition, a difference ($p < 0.05$) was observed between the M10 and E15 groups, E15 being the group that presented lower values of functionality. For the parameters of total (MT) and progressive (MP) motility, there was a reduction ($p < 0.05$) for the GC between the two evaluation times, which was not observed in the groups with hibiscus extract. There was also a reduction ($p < 0.05$) in the curvilinear velocity (LCV) in the M5 group, between the two times evaluated. No interference from the extract was observed for the other parameters evaluated. Based on the above, it is possible to infer that despite damage to the membrane of the cell depending on the solvent, the hibiscus extract preserves the sperm motility during the post-thaw period. In this way, the use of semen plus hibiscus may be beneficial for fertilization and use in artificial insemination programs.

Key words: Cryopreservation, bioactive, malvaceae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Flor de hibisco	25
Figura 2	Dupla coloração Eosina-Nigrosina, integridade de membrana	30
Figura 3	Teste de funcionalidade da membrana plasmática	30
Figura 4	Sperm Class Analyzer (SCA/CASA)	31
Figura 5	Campo de avaliação da motilidade espermática	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Motilidade total de espermatozoides caprinos descongelados com adição ou não de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos avaliação
- Tabela 2 Integridade e funcionalidade da membrana de espermatozoides caprinos com adição ou não de diferentes extratos de hibisco e concentrações pós-criopreservação
- Tabela 3 Motilidade total e progressiva de espermatozoides caprinos com adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações pós-criopreservação
- Tabela 4 Valores absolutos da cinética de espermatozoides caprinos descongelados com adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos avaliação
- Tabela 5 Perfil cinético e hiperativação de espermatozoides caprinos descongelados com adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos avaliação
- Tabela 6 Perfil de trajetória de espermatozoides caprinos descongelados com adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos avaliação

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERO	Espécie reativa de oxigênio
IA	Inseminação artificial
pH	Potencial hidrogeniônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tes	N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid
HOST	Teste hiposmótico
MT	Motilidade Total
MP	Motilidade Progressiva
VCL	Velocidade Curvilínea
VAP	Velocidade média do percurso
VSL	Velocidade linear progressiva
STR	Retilinearidade
LIN	Linearidade
WOB	Wobble coefficient (índice de oscilação)
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento flagelar cruzado
IH	Índice de hiperativação
PI	Iodeto de Propídeo
PBS	Solução tampão fosfato-salina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
	2.1. Caprinocultura	13
	2.2. Características do Sêmen Caprino	15
	2.3. Criopreservação e Inseminação Artificial	16
	2.4. Diluidores Espermáticos	18
	2.5. Oxidantes e Antioxidantes	19
	2.6. Hibisco	20
3	OBJETIVOS	23
	3.1. Objetivo Geral	23
	3.2. Objetivos Específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
	4.1. Localização e Período do Experimento	24
	4.2. Sêmen	24
	4.3. Obtenção do Extrato	24
	4.4. Avaliação Pós-descongelação	25
	4.5. Formação dos Grupos Experimentais	25
	4.6. Avaliação do Sêmen	25
	4.6.1. Motilidade subjetiva	25
	4.6.2. Teste de integridade da membrana plasmática	26
	4.6.3. Teste de funcionalidade da membrana plasmática	26
	4.6.4. Análise cinética (Computer Assisted Sperm Analyzer - CASA)	27
	4.7. Análise Estatística	28
5	RESULTADOS	29
6	DISCUSSÃO	32
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS	36
	GLOSSÁRIO	41

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade em grande expansão. De acordo com Nóbrega (2016), a produção e consumo de produtos derivados da caprinocultura tende a aumentar, a longo prazo, seja por fatores como o crescimento natural da população e da renda, seja pela organização destes setores para expandir seus mercados, dado o seu potencial. Segundos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), a caprinocultura brasileira revelou um aumento em número de cabeças de 1,5%, comparado ao ano anterior.

Nos últimos anos a demanda por produtos de origem animal de qualidade tornou-se cada vez mais visada pelo mercado consumidor, gerando a busca pela produção e processamento de alimentos cada vez mais elaborados e com certificação de qualidade (COSTA; QUEIROGA; PEREIRA, 2009). Em auxílio à produção derivada da pecuária, a criopreservação de sêmen é uma biotécnica reprodutiva importante, tendo em vista que promove a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado. Tal biotécnica, quando associada à inseminação artificial, representa um mecanismo eficiente para promoção e difusão de material genético de excelente qualidade e conseqüentemente melhores produtos. A criopreservação do sêmen ainda proporciona uma economia para o produtor ao reduzir os custos com alimentação e transporte dos reprodutores, bem como os riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008). Porém, de acordo com Roy (1957), enzimas presentes no plasma seminal de bodes são afetadas negativamente com a adição de gema de ovo, que atualmente é a base para diluidores espermáticos mais utilizada na criopreservação, esse fato impulsiona estudos em torno da criação diluentes mais específicos e eficientes para criopreservar esse tipo de célula.

Além disso, o processo de criopreservação causa muitos efeitos deletérios para a célula, destacando-se a alta produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas que apresentam alta reatividade e podem causar diversos tipos de danos celulares (OLIVEIRA, 2008). As espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes se encontram em uma condição de equilíbrio, entretanto, quando ocorre o desequilíbrio e uma quantidade excessiva de ERO é liberada, ocorre o estresse oxidativo (ANDRADE et al., 2010). As ERO, em pequenas quantidades, são necessárias para a ação da célula reprodutiva, tais como a capacitação espermática, a hiperativação, reação acrossomal e interações com o oócito (BAKER, 2004), entretanto, o seu excesso pode danificar a membrana plasmática e o material genético, e conseqüentemente, comprometer a reprodução.

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) é um arbusto de ciclo anual, que pode chegar a mais de 1,80m altura. De acordo com Maciel (2012), o interesse econômico neste arbusto encontra-se em seu cálice desidratado, utilizado mundialmente para a produção de conservantes e antioxidantes, relacionados com a presença de antocianinas e polifenóis. Os compostos fenólicos são substâncias que existem principalmente nas plantas, como é o caso do hibisco, mas que podem também ser provenientes do catabolismo dos aminoácidos. Os compostos fenólicos apresentam múltiplas atividades biológicas, tais como: propriedades antitumorais, antimutagênicas, anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes, por protegerem as células contra os danos oxidativos (GUINDANI et al., 2014).

Devido à importância econômica da caprinocultura, faz-se necessário a utilização de biotecnologias aplicadas à reprodução animal, visando o melhoramento dos rebanhos e da qualidade dos produtos gerados. Desta forma, a perspectiva deste trabalho é testar o efeito da adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações na descongelação de sêmen caprino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura

A cabra foi o primeiro animal capaz de produzir alimentos que foi domesticado pelo homem, há cerca de dez mil anos. Desde este tempo, os caprinos acompanharam a história da humanidade, conforme atestam os diversos relatos históricos, mitológicos e até mesmo bíblicos que mencionam estes animais. Apesar disso, poucas vezes teve seu valor devidamente reconhecido (RIBEIRO, 1997).

A pecuária, em função de sua maior capacidade de adaptação à seca, quando comparada às explorações agrícolas, representa uma das mais importantes atividades do agronegócio no semiárido brasileiro e tem se constituído num dos principais fatores para a garantia da segurança alimentar das famílias rurais e geração de emprego e renda. Neste contexto, considerando que 92% do rebanho caprino nacional se concentra na Região Nordeste, fica evidente a importância da caprinocultura para a economia da região (RIET-CORREA et al., 2013). A demanda por produtos caprinos tende a aumentar, devido à globalização da economia e incentivos à produção. Assim, sistemas de produção intensivos tornam-se necessários, exigindo o uso de raças especializadas para o corte ou para o leite.

No nordeste do Brasil, a maioria do contingente caprino é composto por animais sem-raça-definida e de raças nativas, de produção baixa e produtividade antieconômica, sendo indicada a implantação de programas de melhoramento genético para a melhoria dessas raças. Não obstante, a aptidão produtiva e a rentabilidade de um rebanho dependem do seu desempenho reprodutivo (MACHADO et al., 2000). Criadores capacitados vêm desenvolvendo suas atividades, não somente para a produção de carne, leite e pele, mas também na dedicação à criação de animais geneticamente selecionados para reprodução, inclusive destinados à colheita de sêmen ou transferência de embriões (NOGUEIRA; FIGUEIREDO JÚNIOR; YAMAMOTO, 2010).

O caprino, com sua adaptabilidade climática e nutricional, produz carne de aceitabilidade universal, apresentando-se desta forma como uma fonte alimentar proteica com um grande potencial a ser explorado, nos próximos anos. Este potencial justifica-se no fato de que os caprinos, dentre os animais domésticos, apresentam maior capacidade de sobreviver em muitas das regiões mais inóspitas do mundo, devido principalmente à sua resistência ao calor (MADRUGA, 1999). A carne caprina tem grande potencial de consumo

em razão de seu valor nutritivo e de sua aceitabilidade (MADRUGA et al., 2002), considerada uma carne magra e sua composição química está de acordo com as exigências dos atuais consumidores, por sua vez, a carne ovina é mais macia e succulenta. Outra peculiaridade sensorial dessas espécies é o aroma característico. A quantidade de gordura presente na carcaça do animal, a dieta utilizada e o peso vivo ao abate influenciaram os atributos sensoriais e apresentaram correlações altas e positivas entre si. A análise sensorial de carnes reflete a preferência dos consumidores por determinados atributos sensoriais, sendo a maioria desses explicados pela composição de ácidos graxos e substâncias voláteis presentes nas carnes vermelhas (COSTA et al., 2008).

Aproximadamente 1/5 (19,40%) do efetivo mundial de caprinos é de animais voltados para a produção de leite. Já no Brasil, a metade (50,62%) do rebanho caprino é considerada como sendo de produção de leite. Na prática, sabe-se que boa parte destes animais não é especializada na produção leiteira, mas sim, são de dupla ou tripla aptidão, especialmente no semiárido nordestino. Com isso, o rebanho brasileiro de caprinos leiteiros representa 3,09% do rebanho leiteiro mundial (WANDER; MARTINS, 2004). A importância dessa atividade produtiva, particularmente a voltada para a produção de leite, vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas. Tem-se observado um aumento da procura e consumo de leite e seus derivados (principalmente queijos), tanto pelas suas características nutricionais como pela sua excelente digestibilidade, resultando em alimentos de excepcional valor biológico. Aliada a esses, existe o fato de que o leite caprino seja muito procurado para a alimentação de lactentes e crianças que apresentam intolerância ao leite bovino (PRATA et al., 1998).

No Brasil o efetivo de caprinos atingiu 9,61 milhões de cabeças em 2015, representando uma variação positiva de 8,6% em relação a 2014. O Nordeste detém o maior efetivo de caprinos, sendo responsável por 92,7% do total da espécie no país. Em relação a 2014, houve aumento de 9,9% nessa região, com cerca de 800 mil animais a mais na data de referência da pesquisa. Bahia e Pernambuco responderam por mais de 50% do efetivo nacional, com 27,4% e 25,3% do total, respectivamente, seguidos por Piauí (12,8%) e Ceará (11,6%). Esses quatro estados representaram 83,3% do efetivo nacional da espécie (IBGE, 2015).

Apesar do baixo nível tecnológico ainda presente em todo processo produtivo, a caprinocultura de corte no Brasil, principalmente no Nordeste, tem apresentado configurações que a coloca numa posição privilegiada no cenário do agronegócio. Esta condição está respaldada no incremento do consumo interno, em demandas de exportação

de carne e de pele para diversos países, bem como na percepção de oportunidades de negócio que a atividade oferece. Na Região Nordeste, onde se concentram 90% do efetivo de caprinos do Brasil, a maioria das explorações praticam sistemas de produção pouco tecnificados, utilizando animais de descarte, desqualificados para atender as exigências do mercado consumidor em termos de regularidade, qualidade e preço dos produtos cárneos, o que provoca um desequilíbrio entre a oferta e demanda e, conseqüentemente, oscilações de preços. Assim, para que esta atividade seja inserida no agronegócio brasileiro é necessário que se estabeleça uma visão sistêmica, com enfoque de cadeia produtiva, onde todos os atores ou segmentos se articulem de forma coordenada, se contrapondo a uma visão mais conservadora de unidades independentes. Esse enfoque sistêmico deverá estabelecer ações ao longo de toda cadeia, seguindo os padrões de exigência do mercado através da regulamentação da oferta, do preço da qualidade da carne e expansão de novos produtos derivados (SOUSA, 2007).

2.2 Características do Sêmen Caprino

A composição do sêmen varia entre as espécies. O volume e a concentração de espermatozoides no ejaculado variam com a anatomia, como o tamanho do testículo, e atividade reprodutiva ou frequência de ejaculações. Além das variações individuais, fatores como idade, condições climáticas e nutrição podem afetar a quantidade e qualidade do sêmen (MAIA, 2010).

Um problema específico na preservação do sêmen caprino está relacionado ao efeito deletério do plasma seminal na viabilidade dos espermatozoides criopreservados com diluentes contendo gema de ovo e/ou leite desnatado. Uma das explicações seriam a síntese e secreções de uma enzima pelas glândulas bulbo-uretrais liberadas no plasma seminal. Na presença de cálcio, a enzima fosfolipase A atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitina. Esta reação de hidrólise promove uma atividade fusogênica na membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008), desta forma, associada aos componentes dos diluentes comumente utilizados na criopreservação, há a produção de substâncias tóxicas para a célula espermática. Esta condição desfavorável pode ser prevenida por meio da retirada do plasma seminal durante os procedimentos de criopreservação. Além dos fatores inerentes ao ejaculado caprino, o processo de criopreservação de sêmen,

particularmente no estado congelado, causa danos na ultraestrutura, bioquímica e função espermáticas, reduzindo-se a motilidade, a viabilidade e o posterior transporte no trato genital feminino (SILVA et al., 2006).

2.3 Criopreservação e Inseminação artificial

As biotécnicas relacionadas à inseminação artificial evoluíram ao longo dos anos. No início, o sêmen era utilizado *in natura* e apenas fracionado e depositado no fundo da vagina da fêmea, obtendo-se taxas de fertilidade razoável. Surgiu então a necessidade de aumentar a capacidade fecundante dos reprodutores e de conservar o sêmen por um maior período de tempo, dando início a uma nova fase, a da utilização de diluentes e da criopreservação do sêmen.

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado foi revolucionada por Polge e colaboradores em 1949, com a descoberta do glicerol como crioprotetor, o que permitiu que os espermatozoides fossem congelados e armazenados por longos períodos. Esta biotecnologia tem sido de grande importância em programas de melhoramento animal por viabilizar a preservação de material genético de animais em extinção, além de auxiliar a transpor barreiras da infertilidade masculina (CASTILHO et al., 2009).

A partir deste marco, espermatozoides de várias espécies têm sido criopreservados com sucesso. Entretanto, o sucesso da criopreservação de sêmen é apenas parcial, uma vez que cerca da metade dos espermatozoides são destruídos ou danificados pela congelação e descongelação. O processo sofre influência de diversos fatores, entre eles a composição do diluidor, a taxa de diluição e a curva de congelação/dcongelação, e no caso do caprino ainda existem as limitações inerentes à espécie (MAIA, 2015).

A criopreservação do sêmen é um processo complexo, o qual é importante atentar para diversos fatores a fim de obter resultados satisfatórios. Dentre esses fatores, destacam-se a diluição, a criopreservação, descongelação e também a fisiologia do sêmen de cada espécie. 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 (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008).

O sêmen caprino pode ser usado *in natura* (puro ou diluído), refrigerado ou congelado. O sêmen *in natura* e o refrigerado apresentam fertilidade mais elevada, porém de uso restrito ao período de atividade sexual dos machos, haja em vista ser o caprino uma espécie que, em determinadas regiões, apresenta estacionalidade reprodutiva em virtude do fotoperíodo. Entretanto o sêmen congelado pode ser mantido por um longo período quando armazenado em nitrogênio líquido apresentando maior aplicabilidade (TRALDI, 2006).

Entretanto, os procedimentos de congelação/descongelação acarretam danos celulares devido às mudanças na temperatura, estresse osmótico, injúrias oxidativas, formação de cristais de gelo, alterações na membrana dos espermatozoides, lesões no DNA, além da toxicidade dos crioprotetores (BORTOLOZZO et al., 2008).

A inseminação artificial (IA) tem um importante papel na criação de caprinos, especialmente em sistemas intensivos de produção, facilitando o controle reprodutivo e auxiliando na realização de testes de progênie mais precisos e em menor espaço de tempo. Essa técnica, quando associada a criopreservação do sêmen, tem como principal justificativa o melhoramento genético dos rebanhos, pela habilidade em produzir um grande número de descendentes por macho e em diferentes lugares ao mesmo tempo, além disso, cria a possibilidade da manipulação e armazenamento de material genético (BITTENCOURT et al., 2004).

No Brasil, a utilização da IA na espécie caprina ainda é limitada em comparação à sua aplicação em bovinos leiteiros, restringindo-se, basicamente, a trabalhos de pesquisa. Este fato ocorre devido à falta de informação técnica e de apoio aos criadores, ao custo inicial para implantação de programas de IA e à deficiência da escrituração zootécnica em muitas propriedades. Enfatiza-se, ainda, a baixa disponibilidade de sêmen e de reprodutores submetidos aos testes de progênie, à falta de estrutura para comercialização e transporte adequado para o sêmen e, principalmente, às dificuldades no processo de preservação do sêmen sob a forma congelada, com resultados insatisfatórios nos índices de concepção (SIQUEIRA et al., 2009).

A limitada capacidade de investimento da maioria dos caprinocultores, o pouco conhecimento sobre a fisiologia da espécie, a insuficiência de tecnologias próprias e adequadas para a congelação, além da desorganização nos canais de comercialização de sêmen são considerados os principais fatores limitantes da expansão da inseminação artificial em caprinos (ANDRADE; MARQUES; LEITE, 1999). A importância da espécie caprina como provedora de proteínas, na carne e leite, tem sido comprovada mundialmente. Além das ferramentas tradicionais de seleção, a eficiência reprodutiva é um dos fatores mais

importantes no incremento da produtividade desta espécie. Após a inseminação artificial, a múltipla ovulação e transferência de embriões, a produção *in vitro* de embriões representa a terceira geração de técnicas que buscam um melhor controle da reprodução animal, inclusive em caprinos (FREITAS et al., 2017).

2.4 Diluidores Espermáticos

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).

Em geral, o crioprotetor adequado deve: simular um ambiente que supra as demandas espermáticas; mimetizar a pressão osmótica do sêmen; fornecer elementos minerais e energéticos com capacidade para manter a motilidade; neutralizar os elementos tóxicos e equilibrar do pH do meio; proporcionar proteção contra choques térmicos, homeostase dos sistemas enzimáticos e integridade das membranas, a fim de estabilizar e diminuir o extravasamento de enzimas e íons (AMANN; PICKET, 1987).

Geralmente os meios de criopreservação de sêmen caprino e ovino incluem um crioprotetor não penetrante (leite ou gema de ovo), um crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), um tampão (Tris ou TES) um ou mais açúcares (glicose, frutose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), um sal (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos, como a penicilina, estreptomicina, gentamicina, entre outros (MAIA, 2015).

Os componentes do diluente de criopreservação são classificados como extracelulares ou não penetrantes, os quais são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos como a rafinose e trealose, lipoproteínas da gema do ovo, água de coco, proteínas do leite e alguns aminoácidos, que atuam por meio de efeito osmótico, induzindo a saída de água do interior da célula e prevenindo a formação de cristais de gelo no meio intracelular; e intracelulares ou penetrantes como o glicerol, o etilenoglicol, o DMSO, a acetamida, a lactamida, a dimetilformamida, e a dimetilacetamida (SILVA; GUERRA, 2011), que são agentes que possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo assim a formação de cristais de gelo, por reduzir o aumento de tamanho desses cristais, diminuindo a concentração de soluto nos meios extra e intracelulares (DALIMATA; GRAHAM, 1997), aumentando a viscosidade da solução de congelação, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelação da mesma. Além disso, os agentes crioprotetores penetrantes também agem prevenindo a

exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água (CASTRO et al., 2011).

Com o objetivo de melhorar os índices de fertilidade com a utilização do sêmen criopreservado, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para manter a integridade do espermatozoide durante as etapas de refrigeração e congelação. Dentre tais pesquisas, evidencia-se a importância dos antioxidantes na proteção celular durante os procedimentos de manipulação espermática e redução da temperatura, com o intuito de reduzir as crioinjúrias ocasionadas pelo estresse oxidativo. A função destes antioxidantes, quando presentes em baixa concentração quando comparado à do substrato oxidável, é regenerar o substrato ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo (SILVA; GUERRA, 2011).

A diluição do sêmen é imprescindível antes de submetê-lo à congelação, e os diluidores são utilizados com a finalidade de proteger os espermatozoides, oferecendo condições mínimas de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea para que ocorra a fertilização. A proteção oferecida durante as fases de desidratação, de congelação e a estabilização da bicamada lipídica dependem das substâncias que compõem o diluidor. Além disso, diluidores que contêm produtos de origem animal e vegetal podem trazer riscos de contaminação por bactérias ou outros microrganismos, sendo uma possível fonte de endotoxinas capazes de afetar a capacidade de fecundação dos espermatozoides (BOUSSEAU et al., 1998).

2.5 Oxidantes e Antioxidantes

O estudo sobre as modificações ocorridas no espermatozoide e em suas membranas durante a redução da temperatura elucida possíveis lesões e diminuição da capacidade fertilizante deste gameta masculino e possibilita a elaboração de estratégias para reduzir tais injúrias, como a seleção e/ou associação de crioprotetores mais eficazes para determinada espécie, assim como a adição de componentes que podem oferecer substrato ou remover os causadores de lesões celulares, como as espécies reativas ao oxigênio (SILVA; GUERRA, 2011).

Os termos radicais livres, oxidantes e espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERO) são usados no meio científico para identificar os intermediários químicos reativos oriundos do metabolismo do oxigênio, entre eles o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\bullet) (MAIA; BICUDO, 2009) além de outras moléculas que também possuem o potencial oxidante como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

O organismo produz naturalmente radicais livres e outras espécies reativas oriundas do oxigênio decorrente do próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Concentrações reduzidas de ERO são importantes para processos bioquímicos normais como: sinalização e controle do crescimento celular, ataque de patógenos invasores, síntese enzimática de processos bioativos pelas ciclo-oxigenases, lipoxigenases e pelo nucleotídeo redutase (formação de desoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeo), e detoxificação de substâncias estranhas. Porém, quando sua produção ocorre em quantidade superior à capacidade de neutralização pelas células, distúrbios celulares e metabólicos ocorrerão de diversas maneiras (FORD, 2001).

O dano oxidativo de biomoléculas pode levar a inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e a morte celular. Estes efeitos tóxicos do oxigênio têm sido associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas (HALLINWELL; GUTTERIDGE, 1990). Embora quantidades controladas de ERO tenham função importante no sêmen, auxiliando no processo de hiperativação/capacitação espermática, concentrações excessivas são nocivas, levando à lipoperoxidação da membrana plasmática e à consequente diminuição da capacidade fecundante (FOLCHINI et al., 2012).

Diversos estudos demonstram que a criopreservação reduz os níveis dos antioxidantes presentes tanto na célula quanto no plasma seminal, fortalecendo a evidência de que, entre as causas da deterioração da qualidade do sêmen após um ciclo de congelamento e descongelamento, estão àquelas ligadas ao estresse oxidativo e que a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelamento de sêmen ajuda a proteger o espermatozoide contra o dano induzido pelos radicais livres sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como a interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, em diversas espécies de animais (MAIA; BICUDO, 2009).

2.6 Hibisco

Conhecido popularmente como hibisco, hibiscus, rosela, groselha, azedinha, a espécie *Hibiscus sabdariffa* L. é uma importante planta pertence à classe das Dicotiledôneas, família das Malváceas e gênero *Hibiscus* (Figura 1). Originária da Índia, do Sudão e da Malásia, sendo posteriormente levado para a África, Sudeste da Ásia e América Central. No

Brasil, foi trazida pelos africanos, através do tráfico de escravos (SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016).

Figura 1. Flor de hibisco



Fonte: <https://www.saudedica.com.br/hibisco-beneficios-usos-e-efeitos-colaterais/>

Ensaaios farmacológicos têm demonstrado uma gama de efeitos terapêuticos, como hepatoprotetor, antibacteriana, antioxidante, anticolesterol, anticâncer, antihipertensivo, dentre outros. Estudos realizados com *H. sabdariffa* têm reportado a presença de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, esteroides, terpenoides, polissacarídeos e alguns minerais. Os compostos fenólicos consistem principalmente de antocianinas glicosiladas e têm sido consideradas como um dos principais constituintes biologicamente ativos (RAMOS et al., 2010).

Ali et al. (2012) testaram o efeito do extrato aquoso do *H. sabdariffa* no consumo alimentar de ratos e constataram que o hibisco não exerce efeito deletério sobre o sistema reprodutor de machos. Entretanto, outros estudos com ratos evidenciaram que altas concentrações de extrato aquoso do cálice de hibisco podem causar degeneração testicular (ORISAKWE et al., 2004) e diminuição da concentração espermática (De ARRUDA et al., 2016). Por outro lado, Luangpirom e Taweebot (2010) afirmaram que o extrato aquoso de *H. sabdariffa*, em concentrações de 20, 50 e 100 mg, conferiu efeito protetor aos testículos de camundongos que foram submetidos ao uso de tetraciclina, que causa toxicidade testicular. Já os resultados de Mahmoud (2012), com administração de 200 mg de extrato aquoso a camundongos albinos, demonstraram alteração na ultraestrutura testicular, com modificações na morfologia celular normal dos espermatozoides.

Por ser de origem vegetal, diluidores para criopreservação acrescidos de extrato de hibisco apresentam vantagens sanitárias, pois podem trazer menores riscos de contaminação por bactérias ou outros microrganismos que são uma possível fonte de endotoxinas capazes de afetar a capacidade de fecundação dos espermatozoides.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a influência de diferentes concentrações de extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) nos espermatozoides descongelados de reprodutores caprinos.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar o efeito da adição de extratos etanólico e metanólico de hibisco na descongelação de espermatozoides caprinos criopreservados em diluente à base de leite;
- b) Mensurar o efeito da adição dos extratos de hibisco sobre os parâmetros de motilidade subjetiva e objetiva, integridade e funcionalidade da membrana plasmática medidos de forma subjetiva, zero e duas horas pós-descongelação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização e Período do Experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e no Laboratório de Andrologia (ANDROLAB/Departamento de Medicina Veterinária) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFPB). O período de execução deste trabalho compreende o segundo semestre de 2018.

4.2 Sêmen

O sêmen utilizado nos experimentos foi obtido por doação de central de reprodução animal. As amostras foram criopreservadas entre os anos de 2006 e 2007. Para conhecimento do procedimento, três reprodutores caprinos em idade reprodutiva da raça Boer foram submetidos à colheita de sêmen por vagina artificial, analisados e quando aprovados (CBRA, 2013), o sêmen de cada animal foi diluído em diluidor para criopreservação a base de leite (10g de leite desnatado em pó, 194 mg de glicose e 7% de glicerol, pH 6,8), envasado em palhetas de criopreservação com capacidade de 250 microlitros, submetido à curva controlada de refrigeração/congelação (TK 3000®) e armazenado em nitrogênio líquido (- 196 °C) até o momento da experimentação. Como não há o uso de animais para a colheita das amostras, não há necessidade da submissão do projeto para a Comissão de Ética no Uso de Animais.

4.3 Obtenção do Extrato

No preparo dos extratos foram adicionados 30g de flor seca de *H. sabdariffa*, obtida comercialmente (Bem Natural®), em 300 mL de etanol e em 300 mL de metanol durante cinco dias, em ambiente sem luz, para ocorrer a extração. As soluções extrativas foram evaporadas em evaporador rotativo. Os extratos, então, foram solubilizados em solução

fisiológica (NaCl, 0,9%), para adição ao sêmen, na proporção de 5,0 mg de extrato bruto para 1,0 mL de solução fisiológica.

4.4 Avaliação Pós-Descongelação

Para a descongelação das amostras de sêmen, utilizou-se banho-maria, a 37 °C, por 30 segundos. Em seguida formaram-se os grupos que foram avaliados quanto aos parâmetros cinéticos, integridade de membrana plasmática (eosina-nigrosina e microscopia de fluorescência), funcionalidade da membrana plasmática e motilidade subjetiva nos tempos de 0 e 2 horas pós-descongelação.

4.5 Formação dos Grupos Experimentais

Após a descongelação das amostras seminais, foi formado um *pool* para evitar a interferência individual, e este *pool* foi fracionado em cinco alíquotas, de modo que cada uma ao ser adicionada ao extrato formassem diferentes porcentagens de diluição.

Ao final da diluição foram formados quatro grupos experimentais e um grupo controle. GC (grupo controle; sem a adição de extrato); M5 (grupo com 5% de adição do extrato metanólico; 190 µL de sêmen e 10 µL de extrato); M10 (grupo com 10% de adição do extrato metanólico; 180 µL de sêmen e 20 µL de extrato); E10 (grupo com 10% de adição do extrato etanólico; 180 µL de sêmen e 20 µL de extrato); E15 (grupo com 15% de adição do extrato etanólico; 170 µL de sêmen e 30 µL de extrato).

4.6 Avaliação do Sêmen

4.6.1 Motilidade subjetiva

A análise da motilidade total foi realizada por avaliação subjetiva expressa em porcentagem (0-100%), sendo realizada em um microscópio óptico, em objetiva de 40x, utilizando-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula (18x18). A avaliação da motilidade foi expressa em porcentagem, com variação de 0-100%, considerando a média de dois avaliadores (CBRA, 2013).

4.6.2 Teste de integridade da membrana plasmática

Para avaliação da integridade de membrana plasmática foi empregado o teste de dupla coloração com eosina-nigrosina (CBRA, 2013; Figura 2). Para esta técnica foram diluídos 25 μL de sêmen de cada grupo experimental em solução contendo 50 μL do corante e 25 μL de solução fisiológica 0,9%. Após a diluição, é realizado o estiraço com 10 μL de cada amostra e contadas 200 células, determinando-se a proporção entre células coradas e não coradas (células com membranas rompidas e íntegras, respectivamente) em microscopia ótica e aumento de 40x (MURGAS et al., 2002).

Para a preparação de 100 mL de Eosina-Nigrosina foram utilizados: 1,0 grama de eosina; 5,0 gramas de nigrosina; 3,0 gramas de citrato de sódio e 100 mL de água destilada.

Figura 2. Dupla coloração Eosina-Nigrosina, integridade de membrana plasmática



Fonte: http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/Reproduccion_archivos/Practica%204-eval-semen.pdf

4.6.3 Teste de funcionalidade da membrana plasmática

O teste hiposmótico (HOST, Figura 3) visa avaliar a funcionalidade da membrana plasmática baseando-se nas propriedades da manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular (CBRA, 2013). Dez microlitros de cada grupo (GC, M5, M10, E10 e E15) foram diluídos separadamente em 100 μL de solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H_2O) composta por citrato de sódio e água destilada. A solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação foram adicionados 50 μL de solução formol-citrato para parar a reação osmótica dos espermatozoides.

O HOST foi avaliado colocando 10 μL de sêmen com solução entre lâmina e lamínula e observado através de microscopia ótica com aumento de 40x. Foram contadas 200 células,

considerando funcionais aquelas com cauda enrolada e não-funcionais aquelas que permaneceram com cauda esticada (FAGUNDES et al., 2010).

Para a preparação de 100 mL de solução hiposmótica (50 mOsm/Kg H₂O) foram utilizados 0,464 gramas de citrato de sódio e 100 mL de água destilada.

Figura 3. Teste de funcionalidade da membrana plasmática em solução hiposmótica



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

4.6.4 Análise cinética (Computer Assisted Sperm Analyzer - CASA)

A cinética espermática foi analisada através do sistema computadorizado de análise espermática (Sperm Class Analyzer, SCA®; Microptics, SL, Versão 5.1, Barcelona, Espanha). Uma alíquota (10µL) de cada amostra foi depositada sobre lâmina coberta com lamínula e analisada por microscópio de contraste de fase (aumento de 100x; Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) com imagens capturadas utilizando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie™ A312FC, Ahrensburg, Alemanha) (Figura 4). Para cada amostra foram analisados cinco campos não consecutivos, selecionados aleatoriamente, com registro de, no mínimo, 2.000 espermatozoides.

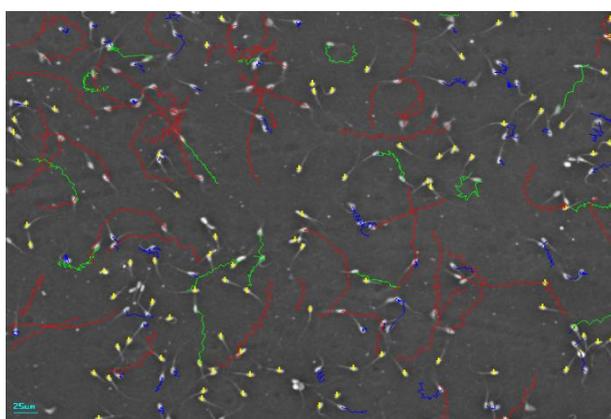
Figura 4. Sperm Class Analyzer (SCA/CASA)



Fonte: Laboratório de Andrologia, UFRPE.
Cedido por Camilla Flávia Avelino de Farias

Foram avaliados os parâmetros motilidade total (MT) (Figura 5), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), índice de oscilação (WOB), amplitude lateral da cabeça (ALH), batimento cruzado flagelar (BCF) e índice de hiperativação (IH).

Figura 5. Campo de avaliação da cinética espermática de caprinos no Sperm Class Analyzer



Fonte: autor.

4.7 Análise Estatística

Para comparações entre os tempos de um mesmo tratamento utilizou-se o teste T pareado e para comparação entre tratamentos utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados foram expressos na forma de média e desvio-padrão.

5 RESULTADOS

Para o parâmetro de motilidade subjetiva (Tabela 1) foi observado que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos testados e tempos de avaliação.

Tabela 1. Valores percentuais de motilidade subjetiva de espermatozoides caprinos descongelados com adição ou não de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos de avaliação

Grupos	Motilidade subjetiva (%)	
	0h	2h
GC	66,0±8,4	59,0±9,6
M5	61,5±8,7	56,5±12,6
M10	63,5±10,9	52,5±13,8
E10	53,5±13,2	48,0±7,5
E15	52,0±15,1	46,0±10,0

GC: grupo controle; M5: extrato metanólico a 5%; M10: extrato metanólico a 10%; E5: extrato etanólico a 10%; E15: extrato etanólico a 15%.

A Tabela 2 mostra os dados obtidos para os parâmetros espermáticos de integridade e funcionalidade da membrana plasmática. Quanto a integridade da membrana plasmática no tempo de análise imediato (0h), o GC apresentou resultados diferentes ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos E10 e E15, o Grupo M10 também diferiu ($p < 0,05$) dos grupos E10 e E15; os grupos M5 e E10 diferiram ($p < 0,05$) do grupo E15. Duas horas após a incubação, o GC diferiu ($p < 0,05$) de todos os grupos contendo hibisco (M5, M10, E10 e E15), enquanto que o grupo M10 diferiu apenas dos grupos GC e E15. No parâmetro de funcionalidade de membrana, o GC apresentou diferença ($p < 0,05$) se comparado ao grupo E15 no menor tempo de incubação; na análise de 2h foi observada diferença entre o GC e os grupos E10 e E15, além disso foi vista diferença ($p < 0,05$) entre os grupos M10 e E15.

Tabela 2. Valores percentuais de integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides caprinos com adição ou não de diferentes extratos de hibisco e concentrações pós-criopreservação

Grupos	Integridade (%)		Funcionalidade (%)	
	0h	2h	0h	2h
GC	72,0±5,1 ^c	71,2±6,1 ^c	73,9±6,3 ^b	72,9±5,3 ^c
M5	69,8±5,6 ^{bc}	64,1±7,4 ^{ab}	69,6±4,6 ^{ab}	68,5±4,1 ^{abc}
M10	71,7±4,8 ^c	64,6±7,5 ^b	67,8±5,8 ^{ab}	69,2±5,3 ^{cb}
E10	67,5±4,7 ^b	61,4±7,3 ^{ab}	68,2±5,9 ^{ab}	66,7±7,8 ^{ab}
E15	63,3±5,3 ^a	60,2±5,9 ^a	65,1±4,2 ^a	63,7±4,2 ^a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre os grupos (linhas); GC: grupo controle; M5: extrato metanólico de hibisco a 5%; M10: extrato metanólico de hibisco a 10%; E5: extrato etanólico de hibisco a 10%; E15: extrato etanólico de hibisco a 15%.

Levando em consideração os resultados obtidos através do sistema computadorizado de análise espermática, que se referem à motilidade dos espermatozoides de forma objetiva, foi montada a Tabela 3, que demonstrou que tanto a motilidade total quanto a motilidade progressiva se mantiveram ($p>0,05$) em todos os grupos experimentais após duas horas de incubação, exceto o controle, que diminuiu com o passar do tempo de incubação em ambos os parâmetros.

Tabela 3. Motilidade total e progressiva de espermatozoides caprinos, pelo método objetivo, com adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações pós-criopreservação

Grupos	MT (%)		MP (%)	
	0h	2h	0h	2h
GC	49,9±11,7 ^A	39,4±16,2 ^B	31,6±11,8 ^A	22,0±10,8 ^B
M5	50,0±14,6 ^A	46,5±11,5 ^A	31,2±10,5 ^A	27,0±8,4 ^A
M10	45,8±4,0 ^A	38,6±9,3 ^A	27,1±5,6 ^A	19,1±5,6 ^A
E10	41,2±10,7 ^A	35,6±17,4 ^A	24,3±10,1 ^A	17,6±10,0 ^A
E15	49,1±11,0 ^A	44,5±17,4 ^A	25,3±12,8 ^A	25,1±11,25 ^A

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença ($p<0,05$) entre os tempos (colunas); MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; GC: grupo controle; M5: extrato metanólico a 5%; M10: extrato metanólico a 10%; E5: extrato etanólico a 10%; E15: extrato etanólico a 15%.

Outros parâmetros avaliados pelo CASA, referente às velocidades espermáticas estão descritos na Tabela 4. Não foi encontrada diferença significativa nos parâmetros cinéticos de velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP) comparando os diferentes grupos e os tempos de avaliação, porém no parâmetro velocidade curvilínea (VCL) o grupo M5 diferiu ($p<0,05$) entre os tempos de avaliação apresentando menores valores após duas horas de incubação; os outros grupos experimentais e o grupo controle se mantiveram sem diferenças significativas em relação ao tempo.

Tabela 4. Valores absolutos da cinética de espermatozoides caprinos descongelados com adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos de avaliação

Grupos	VCL ($\mu\text{m/s}$)		VSL ($\mu\text{m/s}$)		VAP ($\mu\text{m/s}$)	
	0h	2h	0h	2h	0h	2h
GC	121,2±13,0	112,0±11,3	91,2±15,4	83,2±8,6	106,2±14,9	97,6±11,4
M5	129,7±4,9 ^A	117,7±6,4 ^B	95,4±11,9	86,3±4,5	113,55±8,4	103,2±4,6
M10	127,8±22,1	109,0±13,5	95,9±24,5	75,8±11,0	114,1±23,4	92,2±14,8
E10	125,9±6,0	114,6±18,1	94,3±19,4	79,4±13,6	112,7±9,8	101,2±19,2
E15	108,1±22,7	112,5±24,6	76,7±25,0	79,7±15,7	94,0±24,7	96,9±20,3

VSL: velocidade em linha reta; VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média da trajetória; GC: grupo controle; M5: extrato metanólico a 5%; M10: extrato metanólico a 10%; E5: extrato etanólico a 10%; E15: extrato etanólico a 15%.

A Tabela 5 contém os parâmetros cinéticos de amplitude lateral da cabeça (ALH), batimento cruzado flagelar (BCF) e índice de hiperativação (IH) dos espermatozoides avaliados, onde não houve diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos e também não foi detectada diferença ($p > 0,05$) entre os tempos de incubação para os parâmetros descritos.

Tabela 5. Perfil cinético e hiperativação de espermatozoides caprinos descongelados com adição de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos de avaliação

Grupos	ALH (μm)		BCF (Hz)		IH (%)	
	0h	2h	0h	2h	0h	2h
GC	2,6 \pm 0,3	2,7 \pm 0,1	10,1 \pm 1,5	9,6 \pm 2,3	10,1 \pm 4,3	9,3 \pm 2,8
M5	2,4 \pm 0,4	2,6 \pm 0,4	11,2 \pm 3,7	10,0 \pm 3,4	10,8 \pm 6,8	9,6 \pm 4,4
M10	2,4 \pm 0,3	2,8 \pm 0,2	10,0 \pm 2,0	10,3 \pm 2,8	8,1 \pm 3,1	8,4 \pm 0,7
E10	2,4 \pm 0,4	2,5 \pm 0,2	9,7 \pm 2,1	9,1 \pm 2,3	6,5 \pm 4,4	5,2 \pm 2,1
E15	2,4 \pm 0,3	2,6 \pm 0,2	9,5 \pm 1,7	9,8 \pm 2,2	6,0 \pm 4,9	8,0 \pm 3,7

ALH: amplitude lateral da cabeça; BCF: batimento cruzado flagelar; IH: índice de hiperativação; GC: grupo controle; M5: extrato metanólico a 5%; M10: extrato metanólico a 10%; E5: extrato etanólico a 10%; E15: extrato etanólico a 15%.

Na Tabela 6 encontra-se o perfil de trajetória dos espermatozoides contendo os parâmetros de linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação (WOB). Observa-se que nos parâmetros de LIN, STR e WOB não foram detectadas diferenças entre os grupos testados e entre os dois tempos de avaliação.

Tabela 6. Valores percentuais do perfil de trajetória de espermatozoides caprinos descongelados com adição ou não de diferentes extratos de hibisco e concentrações em dois tempos de avaliação

Grupos	LIN (%)		STR (%)		WOB (%)	
	0h	2h	0h	2h	0h	2h
GC	75,0 \pm 6,5	74,3 \pm 0,9	85,6 \pm 4,3	85,3 \pm 1,1	87,4 \pm 4,1	87,1 \pm 2,1
M5	73,6 \pm 9,9	73,5 \pm 5,5	83,7 \pm 4,6	83,6 \pm 2,9	87,6 \pm 7,4	87,8 \pm 5,5
M10	74,4 \pm 7,1	69,5 \pm 4,9	83,5 \pm 4,3	82,4 \pm 2,7	89,0 \pm 5,7	84,3 \pm 4,8
E10	74,6 \pm 12,7	69,5 \pm 7,0	83,0 \pm 10,5	78,9 \pm 6,0	89,5 \pm 5,0	88,0 \pm 4,5
E15	70,1 \pm 11,4	71,1 \pm 2,6	80,8 \pm 9,0	82,3 \pm 1,0	86,4 \pm 5,8	86,3 \pm 2,2

LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: índice de oscilação; GC: grupo controle; M5: extrato metanólico a 5%; M10: extrato metanólico a 10%; E5: extrato etanólico a 10%; E15: extrato etanólico a 15%.

6 DISCUSSÃO

As crioinjúrias decorrem da interação entre as mudanças biofísicas, bioquímicas e ambientais ocorridas durante o processo de criopreservação, submetendo as células criopreservadas aos estresses resultantes das mudanças de volume e consequentes alterações nas concentrações de íons e eletrólitos nas soluções intra e extracelulares (QUEIROS, 2018). De acordo com Gomes, Crespilho e Gomes (2015), diferentes faixas de pH podem alterar a integridade da membrana plasmática espermática; uma alternativa para essa deficiência é a incorporação de colesterol na presença de tampão.

Mudanças no volume da célula durante a adição do diluidor, associadas ao encolhimento e expansão em resposta a hiperosmolaridade do crioprotetor assim como a desidratação induzida pela congelação são processos que desestabilizam as membranas ou citoesqueleto e levam a lesões (WATSON, 1995). Gao et al. (1995) observaram diminuição da motilidade e perda da integridade da membrana em espermatozoides humanos submetidos a meios anisomóticos.

Dessa forma a redução da proporção de células com a membrana íntegra em contato com os extratos de hibisco pode ser explicada pelas variações osmóticas e de pH que podem ter ocorrido durante a adição dos extratos; é perceptível que a maior redução ocorreu no grupo E15, que apresentava maior concentração de extrato e menor de diluidor/sêmen.

O teste hiposmótico (HOST) foi originalmente elaborado para uso com espermatozoides humanos, com a função de avaliar a atividade bioquímica da membrana espermática intacta. Esse teste baseia-se na observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permita a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares. Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda, uma vez que o espermatozoide é desprovido de citoplasma (BITTENCOURT, 2005).

Como no presente estudo notou-se que a houve uma redução na integridade da membrana de espermatozoides submetidos a diluição em extrato de hibisco, principalmente em extrato etanólico na concentração de 15%, é esperado que no teste hiposmótico (HOST) essa redução também seja perceptiva, por isso houve uma diminuição na proporção de células reativas no grupo E15 em relação ao grupo controle.

Existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais, conhecidos também como substâncias bioativas. Dentre esses, podem ser citados os tradicionais métodos de extração utilizando solventes orgânicos (como água, etanol, éter e metanol) e a extração supercrítica, que mediante mudanças na pressão e na temperatura transforma o dióxido de carbono (CO₂) em fluido supercrítico para a extração. Sob o ponto de vista químico não há como selecionar a metodologia mais eficiente para a extração desses compostos, que podem sofrer a influência de diversos fatores. Dentre esses, podem ser citados a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração (ANDREO; JORGE, 2006).

Por isso, nos diferentes extratos estudados neste trabalho, diferentes quantidades ou substâncias podem ter sido extraídas, de forma que os extratos metanólicos podem ter mais bioativos antioxidantes em relação aos etanólicos, sendo assim o M10 apresentou melhores resultados tanto de integridade quanto de funcionalidade de membrana que os demais extratos, principalmente em relação ao E15.

Sabe-se que a criopreservação induz à formação de espécies reativas de oxigênio, as quais diminuem o desempenho espermático. O efeito da oxidação sobre o DNA mitocondrial e sobre a arquitetura da membrana espermática pode ser considerado o principal fator de redução da motilidade espermática e fertilidade do sêmen criopreservado. O efeito protetor dos antioxidantes adicionados ao sêmen antes da congelação permite a manutenção funcional das mitocôndrias (ANDRADE et al., 2010).

Dessa forma é possível inferir que as atividades antioxidantes das substâncias presentes no extrato de hibisco tenham protegido as mitocôndrias espermáticas de modo a manter a motilidade em grupos que entraram em contato com essas substâncias (M5, M10, E10 e E15,) assim o grupo controle apresentou significativa diminuição na motilidade, tanto total quanto progressiva, em função do tempo de incubação, e essa redução não foi vista nos grupos com hibisco.

Outra possibilidade é a função do hibisco, além de uma atividade antioxidante mínima, pode ter agido como função energética. De acordo com Hempel (2018) o extrato metanólico de hibisco tem uma elevada concentração de açúcares redutores, que servem como substrato energético para a mitocôndria das células, o que pode ter causado uma manutenção da motilidade dos espermatozoides que entraram em contato com os extratos.

A motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade fertilizante do espermatozoide, porém, quando mensurada microscopicamente, não é bem correlacionada com a fertilização *in vivo* ou *in*

vitro, pois além do erro humano durante a avaliação subjetiva desse parâmetro, existe ainda a limitação do método para avaliar detalhadamente as características do movimento espermático (MATOS et al., 2008).

Quando se relaciona os dados obtidos pela motilidade subjetiva e a motilidade total e progressiva (MT e MP, respectivamente) obtidas pelo CASA, observa-se que em ambos os métodos de avaliação não foi perceptível diferença entre os grupos, porém no método de motilidade subjetiva não foi possível determinar a redução da motilidade no grupo controle em função do tempo, isso pode ser explicado pela menor precisão que o método proporciona, principalmente por estar sujeita ao erro humano, por isso a necessidade de buscar uma avaliação mais automatizada e criteriosa como o CASA.

Velocidade curvilínea (VCL) é a velocidade da trajetória real do espermatozoide. É sempre a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade. (MATOS et al., 2008). Como o extrato de hibisco é diluído em solução fisiológica para a adição no sêmen, é possível que apesar dos efeitos deletérios ocorridos devido a variação na osmolaridade e pH a viscosidade do meio tenha se alterado menos no grupo M5, deixando o meio mais viscoso em relação aos outros meios utilizando o hibisco, devido a menor diluição dos crioprotetores presentes, glicerol e leite. Desse modo, a VCL do grupo M5 diminuiu em relação ao tempo.

De acordo com Bucak e colaboradores (2009) é possível que a lipoperoxidação e a capacidade antioxidante não sejam fatores determinantes que influenciam a sobrevivência espermática durante a criopreservação. Como é o observado nesse estudo a motilidade dos espermatozoides se manteve, quando submetidos ao contato com extrato de hibisco, do mesmo modo foi percebido uma diminuição na integridade e funcionalidade de membrana desses grupos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos dados obtidos por este trabalho é possível inferir que a utilização do hibisco pode interferir na motilidade dos espermatozoides independentemente da concentração, de modo a mantê-la por um maior período. Desta forma, a utilização de sêmen acrescido de hibisco pode ser benéfica para a fertilização e utilização em inseminação artificial, apesar da diminuição da integridade da membrana percebida.

Mais estudos são necessários para precisar as vias de degradação da membrana espermática e o papel das substâncias presentes no extrato de hibisco nestes parâmetros.

REFERÊNCIAS

- ALI, B.H.; AL-LAWATI, I.; BEEGAM, S.; ZIADA, A.; AL SALAM, S.; NEMMAR, A.; BLUNDEN, G. Effect of Hibiscus sabdariffa and its anthocyanins on some reproductive aspects in rats. **Natural Product Communication**, v.7, n.1, p.41-4, 2012.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.147, 1987.
- ANDRADE, S.J.; MARQUES JR, A.P.; LEITE, R.C. Sêmen caprino congelado: efeito de dois diluidores sobre a taxa de fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.245, 1999.
- ANDRADE, E.; MELO-STERZA, F.; SENEDA, M.; ALFIERI, A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.24, n.2, p.319-336. 2006.
- BAKER, M.A.; AITKEN, R.J. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.216, p.47-54, 2004.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelamento do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.1, p.27-32, 2004.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SANTOS A.D.F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES J.D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.3, p.213-218, 2005.
- BORTOLOZZO, F.P.; BERNARDI, M.L.; BENNEMANN, P.E.; WENTZ, I.V.O. Inseminação artificial em suínos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª ed. Roca, São Paulo 2008.
- BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; ULUTAS, P.A.; AKAÇADAG, H.I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.81, p.90-95, 2009.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.

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

CASTILHO, E.F.; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; ESPESCHIT, C. J. B. Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista brasileira de zootecnia**, v.38, n. 12, p. 2335-2345, 2009.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.

COSTA, R.G.; CARTAXO, F.Q.; SANTOS, N.M.; QUEIROGA, R.C.R.E. Carne caprina e ovina: composição lipídica e características sensoriais. **Revista brasileira de saúde e produção animal**, v.9, n.3, p.497-506, 2008.

COSTA, R.G.; QUEIROGA, R.C.R.E.; PEREIRA, R.A.G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.307-321, 2009.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p.831-841, 1997.

De ARRUDA, A.; CARDOSO, C.A.; VIEIRA, M. do C.; ARENA, A.C. Safety assessment of Hibiscus sabdariffa after maternal exposure on male reproductive parameters in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v.39, n.1, p.22-7, 2016.

FREITAS, V.J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; MERMILLOD, P.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A. Estado da arte e perspectivas da produção *in vitro* de embriões em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.201-207, 2017.

FOLCHINI, N.P.; LEIVAS, F.G.; SANTOS, F.W.; SCHWENGBER, E.B.; MARTIN, D.M.; SPIAZZI, C.C.; BRUM, D.S. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.4, p.239-244, 2012.

FORD, W.C. Reactive oxygen species and sperm. **Human Fertility**, v.4, p.77-78, 2001.

GAO, D.Y.; LIU, J.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, F.F.; CRISTSER, E.S.; CRISTSER, J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v.10, n.5, p.1109-1122, 1995.

GOMES, G.M.; CRESPILO, A.; GOMES, L.M. Problemas relacionados ao uso de sêmen refrigerado de garanhões. **Revista Saúde**, v.1, n.6, p.25-28, 2015.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the preservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility of Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

- GUINDANI, M.; TONET, F.; KUHN, F.; DAL MAGRO, J.; DALCANTON, F.; FIORI, M.A.; MELLO, J.M.M. Estudo do processo de extração dos compostos fenólicos e antocianinas totais do *Hibiscus sabdariffa*. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Química**, p.1-5, 2014.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.
- HEMPEL, M. S. S. Efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de *Hibiscus sabdariffa* ao sêmen refrigerado de equinos. **XXVI Encontro de Iniciação Científica**, UFPB, João Pessoa, 2018.
- IBGE. Produção da pecuária municipal 2013. **Produção da Pecuária municipal**, IBGE, Rio de Janeiro, v.41, 2013.
- IBGE. Produção da pecuária municipal 2015. **Produção da Pecuária municipal**, IBGE, Rio de Janeiro, v.43, 2015.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNSSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membranes changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v.55, p.947-961, 2000.
- LUANGPIROM, A.; TAWEEBOT, N. Protective effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn. Calyx extract on tetracycline induced testicular toxicity in mice. **Animal Biology & Animal Husbandry**, v.2, n.1, p.21-26, 2010.
- MACHADO, R.; FREITAS, A. R.; SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D. O. Flutuações sazonais e efeitos de raça no sêmen caprino. **XXXVII Reunião Anual da SBZ**, Viçosa, MG, 2000.
- MACIEL, M. J.; PAIM, M. P.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n.71, v.3, p.462-470, 2012.
- MADRUGA, M. S. Carne caprina: verdades e mitos à luz da ciência. **Revista nacional da carne**, v. 23, n. 264, p. 34-40, 1999.
- MADRUGA M.S.; NARAIN, N.; ARRUDA, S.G.B.; SOUZA, J.G.; COSTA, R.G.; BESERRA, F.J. Influência da idade de abate e da castração nas qualidades físico-químicas, sensoriais e aromáticas da carne caprina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1562-1570, 2002.
- MAHMOUD, Y.I. Effect of extract of *Hibiscus* on the ultrastructure of the testis in adult mice. **Acta Histochemica**, n.4, v.114, p.342-348, 2012.
- MAIA, M.S. **Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos**. 13th ed. EMPARN, Natal, RN. 2010.

MAIA, M.S. **Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos**. VI Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, Recife, PE. 2015.

MAIA, M.S.; BUCUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

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

NOBREGA, A. Estudo aponta tendências para caprinocultura e ovinocultura nos cenários nacional e internacional. **Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8698648/estudo-aponta-tendencias-para-caprinocultura-e-ovinocultura-nos-cenarios-nacional-e-internacional>**, Embrapa, 2016, acesso: 10 de agosto de 2017.

NOGUEIRA FILHO, A.; FIGUEIREDO JÚNIOR, C.A.; YAMAMOTO, A. **Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos na área de atuação do BNB**. Banco do Nordeste do Brasil. n.27, 128 p., 2010.

OLIVEIRA, M.W.S. Potencial antioxidante e scavenger da taurina em concentrações fisiológicas contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRS, Porto Alegre, 2008.

ORISAKWE, O.E.; HUSAINI, D.C.; AFONNE, O.J. Testicular effects of sub-chronic administration of Hibiscus sabdariffa calyx aqueous extract in rats. **Reproductive Toxicology**, v.18, n.2, p.295-308, 2004.

PRATA, L.F.; RIBEIRO, A.C.; REZENDE, K.T.; CARVALHO, M.R.B.; RIBEIRO, S.D.A.; COSTA, R.G. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (saanen), Região Sudeste, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.1-12, 1998.

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

QUEIROS, A.F. Avaliação do efeito das combinações de crioprotetores e da remoção do plasma seminal na criopreservação de sêmen caprino. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFPB, Areia, Paraíba, 2018.

RAMOS, D.D.; VIEIRA, M.C.; FORMAGIO, A.S.N.; CARDOSO, C.A.L.; RAMOS, D.D.; CARNEVALI, T.O. Atividade antioxidante de Hibiscus sabdariffa L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, v.41, n.8, p.1331-1336, 2011.

RIBEIRO, S.D.A. Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos. **Nobel**, São Paulo, 1997.

RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S.V.D.; PEREIRA FILHO, J.M.; AZEVEDO, S.S.A.; MELO, D.B.; BATISTA, J.A.; MIRANDA NETO, E.G.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais

limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.33, v.3, p.345-352, 2013.

ROY, A. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, n.179, p.318-19, 1957.

SILVA, A.F.; COSTA, E.P.; OLIVEIRA, F.A.; TORRES, C.A.A.; HASS, G.T.S.; NASCIMENTO, V.A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.452-456, 2006.

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

SIQUEIRA, A.P.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; PALHARES, M.S.; BORGES, A.M.; BRUSCHI, M.C.M.; PEIXOTO, M.P.; ROSSI, R. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5o C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.66-71, 2009.

SOBOTA, J.F.; PINHO, M.G.; OLIVEIRA, V.B. Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. **Revista Fitos**, v.10, n.1, p.1-93, 2016.

TRALDI, A.S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes, **III Feira internacional de caprinos e ovinos**, São Paulo, SP, 2006

WANDER, A.E.; MARTINS E.C. Viabilidade Econômica da Caprinocultura Leiteira, **IV semana da caprinocultura e ovinocultura brasileiras**, Embrapa Caprinos, Sobral, CE, 2004.

GLOSSÁRIO

Aterogenicidade	Relativo a formação de ateromas, depósito de lipídeos em vasos.
Biotécnicas	Técnicas/protocolos associados com o conhecimento biotecnológico.
Caprinocultura	Ciência que trata do estudo e da criação de cabras; conjunto de conhecimentos sobre a criação de caprinos; Criação de caprinos.
Crioprotetor	Qualquer substância que ofereça energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada.
Hiperativação	Estado cinético da célula capacitada a fertilização.
Enzima	Proteínas catalisadoras das reações químicas.
Flavonoide	Compostos bioativos do grupo dos polifenóis encontrados em diversos alimentos.
Germoplasma	Elemento dos recursos genéticos que maneja a variabilidade genética entre e dentro da espécie.
Motilidade (MT)	Competência para se mover; mobilidade.
Velocidade curvilínea (VCL)	Velocidade real trajetória total.
Velocidade linear progressiva (VSL)	É a velocidade média em função da linha reta da estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória.
Velocidade média da trajetória (VAP)	É a velocidade da trajetória média do espermatozoide, a direção do movimento.
Linearidade (LIN)	Relação percentual entre VSL e VCL.
Retilinearidade (STR)	É a relação percentual entre VSL e VAP.
Amplitude lateral da cabeça (ALH)	É a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real.
Batimento cruzado flagelar (BCF)	É o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento.