



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**CIBELE CAVALCANTI SOUZA DE MELO**

**CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO A 4°C UTILIZANDO  
ACP-101<sup>®</sup> COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE *Aloe vera* OU  
GEMA DE OVO**

**FORTALEZA-CEARÁ**

**2010**

CIBELE CAVALCANTI SOUZA DE MELO

CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO A 4°C UTILIZANDO ACP-101<sup>®</sup>  
COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE *Aloe vera* OU GEMA DE OVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

Co-orientadora: Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro

FORTALEZA-CEARÁ

2010

M528c Melo, Cibele Cavalcanti Souza de  
Conservação de sêmen caprino a 4°C utilizando ACP-101<sup>®</sup> com duas concentrações de *Aloe vera* ou gema de ovo/ Cibele Cavalcanti Souza de Melo – Fortaleza, 2010.  
Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes  
Dissertação de Mestrado (Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Caprino. 2. ACP-101<sup>®</sup>. 3. *Aloe vera*. 4. Resfriamento. 5. Gema de ovo

CDD: 636.39

CIBELE CAVALCANTI SOUZA DE MELO

CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO A 4°C UTILIZANDO ACP-101®  
COM DUAS CONCENTRAÇÕES DE *Aloe vera* ou GEMA DE OVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 30 de julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

---

Professor Dr. José Ferreira Nunes  
Universidade Estadual do Ceará  
Orientador

---

Dr<sup>a</sup>. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro  
ACP – Biotecnologia – Fortaleza – CE  
(Co-orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carminda Sandra Brito Salmito-  
Vanderley  
Universidade Estadual do Ceará  
(Membro Efetivo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
(Membro Externo)

Dedico essa vitória a todos aqueles que acreditaram em mim, que acreditaram na minha capacidade. A toda minha família, minha mãe, Ana Melo, pela força, apoio e incentivo aos meus estudos. Hoje, vemos, que todo sacrifício foi válido. Ao meu espelho, meu maninho, Leandro. Ao meu Amor, Alain Ageev. E, claro, a você *Papai*, que, se não fosse a sua força dentro de mim, depois de tudo que passamos, em qualquer lugar que estejas, eu não teria continuado. Amo vocês!

Viver não é esperar a tempestade passar... É aprender a dançar na chuva!

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária e Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade, pelos conhecimentos adquiridos e pelo apoio que recebi durante todo período do Mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso;

Ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino, que, através do uso de suas instalações e equipamentos, tornou possível a conclusão do experimento;

Ao Professor Doutor José Ferreira Nunes, pela orientação e conhecimentos passados durante os dois anos do Mestrado;

À Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pelos conhecimentos transmitidos desde meu último período da graduação, co-orientação e aceite de participar da minha banca de Dissertação, mas, em especial, pela acolhida durante minha chegada à Fortaleza, pelas broncas, pelo carinho, festas e risadas;

À Professora Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley pela ajuda durante todo esse tempo, pelos bombons de fim de tarde, pelos chocolates na Páscoa, me fazendo sentir em casa. Pelas trocas de ideias e também reclamações durante o mestrado, obrigada;

À Professora Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra, mais uma vez agradeço por acreditar em mim, pelo apoio, carinho e, conhecimentos compartilhados para aperfeiçoamento da profissional que pretendo me tornar;

Ao Professor Dr. Cláudio Cabral Campello, pela realização da estatística, paciência, dedicação e atenção ao projeto. Além de ajudar a esclarecer e concluir minha Dissertação ao participar da banca de defesa;

Ao Professor Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, coordenador do curso do PPGCV, por ter acalmado minha alma em nossas conversas e por ter me apoiado na reta final do curso de Mestrado em relação à data da Defesa da Dissertação. Saber que o Programa de Pós-Graduação pode contar com uma pessoa humana e íntegra é de especial importância;

A Deus, que, mesmo nas minhas omissões e descrenças, sempre me trouxe esperança e paz para continuar a batalha, mesmo sendo, às vezes, difícil de continuar;

Agradeço à mulher mais importante da minha vida, minha guerreira, minha heroína, Ana Melo, (Mainha, Te amo!), que sempre está comigo, mesmo que pelo telefone, me dando força, coragem, dignidade e tranquilidade para continuar, mesmo eu sabendo que do outro lado da linha existe um coração de Mãe com saudade;

Ao meu Pai, Edvaldo Souza, que, por você, pela promessa de uma vida melhor e pela nossa conversa (uma semana antes de você ir para um lugar que pudesse me vigiar mais constantemente), é que consegui conquistar mais uma etapa. Você vive dentro de mim;

Ao meu irmão, Leandro Cavalcanti, que sempre tem me trazido mais orgulho e vontade de vencer;

Pelo apoio dos meus tios, primos e agregados, aqueles que vieram e, aqueles que não puderam vir e, ficaram de longe, torcendo. Obrigada;

Ao meu amigo, meu Amor, Alain Ageev, verdadeiramente fiel e leal, desde 2005 e, hoje, sempre presente na minha luta em Fortaleza. Hoje, além da amizade, agradeço pelo apoio, incentivo, carinho, palavras de afeto e, claro, pelo Amor. E, que mesmo longe, muito longe, nunca desistiu de mim. Obrigada por me ensinar a ter paciência;

Aos amigos de longe, Recife do meu coração, Luciana, Julyany, Paloma, Natalia, Andrea, Emília, Reyvson e Daniel, que, durante minhas idas e vindas, alguns contratempos e desentendimentos foram leais e verdadeiros. Adoro vocês. Agradeço também àqueles que, de alguma forma, me ajudaram a continuar.

Aos amigos que ficaram mais vezes por perto: Hiédely – Gata, vou sentir sua falta, adorei te conhecer, obrigada por tudo! (Codó – Maranhão) e Fernanda (Teresina – Piauí), Carla Patrícia, Carla Melo, Vanessa (Vanessinha, nossas conversas, loucuras dos artigos e desesperos para as finalizações serão lembranças boas na minha memória), Lívia, Ivina, Roberta, Tiago, Bárbara (Babi, vou sentir muitas saudades, uma pena que a gente só ficou mais amigas agora!), Juliana (Fortaleza – CE) e Eudes (Gurupi - TO), a culpa é de vocês de eu ter conseguido tudo isso. Se não fosse nossa amizade, nossas conversas, risadas e descontraídas, não teria suportado;

A Érika Bezerra, Cleidson Gomes e Oscar Brasil, pela acolhida em suas residências para a seleção do mestrado e após a mesma. Agradeço de coração a paciência e peço desculpas por alguns desencontros;

Aos colegas da sala do mestrado, pessoal maravilhoso que devo meu respeito e admiração pela coragem e força nesta batalha. Parte desta vitória também é de vocês. O Amigo Ovo, o “Docentes e Decentes”, o “Tubo Falcon”, e também as farras que perdi, ficarão para sempre na memória. Vocês são loucos, mas são demais. Em especial à Adjanna Leite, que não apenas por ser minha

conterrânea e entender o que senti durante todo esse tempo, mas pela sua confiança plena em mim, quando simplesmente ofereceu o apartamento para minha mudança, considero você uma das amigadas que fiz em Fortaleza e que levarei para sempre;

Aos integrantes do Núcleo Integrado de Biotecnologia e do PPGCV, em especial, Iraci, Adriana, Fred, Cristina, Henna, Gonzaga, Aline, Edgar e Juan, que me ajudaram bastante, mesmo que alguns, só emocionalmente, durante os dois anos de estadia no laboratório. E, claro, aos principais integrantes, os animais, que me ajudaram na concretização do experimento;

Aos amigos que conheci aqui, mas que também não vieram para ficar, Sanely Calliman e Murad Skeff, o apoio de vocês foi muito importante para mim;

Por fim, a todos aqueles que contribuíram indiretamente para essa nova conquista, meus sinceros agradecimentos. Obrigada.

A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.

A dor é inevitável.  
O sofrimento é opcional.

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

A utilização de substâncias com potencial de crioproteção é de extrema importância para a conservação de sêmen, sendo a gema de ovo, a opção mais utilizada para este fim. Com o intuito de reduzir os impactos no mercado mundial quanto ao uso de substâncias de origem animal, devido à possível disseminação de doenças através da inseminação artificial, o objetivo do trabalho foi avaliar o diluidor à base de água de coco em pó ACP-101<sup>®</sup>, adicionado de *Aloe vera* no processo de resfriamento do sêmen caprino a 4°C, quanto aos parâmetros cinéticos e de vitalidade, através de análise computadorizada (SCA<sup>®</sup>, Microptics S.L., Espanha), durante um período de 48 horas. Um *pool* dos ejaculados de quatro reprodutores caprinos, foi dividido em cinco alíquotas de 50 µl cada, de acordo com os tratamentos: T1 (ACP-101<sup>®</sup>) – grupo controle; T2 (ACP-101<sup>®</sup> + 5% gema de ovo); T3: (ACP-101<sup>®</sup> + 10% gema de ovo); T4: (ACP-101<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*); T5: (ACP-101<sup>®</sup> + 10% *Aloe vera*). Posteriormente às diluições o sêmen foi avaliado através de análise computadorizada, tanto no tempo de 0h (sêmen fresco e diluído) quanto nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas de resfriamento. Também foi realizado o teste de vitalidade, através da coloração de eosina-nigrosina, sendo analisadas 200 células espermáticas/lâmina. Os parâmetros de motilidade progressiva (MP), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP) foram analisados através da ANOVA, e o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) foi empregado para comparação das médias correspondentes. Os outros dados (VCL – velocidade curvilínea, LIN – linearidade, ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça, MT – motilidade total e Teste de Vitalidade) foram analisados por meio do teste de Kruskal Wallis, sendo, os resultados expressos como média ± erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . No T2 foi encontrada uma MT significativamente superior nos tempos de 0 e 6 horas de resfriamento, quando comparada com os demais tratamentos. Porém nos tempos de 24 e 48 horas, o T4 obteve as melhores médias e estas não diferiram entre si (70,32% ± 4,46 e 71,60% ± 4,13, respectivamente). Quanto a MP não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos até as 12 horas de resfriamento, mas a partir das 24 horas, o T4 apresentou médias significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os tratamentos que utilizaram gema de ovo (T2 e T3), sendo semelhante ao grupo controle. No teste de vitalidade foram encontrados valores percentuais significativamente superiores no T2 (87,54% ± 2,05) quando avaliado o tempo de 0h. No decorrer da estocagem do sêmen (24 e 48 horas) foram observadas médias superiores no T4 (63,88% ± 6,20 e 60,00% ± 5,77, respectivamente) quando comparado com o T2 (37,33% ± 8,67 e 21,63% ± 7,88) e o T3 (37,00% ± 8,16 e 22,54% ± 8,89), não obtendo diferenças estatísticas com os demais tratamentos ( $p > 0,05$ ). Em conclusão, a utilização do extrato bruto de *Aloe vera* adicionado ao diluidor ACP-101<sup>®</sup>, na concentração de 5%, é capaz de manter os parâmetros espermáticos por um período de resfriamento a 4°C de até 48 horas, sendo um estudo prévio para a avaliação da interação desta substância com este diluidor, para posteriores estudos de criopreservação seminal.

Palavras-chave: Caprino. Resfriamento. ACP-101<sup>®</sup>. *Aloe vera*. Gema de ovo.

## ABSTRACT

The use of substances with potential for cryoprotection is of extreme importance for the preservation of semen and the egg yolk, most often used for this purpose. Aiming to reduce the impacts on the world market for the use of substances of animal origin, due to the possible spread of disease through artificial insemination, the objective was to evaluate the extender based on powder coconut water (PCW-101<sub>av</sub>) and the addition of egg yolk or *Aloe vera* in the cooling process of goat semen at 4°C, on the kinetic parameters and vitality, through computer analysis (SCA<sup>®</sup>, Microoptics SL, Spain) for a period of 48 hours. A *pool* of ejaculates from four male goats were divided in five aliquots of 50 µL each in accordance with the treatments: T1 (PCW-101<sub>av</sub>) - control group, T2 (PCW-101<sub>av</sub> + 5% egg yolk); T3: (PCW-101<sub>av</sub> + 10% egg yolk) and T4: (PCW-101<sub>av</sub> + 5% *Aloe vera*), T5: (PCW-101<sub>av</sub> + 10% *Aloe vera*). Aftermost to the dilution the semen was evaluated by computerized analysis, both in time 0h (fresh semen and diluted) as in the times of 6, 12, 24 and 48 hours of cooling. Also was a test of vitality, after staining with eosin-nigrosine and analyzed 200 sperm cells / smear. The parameters of progressive motility (PM), velocity straight line (VSL) and average velocity of the path (VAP) were analyzed by ANOVA and Student-Newman-Keuls test (SNK) was used to compare the corresponding averages. Other data (VCL - curvilinear velocity, LIN - linearity, ALH - amplitude of lateral head displacement, MT – total motility and Vitality Test) were analyzed using the Kruskal Wallis test, and the results expressed as mean ± average standard and the differences were deemed significant when  $p < 0.05$ . In T2, we found a significantly higher MT in the 0 and 6 hours of cooling, when compared with other treatments. But in times of 24 and 48 hours, the T4 has obtained the best averages and these did not differ ( $70.32 \pm 4.46\%$  and  $71.60\% \pm 4.13$ , respectively). As for PM were not significant differences between treatments until 12 hours of cooling, but after 24 hours, the T4 group showed significantly higher ( $p < 0.05$ ) when compared with treatments of egg yolk (T2 and T3) and was similar to control group. In the vitality test, values were significantly higher percentages in T2 ( $87.54\% \pm 2.05$ ) when evaluated time 0h. During the storage of semen (24 and 48 hours) were observed in higher average T4 ( $63.88 \pm 6.20\%$  and  $60.00\% \pm 5.77$ , respectively) when compared with T2 ( $37.33\% \pm 8.16\%$  and  $21.63\% \pm 7.88$ ) and T3 ( $37.00 \pm 8.16\%$  and  $22.54\% \pm 8.89$ ), getting no statistical differences with the other treatments ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the use of extract of *Aloe vera* added to extender PCW-101<sub>av</sub> at a concentration of 5%, is able to keep the sperm parameters for a period of cooling at 4°C up to 48 hours, being a previous study for evaluation of the interaction of this substance with this extender, for further studies of sperm cryopreservation.

**Keywords:** Goat. Cooling. PCW-101<sub>av</sub>. *Aloe vera*. Egg yolk.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e erro padrão do pH e Osmolaridade dos diluidores utilizados no experimento.....	46
Tabela 2	Média e erro padrão dos parâmetros seminais de caprinos avaliados após formação dos <i>pools</i> dos ejaculados dos quatro reprodutores em cada coleta para realização do resfriamento.....	47
Tabela 3	Média $\pm$ erro padrão da média da Motilidade Total de espermatozóides caprinos frescos diluídos em ACP-101 <sup>®</sup> e resfriados a 4°C com duas concentrações de gema de ovo (T2 – 5% e T3 – 10%) ou <i>Aloe vera</i> (T4 – 5% e T5 – 10%) por um período de 48 horas, analisados através do <i>Sperm Class Analyser</i> (SCA <sup>®</sup> , Microptics, S.L., Espanha).....	52
Tabela 4	Média $\pm$ erro padrão da Motilidade Progressiva de espermatozóides caprinos frescos, diluídos em ACP-101 <sup>®</sup> e resfriados a 4°C com duas concentrações de gema de ovo (T2 – 5% e T3 – 10%) ou <i>Aloe vera</i> (T4 – 5% e T5 – 10%) por um período de 48 horas, analisados através do <i>Sperm Class Analyser</i> (SCA <sup>®</sup> , Microptics, S.L., Espanha).....	54
Tabela 5	Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$ ), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN - %) e deslocamento lateral de cabeça (ALH - $\mu\text{m}$ ) de sêmen caprino diluído em ACP-101 <sup>®</sup> e resfriado a 4°C por um período de 48 horas.....	56
Tabela 6	Média $\pm$ erro padrão dos espermatozóides caprinos frescos, diluídos em ACP-101 <sup>®</sup> e resfriados a 4°C com duas concentrações de gema de ovo (T2 – 5% e T3 – 10%) ou <i>Aloe vera</i> (T4 – 5% e T5 – 10%) por um período de 48 horas, não corados através de eosina-nigrosina para o Teste de Vitalidade.....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Velocidades obtidas por sistemas CASA (BOYER <i>et al.</i> , 1989; VERSTENGEN <i>et al.</i> , 2002) .....	26
Figura 2	A: Representante da planta <i>Aloe vera</i> ; B: Catafilo da <i>Aloe vera</i> em corte transversal para visualização do seu parênquima.....	35
Figura 3	Extração do gel da planta <i>Aloe vera</i> . A: catafilo da planta; B: gel mucilaginoso sendo extraído; C: Filtragem do gel para auxiliar na manipulação do diluidor.....	46
Figura 4	Descrição do processamento do sêmen de quatro caprinos desde a colheita seminal até as avaliações para comprovação de motilidade e vitalidade espermática.....	50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Parâmetros de motilidade espermática obtidos através de sistemas do <i>Sperm Class Analyser</i> (SCA <sup>®</sup> , Microoptics, S.L., Espanha).....	26
Quadro 2	Composição aproximada do diluidor à base de água de coco em pó (ACP <sup>®</sup> ) em 100g (CQA, laudo n° 96300/2009 e ITAL, laudo n° CQ 4359/2009).....	31
Quadro 3	Componentes da <i>Aloe vera</i> e suas atuações (BRASIL, 2009).....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	: Microlitro
$\mu\text{m}$	: Micrômetro
$\mu\text{m/s}$	: Micrômetros por segundo
$^{\circ}\text{C}$	: Graus Celsius
ACP <sup>®</sup>	: Água de coco em pó
ALH	: Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça
ANOVA	: Análise de Variância
BCF	: Frequência do Batimento Cruzado
CAPES	: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
CASA	: Análise de Sêmen Auxiliada por Computador
I.A.	: Inseminação Artificial
IAA	: Ácido 3-indol acético
IC	: Iniciação Científica
IMA	: Integridade da Membrana Acrossomal
LIN	: Linearidade
mOsm	: Miliosmol
MP	: Motilidade Progressiva
MT	: Motilidade Total
NIB	: Núcleo Integrado de Biotecnologia
$P < 0,05$	: Probabilidade de erro menor do que 5%
PEM	: Percentagem de Espermatozóides Móveis
pH	: Potencial Hidrogeniônico
PPGCV	: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
SCA	: Sperm Class Analyzer
Sptz	: Espermatozóide
STR	: Retilinearidade
TRIS	: Hidroximetil aminometano
UECE	: Universidade Estadual do Ceará

VAP : Velocidade Média do Percurso  
VCL : Velocidade Curvilinear  
VSL : Velocidade em Linha Reta  
WHO : Organização Mundial de Saúde

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>Tecnologia do Sêmen</b> .....	21
2.1.1	<i>Avaliação da qualidade seminal</i> .....	21
2.1.1.1	<i>Técnicas convencionais de avaliação seminal</i> .....	22
2.1.1.2	<i>Análise do sêmen auxiliada por computador</i> .....	23
2.1.1.2.1	<i>Parâmetros cinéticos</i> .....	24
<b>2.2</b>	<b>Diluentes para conservação seminal</b> .....	26
2.2.1	<i>Diluentes à base de água de coco</i> .....	27
<b>2.3</b>	<b>Crioprotetores</b> .....	31
2.3.1	<i>Mecanismo de Ação</i> .....	31
2.3.2	<i>Gema de Ovo</i> .....	32
<b>2.4</b>	<b>Aloe vera</b> .....	33
<b>2.5</b>	<b>Estocagem Líquida do Sêmen</b> .....	38
2.5.1	<i>Temperatura de estocagem do sêmen resfriado</i> .....	39
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....	42
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
5.1	<i>Objetivo Geral</i> .....	43
5.2	<i>Objetivos Específicos</i> .....	43
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
6.1	<i>Local do Experimento</i> .....	44
6.2	<i>Preparação dos Diluidores</i> .....	44
6.3	<i>Coletas, Avaliação e Resfriamento do Sêmen</i> .....	45
6.4	<i>Re-diluição seminal para Análise Computadorizada e Teste de Viabilidade</i> .....	47
6.5	<i>Avaliação do Sêmen Auxiliada por Computador (CASA)</i> ..	47
6.6	<i>Teste de Viabilidade (Eosina-Nigrosina)</i> .....	47
6.7	<i>Análise Estatística</i> .....	48
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	50
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	62

<b>11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
---	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

---

Nas últimas décadas, esforços têm sido realizados no sentido de otimizar as biotécnicas da reprodução animal já existentes, objetivando com isso o aumento da sua aplicabilidade, já que a utilização das mesmas são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos (FIGUEIREDO et al., 2002).

A biotecnologia de conservação do sêmen vem se demonstrando bastante promissora, fato evidenciado pelo volume de pesquisas na área, com o objetivo principal de prolongar a viabilidade *in vitro* e o poder fecundante dos espermatozóides armazenados (FOOTE e PARKS, 1993). A necessidade do uso de reprodutores por longos períodos ou em diferentes épocas do ano estimula a pesquisa sobre a conservação de sêmen sob condições artificiais (ANDRADE, 2002), tornando-se fundamental a utilização de meios diluentes capazes de prolongar sua viabilidade (AQUILA et al., 2005).

Devido aos resultados obtidos com os primeiros estudos da água de coco *in natura* na conservação de células espermáticas realizados por Nunes em 1984, objetivou-se, mais recentemente, a elaboração de um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>). Este meio é caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco *in natura* através de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específicos para espermatozóides (NUNES e SALGUEIRO, 1999). A água de coco tem sido utilizada em biotecnologias da reprodução animal obtendo-se bons resultados na preservação do sêmen de vários animais como caprinos (RODRIGUES et al., 1994; NUNES, 1998; CAMPOS et al., 2003), ovinos (ARAÚJO, 1990; FIGUERÊDO et al., 2001), suínos (TONIOLLI e MESQUITA, 1990), peixes (CARVALHO et al., 2002; VIVEIROS et al., 2008), humanos (FAUSTINO, 2007), equinos (SOBREIRA NETO, 2008) e cães (CARDOSO et al., 2006).

A sobrevivência dos espermatozóides no plasma seminal é limitada somente há algumas poucas horas. Para manter o sêmen por um período de tempo mais longo e para resfriá-lo e até criopreservá-lo, faz-se necessária a diluição com uma solução protetora. Diferentes soluções têm sido utilizadas como diluidores para o sêmen, a maioria dos quais são variações de diluidores pré-estabelecidos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A tecnologia do sêmen caprino possui entraves com relação à criopreservação, provenientes de problemas gerados pela interação do plasma seminal com os

fosfolipídios existentes nos diluentes comumente utilizados para beneficiamento e conservação do material espermático (NUNES et al., 1982). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 2000; BALL e VO, 2001). Dessa forma, a adoção de técnicas que simplifiquem e otimizem a diluição e a conservação do sêmen resfriado viabilizará sua utilização em larga escala (ASHCROFT, 1980; PAULENZ et al., 2002). Por razões econômicas e práticas, busca-se desenvolver um método mais eficiente para a conservação do sêmen no estado líquido, isto é, resfriado, superando assim parte das dificuldades deste processo (PAULENZ et al., 2002).

Além do mais, devido a atual necessidade no controle de doenças, a supressão de substâncias de origem animal em meios de conservação de sêmen tem sido sugerida, a fim de garantir a segurança sanitária nos processos biológicos (BOUSSEAU et al., 1998; SAMPAIO NETO et al., 2002), fazendo com que a procura por um substituto para a gema de ovo seja intensificada. Além disso, a gema de ovo favorece o processo de oxidação sobre os espermatozoides, podendo promover a peroxidação dos lipídios insaturados (RODRIGUES, 1997).

Como alternativa para esta dificuldade, estipula-se o uso de produtos de origem vegetal que tenham, em sua composição, substâncias similares aos crioprotetores convencionais, que possuam simplicidade de manipulação e sejam amplamente distribuídos na natureza, além de não causarem danos irreversíveis à célula. Uma opção é a *Aloe vera*, uma planta encontrada em grande escala em diversos países do mundo e que contém muitas substâncias, dentre estas, vitaminas, proteínas, aminoácidos essenciais, mono e polissacarídeos e minerais (SKINNER, 1997; BOUDREAU e BELAND, 2006).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 *Tecnologia do Sêmen*

Produto da ejaculação normal de um reprodutor, o sêmen é composto por espermatozóides produzidos nos testículos e por uma fração líquida produzida pelas glândulas acessórias do aparelho genital masculino (CORTELL, 1981), denominada plasma seminal.

O sêmen pode ser processado de diferentes maneiras, podendo ser usado imediatamente após a coleta, puro ou diluído, resfriado ou congelado. Mesmo empregado puro, o ejaculado que um macho proporciona pode ser utilizado em um número relativamente elevado de fêmeas. Depois de diluído, o sêmen pode ser conservado resfriado a 4°C para utilização em um curto período de tempo ou congelado a -196°C em nitrogênio líquido por um período indeterminado, prolongando assim o seu emprego (NUNES, 1988).

#### 2.1.1 *Avaliação da qualidade seminal*

O método ideal para avaliar a fertilidade do reprodutor, além da sua habilidade de produzir a prenhez, é pelo exame do sêmen (HAFEZ, 1995). A avaliação da qualidade espermática geralmente está ligada ao desejo de prever a fertilidade dos reprodutores para servirem nos rebanhos ou para serem utilizados em programas de reprodução programada (CBRA, 1998). Além disso, é uma alternativa na tentativa de avaliar a fertilidade de um grande número de reprodutores, uma vez que a quantidade de fêmeas é limitada para essa avaliação *in vivo*, sendo, este exame, complementar ao exame clínico (MARTINEZ et al., 2000).

Segundo Fonseca et al. (1991), os ejaculados deverão ser analisados quanto aos itens: volume, variando de 0,2 a 2 mL; aspecto, mediante avaliação visual, podendo ser cremoso, leitoso, opalescente, seroso ou aquoso dependendo da concentração espermática; a cor, normalmente, amarelada nos caprinos e, turbilhão ou movimento de massa, sendo o resultado de motilidade, vigor e concentração espermática; motilidade espermática, expressa em percentual; vigor espermático, que representa a força do movimento que influencia a velocidade com que os espermatozóides se movimentam;

concentração espermática; percentual de espermatozóides morfológicamente normais (morfológia); provas de integridade de membrana e teste de termorresistência.

#### 2.1.1.1 *Técnicas convencionais de avaliação seminal*

No que diz respeito às avaliações microscópicas, a concentração espermática pode ser determinada com auxílio de espectrofotometria ou de microscopia óptica, utilizando-se a câmara de Neubauer (SANTOS et al., 2006). O valor médio da concentração espermática para caprinos está em torno de  $3 \times 10^9$ /mL, podendo variar entre 2,5 a  $5,0 \times 10^9$ /mL (NUNES, 2002). Avalia-se, ainda, a presença da motilidade massal, que é o movimento da massa de espermatozóides no plasma seminal (0 – 5) e a motilidade individual progressiva (MIP; 0-5), que representa o movimento em flecha de cada espermatozóide, individualmente (NUNES, 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2004). Quanto à avaliação da porcentagem de espermatozóides móveis e motilidade individual progressiva, o sêmen deve ser diluído, para visualização individualizada dos espermatozóides (EVANS e MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991; CBRA, 1998).

A viabilidade espermática está relacionada à integridade da membrana plasmática (EVANS e MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991). Esta pode ser avaliada através de colorações vitais, onde os espermatozóides que possuem integridade de membrana, não são corados (vivos) e os que possuem danos na membrana permitem a entrada do corante no citoplasma (mortos) (DERIVAUX, 1980; BEARDEN e FUQUAY, 1992). Dentre os corantes utilizados podemos citar além da eosina-nigrosina (DERIVAUX, 1980; EVANS e MAXWELL, 1990; CHEMINEAU et al., 1991; BEARDEN e FUQUAY, 1992), o azul de tripan, Giemsa (BEARDEN e FUQUAY, 1992) e o azul de bromofenol (DERIVAUX, 1980).

No processo de preservação de sêmen, especialmente o congelado, há ocorrência de danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozóides, que reduzem a motilidade e a viabilidade, impedindo o trânsito espermático no trato reprodutivo feminino e, conseqüentemente, prejudicando a fertilidade (LEBOEUF et al., 2000). Estes danos são atribuídos à ruptura da membrana espermática, causada pela formação de cristais de gelo intracelular que ocorre durante o processo de congelamento e descongelamento (MAZUR, 1984). Geralmente, as membranas afetadas são a plasmática, a acrossomal externa e a mitocondrial. A desestabilização da membrana

plasmática após a congelação assemelha-se a uma capacitação fisiológica do espermatozóide, sendo então prejudiciais ao transporte e sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino através da inseminação artificial, após sua descongelação (SALAMON e MAXWELL, 1995).

Outro teste para avaliação da integridade da membrana é o teste hiposmótico (HOST), o qual se baseia na observação da membrana espermática íntegra, que, quando exposta a uma solução hiposmótica, permite, por osmose, a passagem de água para o interior da membrana celular até que ocorra o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares, fazendo com que a cauda do espermatozóide enrole, caso este esteja viável (JEYENDRAN et al., 1984).

Os ensaios tradicionais de avaliação seminal podem ser suficientes quando é aplicada I.A. cervical com sêmen resfriado, pois há um elevado número de espermatozóides por dose, apresentando valores mínimos de motilidade total de 30% e vigor 3 (CBRA, 1998). Entretanto, quando se utiliza o sêmen criopreservado, faz-se necessária a observação de melhores taxas de vitalidade espermática (ANEL et al., 2006).

#### 2.1.1.2 *Análise do sêmen auxiliada por computador*

A técnica convencional utilizada para realizar análise seminal está sujeita a distintos graus de imprecisão, devido à subjetividade da avaliação, que é baseada na observação através de microscópio óptico. Sendo a determinação da motilidade e da morfologia especialmente susceptíveis ao erro humano (LLEÓ, 2003). Essa análise ocasiona uma ampla variedade nos resultados, devido a numerosos fatores, como o uso de diferentes procedimentos de coloração, a experiência dos técnicos, dentre outros aspectos (HIDALGO et al., 2005).

Todavia, esse método é utilizado pela maioria dos laboratórios, embora haja consciência de que devido a sua elevada subjetividade, pode apresentar resultados dispare para uma mesma amostra entre laboratórios, inclusive entre distintos observadores de um mesmo laboratório. Portanto, ao se constatar a ampla variedade das avaliações manuais nos parâmetros seminais dos espermatozóides, pesquisadores se empenharam na investigação de formas de automatização do processo de análise espermática mediante sistemas computadorizados (LLEÓ, 2003).

A Análise de Sêmen Auxiliada por Computador (CASA) é definida como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozóides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozóide e também resumos estatísticos da população espermática (AMANN e KATZ, 2004). A automatização desta análise permite maior objetividade e rapidez, uma vez que é realizada numa fração menor do tempo requerido pela avaliação subjetiva (MORTIMER, 1997).

#### 2.1.1.2.1 *Parâmetros cinéticos*

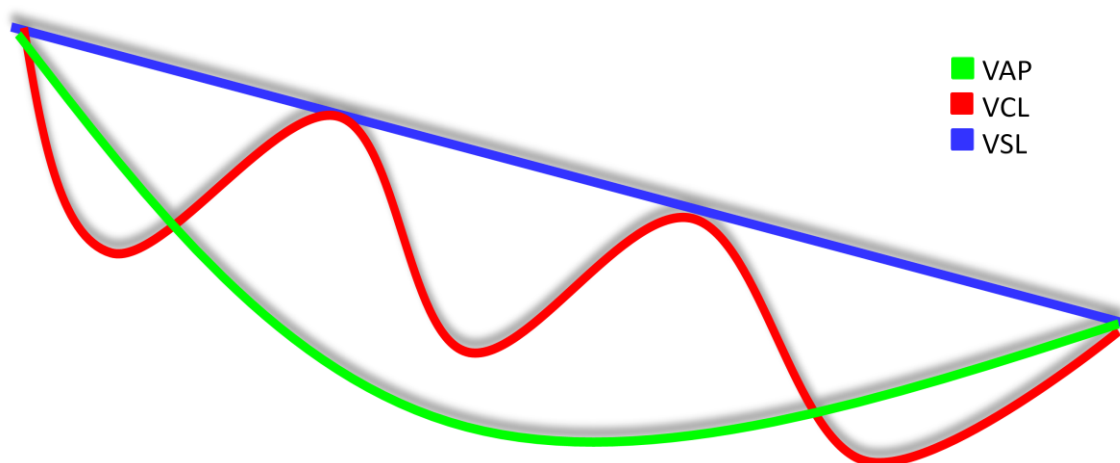
A motilidade espermática é essencial para que o espermatozóide atravesse o trato genital feminino e se desloque até o oviduto para fertilizar o oócito (CAMERON, 1977). Muitos testes para avaliação deste parâmetro, além da morfologia e do metabolismo espermático têm sido correlacionados com a fertilidade. Sendo que a avaliação da motilidade espermática é o mais amplamente utilizado, já que pode ser realizado rapidamente (FOOTE, 2003), principalmente quando se faz uso de softwares específicos para avaliação seminal.

Os parâmetros comumente obtidos através de analisadores computadorizados de sêmen (Quadro 1) são: velocidade do percurso curvilíneo (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), frequência de batimento cruzado (BCF), e deslocamento lateral da cabeça (ALH) (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

Os três parâmetros de velocidade (VCL, VAP, VSL, Figura 1), são comumente utilizados para descrição geral do movimento do espermatozóide, entretanto, para uma avaliação adicional, foram estabelecidos os parâmetros STR, LIN e WOB, que tratam das relações entre estas velocidades (MORTIMER, 1997).

*Quadro 1:* Parâmetros de motilidade espermática obtidos através do *Sperm Class Analyzer* (*Sperm Class Analyser* (SCA<sup>®</sup>, Microptics, S.L., Espanha).

Parâmetro	Sigla	Unidade	Descrição
Velocidade curvilinear	VCL	µm/s	Velocidade da trajetória real do espermatozóide
Velocidade média da trajetória	VAP	µm /s	Velocidade da trajetória média do espermatozóide
Velocidade linear	VSL	µm /s	Velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e último ponto da trajetória do espermatozóide
Linearidade	LIN	%	Relação percentual entre VSL e VCL
Retilinearidade	STR	%	Relação percentual entre VSL e VAP
Index de oscilação	WOB	%	Relação percentual entre VAP e VCL
Amplitude do deslocamento lateral da cabeça	ALH	µm	Deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real em relação à trajetória média ou linear
Frequência do batimento cruzado	BCF	Hz	Frequência que a cabeça do espermatozóide atravessa a trajetória média.



*Figura 1:* Velocidades obtidas por sistemas CASA (BOYER et al., 1989; VERSTENGEN et al., 2002).

## 2.2 *Diluentes para conservação seminal*

Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando sua divisão em doses inseminantes e proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozóides *in vitro* (DERIVAUX, 1980). Estes diferem em sua composição dependendo da espécie animal, da origem do sêmen e da tecnologia seminal empregada (HOPKINS e EVANS, 1991).

Segundo Mies Filho (1987), independente da espécie animal, um bom diluidor deve apresentar as seguintes características: ausência de toxicidade, osmolaridade igual ou próxima a do sêmen, pH favorável segundo a espécie, preparação simples e de baixo custo. Além disso, deve conter substâncias nutritivas e crioprotetoras para assegurar a sobrevivência dos espermatozóides. Os crioprotetores mais comuns utilizados para a conservação das células espermáticas incluem glicerol, açúcares (lactose, rafinose, manose, sucrose), gema de ovo e proteínas lácteas (CARNEIRO, 2002). Além disso, de acordo com Hafez e Hafez (2004), um diluente deve: proporcionar nutrientes para fonte de energia; proteger os espermatozóides do efeito deletério do frio; proporcionar um meio tampão; manter a pressão osmótica adequada; inibir o crescimento bacteriano; aumentar o volume do ejaculado; proteger as células espermáticas durante a congelação.

A dose inseminante ótima do sêmen de bodes para inseminação cervical é de  $200 \times 10^6$  espermatozóides, em um volume de 0,25 a 0,50 mL. O volume adequado para a inseminação cervical e intra-uterina seria de 0,50 a 0,20 mL, respectivamente (EVANS e MAXWELL, 1990).

Os diluentes para conservação espermática devem possuir uma substância orgânica que atue como crioprotetor externo e que proteja as células contra o choque térmico que se produz ao resfriar o sêmen desde os 20°C aos 5°C, tal como a gema de ovo ou leite desnatado; uma fonte de energia, como a glicose ou frutose; um componente tampão, como citrato de sódio ou hidroximetil aminometano (TRIS); um crioprotetor interno que proteja os espermatozóides durante o congelamento, a exemplo do glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol; e antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano, como penicilina, estreptomicina ou gentamicina (EVANS e MAXWELL, 1987).

A maioria dos diluentes apresenta a gema de ovo como componente básico, já que a fosfatidilcolina (lecitina) e as lipoproteínas da gema e a caseína do leite protegem

os espermatozóides durante o resfriamento, contra o choque térmico (MIES FILHO et al., 1982; DAS e RAJKONWAR, 1995). Porém, existe um fator a ser considerado, exclusivo do macho caprino, que é o fato das suas glândulas bulbouretrais produzirem, particularmente, uma fosfolipase (EYCE) que hidrolisa a lecitina da gema de ovo, formando ácidos graxos e lisolecitina, esta última atua sobre a membrana espermática danificando-a (ROY, 1957). Em 1982, Nunes e colaboradores, descobriram a existência de uma fração protéica do plasma (BU-III), procedente das glândulas bulbouretrais, que interage com o leite, produzindo inibição da motilidade espermática e induzindo a reação acrossômica. É provável que a EYCE e a BU-III sejam a mesma molécula (LEBOUF et al., 2000). Essa lisolecitina é tóxica devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática (NUNES, 1982).

Roy (1957) relatou a ação do plasma seminal sobre os elementos dos diluidores, no caso, a gema de ovo, mesmo estando a baixas concentrações como 2,5%. Portanto, a remoção do plasma seminal é recomendada quando os espermatozóides caprinos são conservados a baixas temperaturas em diluidores contendo gema de ovo (CORTELL, 1992). Roca et al. (2000) relataram que a remoção do plasma seminal em caprinos, pela lavagem dos espermatozóides imediatamente após a coleta, aumenta a porcentagem de células vivas e sua motilidade, durante a conservação a 5°C em diluidores contendo gema de ovo ou leite. No entanto, um estudo sobre os fosfolipídios, antes e depois da congelação, revelou que os lipídios da gema de ovo adicionados ao sêmen diluído, não foram hidrolisados a lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (CHAUAN E ANAND, 1990). Todavia, Roca et al. (1997) demonstraram que os espermatozóides não lavados de caprinos da raça Murciano-Granadina podem ser preservados a 5°C após diluição em TRIS com 2% de gema de ovo.

O uso de diluentes pobres em fosfolipídios pode contribuir para a biotecnologia da conservação dos espermatozóides caprinos, suprimindo os processos de lavagens pelo qual o sêmen deve passar antes de ser diluído nos diluentes convencionais (MACHADO e SIMPLÍCIO, 1991).

### *2.2.1 Diluentes à base de água de coco*

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (MARQUES, 1982; NUNES e COMBARNOUS, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que

conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e a viabilidade de gametas masculinos e femininos criopreservados (BLUME e MARQUES JR., 1997).

Nunes et al. (1997) observaram que o fruto ideal recomendado para a formação do diluidor deve ter seis meses de idade. Entretanto, nesta idade a água apresenta pH ácido (4,5) e osmolaridade elevada (500 mOsm), o que dificultaria a sobrevivência celular. Logo, tornou-se necessária a estabilização desta solução, que foi obtida após a adição de água destilada e citrato de sódio a 5%, constituindo assim o diluidor água de coco *in natura*.

Muitas dificuldades têm sido encontradas, particularmente com a conservação de sêmen de caprinos. É conhecido que em estação não sexual o plasma seminal deprime fortemente a motilidade individual e a porcentagem de espermatozóides vivos, quando comparados com aqueles ejaculados adquiridos durante a estação sexual (NUNES, 1980). Em 1982, Nunes e colaboradores demonstraram que este efeito deletério do plasma seminal provém das glândulas bulbouretrais que, durante a estação não sexual, tornam-se hipertrofiadas e secretam grandes quantidades de fosfolipases do tipo A, sendo esse efeito exacerbado pela interação dos fosfolipídeos presentes no meio diluidor como o leite e no próprio plasma seminal. Portanto, diluidores pobres em fosfolipídeos poderiam ser a solução para evitar ou reduzir os efeitos negativos causados pela fosfolipase A sobre o sêmen desses animais (NUNES, 1987).

Dentre as alternativas para a diminuição desta alteração, surgiu a água de coco, mostrando-se através de experimentos *in vitro* e *in vivo* um excelente diluidor para preservação do sêmen desta espécie além do comportamento esperado nas taxas de fertilidade (NUNES, 1986).

Nunes (1986, 1987), avaliando o sêmen caprino após duas horas de incubação a 37°C observou que tanto a motilidade progressiva (MP) quanto à porcentagem de espermatozóides móveis (PEM) eram superiores quando o sêmen era diluído em uma solução a base de água de coco, que em leite desnatado. A MP dos espermatozóides diluídos em água de coco quando comparados aos diluídos em leite glicosado, foi superior ao final de duas horas de incubação (NUNES e SALGUEIRO, 1999).

Resultados similares foram obtidos ao utilizar ambos os diluentes na refrigeração de sêmen a 4°C e em seu uso para inseminação artificial em cabras nas que se haviam sincronizado o estro com tratamentos hormonais. Com o uso da inseminação

artificial com sêmen caprino diluído em água de coco e refrigerado a 4°C se obtiveram taxas de parição superiores a 60% (NUNES, 1986).

Tratando de determinar a fração da água de coco que atua sobre os espermatozóides, Nunes et al. (1994) isolaram uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol acético (IAA), que ativa o metabolismo dos espermatozóides. A introdução do IAA na composição dos diluentes convencionais do sêmen de diferentes espécies conferiu aos espermatozóides um aumento de motilidade, maior taxa de fertilidade, além de permitir sua conservação durante períodos mais prolongados. A presença do IAA pode variar com o estágio de maturação e a espécie do fruto e influir nos resultados *in vitro* e *in vivo* do sêmen diluído em água de coco (NUNES E SALGUEIRO, 1999).

Nunes et al. (1996), ao compararem a fertilidade de cabras inseminadas com sêmen diluído em água de coco *in natura* ou na fração ativa da água de coco (fração B) ou em IAA (molécula ativa da água de coco), observaram taxas de parição de 60%, 65% e 69% para os três tratamentos respectivamente, resultando em prolificidade de 130%, 145% e 180%.

Diluidores de sêmen à base de água de coco apresentam como vantagens o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante no Nordeste do Brasil. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades quando à conservação por longos períodos após extração do fruto, limitações na sua disponibilidade em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos. Isto motivou o desenvolvimento do produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos em sistema de desidratação a alto vácuo. O produto ACP se caracteriza por possuir composição padronizada, obtido a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares às da água de coco *in natura* (SALGUEIRO et al., 2002). Para a conservação do sêmen caprino, a formulação ACP-101<sup>®</sup> foi desenvolvida (pH: 6,68; 342 mOsm/ kg).

Quadro 2: Composição aproximada do diluidor à base de água de coco em pó (ACP®) em 100g (CQA, laudo n° 96300/2009 e ITAL, laudo n° CQ 4359/2009)

<b>Por 100g</b>	<b>ACP/ 100g</b>
Carboidrato, por diferença (g)	76,00
Frutose (g)	7,80
Glicose (g)	6,20
Sacarose (g)	0,00
Proteína (g)	12,00
Umidade (g)	1,00
<b>Lipídios – Por 100g</b>	<b>ACP/ 100g</b>
<b>Gorduras totais (g)</b>	<b>4,00</b>
<b>Gorduras saturadas (g)</b>	<b>2,46</b>
8:0 ácido caprílico (g)	0,02
10:0 ácido caprílico (g)	0,02
12:0 ácido láurico (g)	1,41
14:0 ácido mirístico (g)	0,60
16:0 ácido palmítico (g)	0,42
<i>Gorduras monoinsaturadas (g)</i>	
18:1 ácido oléico (g)	0,12
<i>Gorduras polinsaturadas (g)</i>	0,47
18:2 ácido linoléico (g)	0,54
Gorduras trans (g)	0,00
Colesterol (mg)	0,00
<b>Vitaminas – por 100g</b>	<b>ACP/ 100g</b>
Vitamina B1 (mg), tiamina	4,55
Vitamina B2 (mg), riboflavina	0,07
Vitamina B3 (mg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	3,56
Vitamina B6 (mg), piridoxina	0,13
Vitamina C (mg), ácido ascórbico	16,51
<b>Minerais – por 100g</b>	<b>ACP/ 100g</b>
Sódio, Na (mg)	2240,00
Cálcio, Ca (mg)	492,00
Ferro, Fe (mg)	8,00
Cobre, Cu (mg)	0,38
Fósforo, P (mg)	430,00
Magnésio, Mg (mg)	510,00
Manganês, Mn (mg)	2,60
Potássio, K (mg)	5170,00
Selênio, Se (mg)	0,03
Zinco, Zn (mg)	3,30
<b>Aminoácidos – por 100g</b>	<b>ACP/ 100g</b>
Ácido Aspártico (mg)	4,73
Ácido Glutâmico (mg)	12,41
Alanina (mg)	7,63
Arginina (mg)	1,88
Cistina (mg)	Traços
Fenilalanina (mg)	4,93
Glicina (mg)	3,98
Histidina (mg)	2,36
Isoleucina (mg)	2,65
Leucina (mg)	5,15
Lisina (mg)	2,61
Metionina (mg)	1,58
Prolina (mg)	5,34
Serina (mg)	2,54
Tirosina (mg)	0,82
Treonina (mg)	1,84
Triptofano (mg)	Traços
Valina (mg)	5,23

## 2.3 Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio para que haja uma proteção do espermatozóide durante as técnicas de conservação espermática, como o resfriamento, a criopreservação e o descongelamento (SQUIRES et al., 1999; ARRUDA, 2000). São importantes para evitar a formação de gelo intracelular (MEDEIROS et al., 2002). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado no congelamento de sêmen de garanhões, uma vez que atua na proteção das estruturas celulares, tanto intra como extracelularmente; este aumenta o número de canais de solvente que permanecem não congelados e dilui as altas concentrações de sal (GRAHAM, 1994).

### 2.3.1 Mecanismo de ação

O modo pelo qual os crioprotetores atuam não se encontra totalmente elucidado. Acredita-se que estes reduzam o ponto de congelação da solução, o qual é determinado como a temperatura onde ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo puro. Numa solução contendo glicerol, no momento em que ocorrer a congelação, restará mais água descongelada do que numa solução sem glicerol, havendo, com isso, um aumento do volume dos canais de solvente não congelado e uma menor concentração de sais nesses canais (KEITH, 1998).

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, uma vez que possuem afinidade pela água, devido à presença de grupamentos amina e hidroxila, os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (BAUDOT et al., 2002). Estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

Os crioprotetores evitam a formação de gelo intracelular. O mais utilizado é o glicerol que semelhante aos agentes não penetrantes, proporciona a desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico, o qual induz a saída de água das células espermáticas (KEITH, 1998).

Apesar de imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelação, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozóide e podem resultar na redução da fertilidade após a I.A (ARRUDA, 2000), tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos

celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000). Parte da toxicidade é devida à injúria bioquímica, resultado da adição direta do crioprotetor sobre os componentes celulares, além dos danos osmóticos que podem ser observados no meio (ARRUDA, 2000). Até mesmo o glicerol deve ser utilizado com restrições devido ao seu efeito citotóxico (HOLT, 2000). Em altas concentrações podem resultar na redução da fertilidade devido a sua toxicidade, a qual pode ocasionar lesão celular, por danos osmóticos e altas concentrações nas interações entre o espermatozóide e o trato reprodutivo da fêmea (GRAHAM, 1994). Estes componentes são classificados como penetrantes e não penetrantes ou intra e extracelulares (GRAHAM, 1994; ARRUDA, 2000).

### 2.3.2 *Gema de Ovo*

A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para conservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando com isso, a membrana do espermatozóide (MOUSSA et al., 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidos e, aparentemente, induzindo a alteração transitória de sua composição, conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolípidos que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen especificamente durante o processo de resfriamento a 5°C. O uso de fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bode e touros contra o choque térmico. Lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozóide de bovinos e garranhões dos danos do processo de congelamento, possivelmente por prevenir as alterações deletérias durante a criopreservação (WILHELM et al., 1996).

A ação de revestimento espermático por menos de cinco minutos com a gema de ovo durante a diluição tem um importante efeito sobre várias características após quatro dias de armazenamento quando utilizada uma solução salina simples (pH 6 e 300 mOsm/ Kg) (DE PAUW et al., 2003).

Uma grande taxa de concentração de gema de ovo tem sido examinada em diluentes para a congelamento do sêmen ovino. Os trabalhos iniciais utilizaram 30-50%, mas subsequentemente, os investigadores incluíram uma taxa mais baixa de

concentração no diluente (SALAMON e MAXWEEL, 2000), por isso, avanços na tecnologia reprodutiva e uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva dessas populações animais são necessárias para permitir a aplicação de técnicas reprodutivas assistidas utilizando essas substâncias (YOSHIDA, 2000).

#### 2.4 *Aloe vera*

O nome *Aloe vera* seria originário do hebraico *halal* ou do árabe *alloe* (substância amarga e brilhante) e do latim *vera* (verdadeira). Ao que tudo indica é considerada uma planta poderosa há muito tempo (FREISE, 1933, citado por WIKPÉDIA, 2009).

Planta fanerogâmica, angiospérmica (WIKPÉDIA, 2009), a *Aloe vera* pertence à família das Liláceas, da qual fazem parte, a cebola, o nabo e os aspargos (MAURELLE et al., 1996). Nativa do norte da África, que possui mais de 200 espécies (WIKPÉDIA, 2009). Suas aplicações, atualmente, embora não totalmente conhecidas, expandiram-se e abrangem problemas como a artrose, a acne, a úlcera e até cardiopatias. Possui inúmeras propriedades regeneradoras, curativas, umectantes, lubrificantes e nutritivas (MAURELLE et al., 1996).

A espécie foi primeiramente descrita por Carl Linnaeus em 1753 como *Aloe perfoliata* var. *vera*, e foi novamente descrita em 1768 por Nicolaas Laurens Burman como *Aloe vera* em *Flora indica* no dia 6 de Abril, e por Philip Miller como *Aloe barbadensis* e, cerca de dez dias após, Burman no *Gardener's Dictionary* (NEWTON, 1979).

As espécies mais conhecidas como medicinais são a *Aloe vera*, que nasce em forma de tufo e produz flores amarelas e a *Aloe arborescens*, que nasce em torno de um pequeno tronco e produz flores alaranjadas e vermelhas. Além da diferença na disposição das folhas, a *Aloe arborescens* apresenta espinhos mais proeminentes nas bordas das folhas (LORENZI e MATOS, 2002).

A *Aloe vera* floresce no começo da primavera (BRASIL, 2009), crescendo em climas áridos e é amplamente distribuída na África e em outras regiões áridas (BOUDREAU e BELAND, 2006), as folhas são viscosas, pontiagudas e sua cor varia do cinza ao verde brilhante, passando pelo amarelo. Seu toque é suave, semelhante à borracha e o interior parece ser feito de geléia (Figura 2) (VELOSO e PEGLOW, 2003).

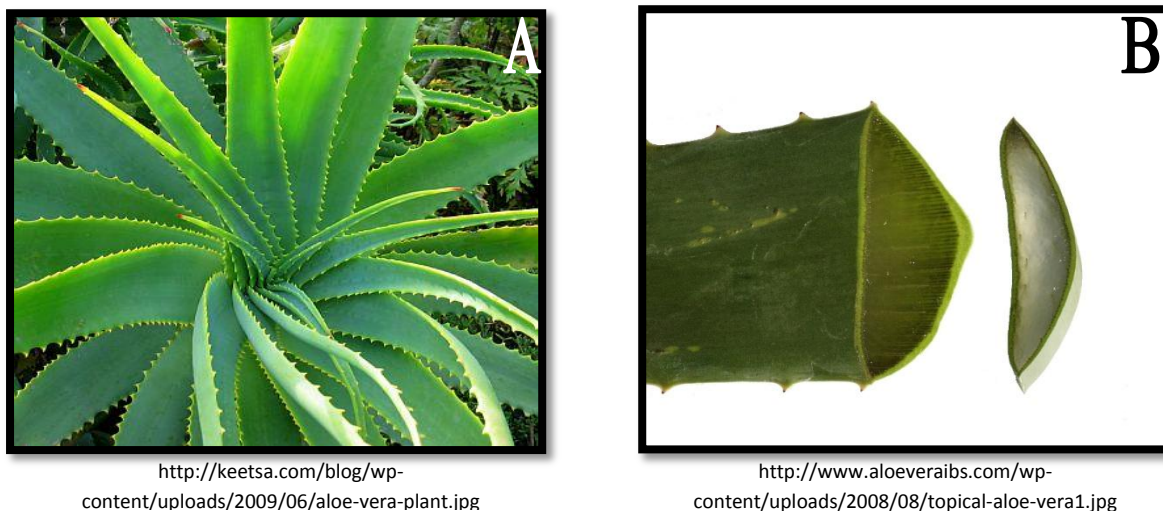


Figura 2: A: Representante da planta *Aloe vera*; B: Catafilo da *Aloe vera* em corte transversal para visualização do seu parênquima.

Em uma planta já desenvolvida, a haste se eleva, geralmente, de 60 a 90 centímetros de comprimento e 10 centímetros de largura, podendo chegar a 1,4 a 2,3 kg (WIKPÉDIA, 2009). Sua suculência permite que a espécie sobreviva em áreas de baixa precipitação natural, tornando-a ideal para jardins ornamentais e outros locais com baixa utilização de água (YATES, 2002), entretanto, intolerante a geadas muito pesadas ou neve (BBC GARDENING, 2010).

Em sua composição foram identificadas inúmeras substâncias (Quadro 3). Entre elas estão os polissacarídeos contendo glicose, galactose e xilose, tanino, esteróides, ácidos orgânicos, substâncias antibióticas, enzimas de vários tipos, resíduos de açúcar, uma proteína com 18 aminoácidos, vitaminas, minerais, sulfato, ferro, cálcio, cobre, sódio, potássio, manganês e outras (VELOSO e PEGLOW, 2003). Embora ainda não seja bem compreendido qual componente está relacionado com a atividade da *Aloe vera* (KAI et al., 2002).

A vitamina C, encontrada em grande quantidade na *Aloe vera*, ajuda a manter a saúde dos vasos sanguíneos, promovendo com isso uma boa circulação. O potássio colabora para a manutenção do ritmo cardíaco, além de estimular as funções renais. O cálcio acelera a coagulação e a ativação das enzimas, sendo também responsável pelo controle dos movimentos cardíacos. O sódio, juntamente com o potássio, estabiliza o nível de hidratação do organismo. O manganês oferece condições para que as enzimas

digestivas trabalhem com maior eficiência, impedindo a formação de cálculo renal. O ferro, juntamente com a hemoglobina, ajuda a transportar oxigênio para as células (MATOS, 1998).

A espécie é freqüentemente citada como grande utilidade na fitoterapia. Existem evidências preliminares de que o extrato de *Aloe vera* pode ser útil no tratamento de diabetes e elevação de lipídios no sangue em seres humanos (BOUDREAU e BELAND, 2006).

O extrato de *Aloe vera* tem atividades antibacterianas e antifúngicas. No entanto, as evidências para o controle sob a pele humana continuam a serem estabelecidas. Devido as suas propriedades antifúngicas, o *Aloe vera* é usado como um condicionador de água do tanque de peixes. Para bactérias, o gel da folha *Aloe vera* foi mostrado inibir o crescimento de espécies de *Streptococcus* e *Shigella in vitro*. Em contraste, o extrato e *Aloe vera* não mostrou propriedades antibióticas contra espécies de *Xanthomonas* (SATISH et al., 1999).

Mas é interessante observar que essas substâncias só podem agir com tanta eficiência graças à capacidade que a *Aloe vera* tem de penetrar nos tecidos, digerindo o tecido morto pela ação de suas enzimas e intensificando a proliferação normal das células (MATOS, 1998), reduzindo o sangramento pela ação coagulatória, regenerando o tecido (VELOSO e PEGLOW, 2003).

As qualidades nutricionais e antioxidantes da planta auxiliam a prevenir feridas no tecido epitelial e, quando ele está danificado, auxilia na sua regeneração. Antioxidantes lutam contra os radicais livres, os componentes instáveis produzidos pelo metabolismo e encontrados em poluentes ambientais (SARABIA et al., 1999).

*Aloe vera* em gel é utilizado como ingrediente comercialmente disponível em loções, iogurtes, bebidas e algumas sobremesas. Em contrapartida, o suco de *Aloe vera* é utilizado para consumo e alívio dos problemas digestivos, tais como azia e síndrome do intestino irritável. É prática comum para as empresas de cosméticos, adicionarem o extrato ou outros derivados de *Aloe vera* para produtos como maquiagem, tecidos, hidratantes, sabonetes, protetores solares, incensos e xampus (REYNOLDS, 2004). Outros usos dos extratos de *Aloe vera* incluem a diluição do sêmen para a I.A. de ovinos (GUTIÉRREZ et al., 2006), uso como conservante de alimentos frescos e em conservação da água em pequenas propriedades.

Compostos extraídos de *Aloe vera* têm sido usados como um imunoestimulante que auxilia no combate ao câncer em cães e gatos (KING et al., 1995). No entanto, este

tratamento não foi cientificamente testado em seres humanos. Sendo que a injeção dos extratos de *Aloe vera* para tratar o câncer resultou na morte de vários pacientes (SKINNER, 1997).

Quadro 3: Componentes da *Aloe vera* e suas atuações (BRASIL, 2009)

<b>Vitaminas</b>	<b>Atuação</b>
A (Beta Caroteno)	Visão, pele, ossos e contra anemia
B1 (Tiamina)	Crescimento dos tecidos e energia
B2 (Riboflavina)	Associada a vitamina B6, participa da produção de células sanguíneas
B3 (Niacina)	Participa da regulação do metabolismo
B6 (Piridoxina)	Associada a vitamina B12, participa da produção de células sanguíneas
B12 (Cianocobalamina)	Combate a anemia e problemas neuropatológicos
C (Ácido Ascórbico)	Combate às infecções e estimula o sistema imunológico
E (Tocoferol)	Juntamente com a vitamina C, combate as infecções
Ácido Fólico (Complexo B)	Auxilia na formação do sangue
<b>Mínerais</b>	<b>Atuação</b>
Fosfato de Cálcio	Crescimento de dentes e ossos, alimento do sistema nervoso
Potássio	Regula os fluidos do sangue e dos músculos, além dos batimentos cardíacos
Ferro	Absorve o oxigênio para dentro dos glóbulos sanguíneos e aumenta a resistência às infecções
Sódio	Juntamente com o potássio, regula os fluídos do corpo e transporta os aminoácidos e a glicose para dentro das células
Colina	Um dos compostos da lecitina, indispensável ao metabolismo
Magnésio e Manganês	Preservam o sistema nervoso e os músculos
Cobre	Participa da formação do sangue
Cromo	Colabora no controle do nível de açúcar no sangue, do metabolismo, da glicose e da circulação
<b>Mono e Polissacarídeos</b>	<b>Atuação</b>
Acemannan	Recentemente descoberto, tornou-se o maior foco da maioria das pesquisas sobre <i>Aloe vera</i> , vem sendo apontado como o maior responsável pela ação “milagrosa” da <i>Aloe</i> como agente contra doenças auto-imunes do tipo câncer, AIDS, reumatismo, artrite, alergias
Celulose	
Manose	
Ácido Urônico	
Alínase	
Glicose	
L-raminose	
Aldopentose	
Lipase	
<b>Aminoácidos Essenciais</b>	<b>Atuação</b>
Valina, Leucina e Isoleucina (Aminoácidos de cadeia ramificada ou BCAAs (branched chain aminoacids))	Contribuem consideravelmente para o aumento da resistência física, pois durante as atividades de longa duração são utilizados pelos músculos para o fornecimento de energia. Assim, o consumo de aminoácidos de cadeia ramificada diminui a degradação das proteínas corporais favorecendo a hipertrofia muscular
Metionina e Lisina	
Fenilalanina e Treonina	Funções cerebrais e exercem uma ação direta sobre as reações emocionais
Triptofano	
Histidina	Requerido na infância
<b>Enzimas</b>	<b>Atuação</b>
Brandiquinase	Analgésico, anti-inflamatório e estimulante do sistema imunológico
Catalase	Evita a acumulação de líquidos no corpo
Celulase	Ajuda a digerir a celulose
Creatina Fosfoquinase	Enzima muscular
Proteolitiase	Liquidifica as proteínas no seu interior
Fosfatase, Amilase e Nucleotidase	
<b>Outras Substâncias</b>	<b>Atuação</b>
Ácidos Graxos	São os ácidos instaurados indispensáveis à saúde. Dentre esses, o ácido Caprílico é utilizado no tratamento de micoses
Lignina	Penetra facilmente na pele
Saponinas	São ao mesmo tempo depurativas e anti-sépticas
Antraquinonas	Analgésicas e laxativas
Aloína	Antibiótica e cartática
Isobarbalóina	Analgésica e antibiótica
Ácido Aloético	Antibiótico
Aloe Emodina	Bactericida e Laxativa
Ácido Cinâmico	Germicida e fungicida
Óleo Etéreo	Tranquilizante
Ácido Crisofânico	Fungicida para a pele
Antranol e Resistanol	

## *2.5 Estocagem Líquida do Sêmen*

A tecnologia de resfriamento do sêmen é de grande interesse por ser capaz de manter o sêmen fértil de um a três dias e por permitir o seu transporte (BATELLIER et al., 2000). Entretanto, fatores como diluidor, temperatura de conservação, concentração final e tempo de armazenamento intervêm na conservação do sêmen no estado líquido. A interação entre esses aspectos pode exercer efeito negativo ou positivo sobre a sobrevivência espermática e, conseqüentemente, sobre a fertilidade (MAMPOUYA, 1973).

Quando o sêmen é armazenado a baixas temperaturas, deve-se ter cuidado para não submeter os espermatozoides ao choque térmico (SALAMON e MAXWELL, 2000), pois a preservação eficiente das células espermáticas com boa habilidade fertilizante é de grande importância para a conservação do sêmen (YOSHIDA, 2000). Chantler et al. (2000) mostraram que a separação dos espermatozoides do plasma seminal, resfriado a 5°C, e posterior aquecimento a 37°C não causaram nenhuma mudança na motilidade, todavia poderiam afetar outras funções espermáticas, sugerindo que a motilidade somente não é confiável para predizer a condição fisiológica do espermatozoide.

O uso do sêmen resfriado vem se tornando cada vez mais popular, aumentando significativamente seu uso durante a última década, em decorrência da praticidade e viabilidade espermática desta biotecnologia (CARNEIRO, 2002). Segundo Roca et. al. (2000), o uso efetivo de sêmen resfriado para I.A., depende da habilidade do diluidor em promover um ambiente apropriado para o espermatozoide durante sua conservação.

A conservação do sêmen por períodos curtos depende da redução reversível da motilidade e da atividade metabólica dos espermatozoides a temperaturas reduzidas (EVANS e MAXWELL, 1987; MAXWELL e SALAMON, 1993; MACHADO e SIMPLÍCIO, 1995). Apesar disso, Mathew et al. (1982) preservaram sêmen caprino em pH neutro e uma temperatura de 5°C por até 10 dias em diluente à base de TRIS, associado a 20 ou 25% de gema de ovo.

O resfriamento a 5°C revelou que os microtúbulos dos espermatozoides humanos estabilizam, mas o processo de resfriamento pode alterar algumas propriedades físicas da membrana plasmática, bem como outros aspectos da função espermática (CHANTLER et al., 2000).

Mesmo que a integridade da membrana espermática permaneça favoravelmente bem preservada por vários dias, durante o armazenamento líquido, a motilidade declina muito rapidamente (DE PAUW et al., 2003), pois é sensível a baixas temperaturas e diminui progressivamente quando o sêmen é resfriado (CHANTLER et al. 2000). Danos irreversíveis no micromotor flagelar e no DNA mitocondrial e nuclear são provavelmente a principal razão pela qual o sêmen armazenado à temperatura ambiente tem um declínio do potencial fertilizante (DE PAUW et al., 2003).

É possível que o processo de armazenamento líquido antecipe a maturação das membranas espermáticas, aumentando então a proporção de células espermáticas capacitadas e com acrossoma reagido (SALAMON e MAXWEEL, 2000). Espermatozoides capacitados têm viabilidade reduzida e vida fértil limitada (SALAMON e MAXWEEL, 2000) ou podem conferir incapacidade de fertilização se eles envelhecerem no trato reprodutivo da fêmea após inseminação cervical (MAXWEEL e WATSON, 1996). É, portanto, provável que cuidados com o resfriamento e reaquecimento do sêmen possam evitar os problemas associados com o choque térmico sem comprometer os resultados de análise do sêmen (CHANTLER et al., 2000).

### *2.5.1 Temperatura de estocagem do sêmen resfriado*

Roca et al. (2000) relataram que o sêmen caprino tem sido conservado em temperaturas variando entre 2 a 15°C, principalmente entre 4 a 5°C.

O ritmo de refrigeração do sêmen desta espécie após diluição deve estar compreendido entre 0,25 a 0,35 °C/ min até que seja atingida a temperatura de 5°C, mantendo-se desta forma a motilidade dos espermatozoides em baixos níveis por alguns dias (MACHADO E SIMPLÍCIO, 1995).

Segundo Evans e Maxwell (1987), o período máximo de conservação do sêmen a 5°C para obtenção de um grau aceitável de fertilidade através da inseminação artificial, é de 24 horas para ovinos e de 48 horas para caprinos. Já em temperaturas de 15°C, tanto o sêmen de ovinos como o de caprinos, devem ser utilizados dentro de seis a 12 horas após a conservação, em diluidores à base de leite desnatado.

A capacidade fertilizante do espermatozoide ovino é mantida por mais de 14 dias em diluidor TRIS-citrato a 5°C (STOJANOV et al., 1994, citado por MAXWELL e WATSON, 1996). Há relatos de que o sêmen ovino, assim como o de touros, pode ser

conservado durante curto tempo em ambiente de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) entre 18 a 20°C (EVANS e MAXWELL, 1987).

Testes de determinação da motilidade progressiva individual e a porcentagem de espermatozoides móveis durante 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação a 15°C, mostraram valores distintos para os espermatozoides de caprinos conservados nos diluidores água de coco e leite (NUNES e COMBARNOUS, 1995).

### 3 JUSTIFICATIVA

---

Existe a necessidade de validação de um método alternativo para conservação a 4°C de sêmen caprino utilizando a água de coco em pó (ACP-101<sup>®</sup>), associada a substâncias que possam conferir uma maior proteção dos danos causados aos espermatozóides durante os processos de conservação espermática, já que a utilização do ACP-101<sup>®</sup> isoladamente não confere crioproteção necessária para proporcionar o ambiente ideal para a manutenção da qualidade seminal até sua criopreservação.

Além disso, 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.

Portanto, tem-se buscado substâncias de origem vegetal, que possam conferir proteção semelhante ou superior ao sêmen, quando comparados com outros crioprotetores. Dentre estes produtos, a associação com a *Aloe vera*, possivelmente viabilizará a sobrevivência dos espermatozóides caprinos, quando adicionada ao diluente à base de água de coco em pó.

#### 4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

---

O diluente à base de água de coco em pó (ACP-101<sup>®</sup>) será capaz de manter e conservar as características morfofisiológicas dos espermatozóides caprinos, a 4°C, por até 48 horas, quando adicionado do líquido extraído da *Aloe vera*, o qual subsidiará o papel de crioprotetor, substituindo a gema de ovo, e alocando a água de coco em pó como um diluidor livre de moléculas de origem animal.

## 5 OBJETIVOS

---

### 5.1 Objetivo geral:

Avaliar o diluidor ACP-101<sup>®</sup> adicionado de *Aloe vera* ou gema de ovo no processo de resfriamento do sêmen caprino a 4°C, quanto aos parâmetros cinéticos e de vitalidade, através de análise computadorizada, durante um período de 48 horas.

### 5.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os parâmetros cinéticos dos espermatozóides frescos (0h) e resfriados a 4°C de caprinos, nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas, em ACP-101<sup>®</sup> adicionado de duas concentrações de *Aloe vera* ou gema de ovo (5 ou 10%);
- Avaliar a vitalidade dos espermatozóides frescos (0h) e resfriados a 4°C de caprinos, nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas, em ACP-101<sup>®</sup> adicionado de duas concentrações de *Aloe vera* ou gema de ovo (5 ou 10%), corados ou não com eosina-nigrosina.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 6.1 Local do Experimento

O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) com número de protocolo 09657319-9/05. O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da UECE. O Núcleo está localizado na cidade de Fortaleza, no Estado do Ceará, Brasil, com latitude de 3°43'47'' sul e longitude de 38°30'37'' oeste e altitude de 16 metros acima do nível do mar (IBGE/IPECE, 2009). O clima da região, de acordo com a classificação de Koppen, é AW, quente e úmido, com médias térmicas variando entre 26 a 27°C, máximas de 30°C e mínimas de 19°C.

### 6.2 Preparação dos Diluidores

Todos os tratamentos foram elaborados de acordo com a substância a ser testada (Aloe vera ou gema de ovo), sendo utilizados cinco tratamentos (T1 a T5). Para todos, foi utilizado o diluidor à base de água de coco em pó (ACP-101<sup>®</sup>), específico para a espécie caprina. Sendo realizadas as diluições do ACP-101<sup>®</sup> (PL= 3,77g; pH 7.0; 300 mOsm/ Kg H<sub>2</sub>O) em 50 mL de água destilada, conforme recomendação do fabricante. Após esta fase, foi aliqotado 10 mL do diluidor em cinco tubos Falcon. Posteriormente, cada tubo foi identificado, sendo adicionadas as concentrações específicas de gema de ovo ou *Aloe vera*, além da complementação ao diluidor de 40 mg/ 100 mL de antibiótico (gentamicina, Gentatec<sup>®</sup> – Agro Veterinária). Para obtenção do extrato bruto da planta *Aloe vera* foi realizada a retirada da camada externa do catafilo usando uma faca inox e, posteriormente, a extração do parênquima da folha, com aspecto de gel incolor. Sendo então filtrado com o auxílio de uma peneira e colocado em um recipiente de vidro para divisão dos volumes a serem adicionados às soluções específicas (Figura 3). Sendo obtidos os seguintes tratamentos:

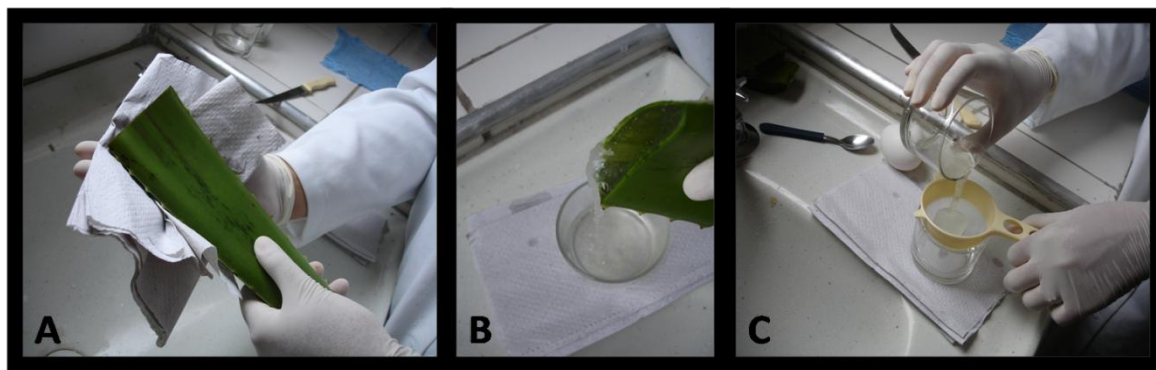
T1 = ACP-101<sup>®</sup> (grupo controle)

T2 = ACP-101<sup>®</sup> + 5% gema de ovo

T3 = ACP-101<sup>®</sup> + 10% gema de ovo

T4 = ACP-101<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*

T5 = ACP-101<sup>®</sup> + 10% *Aloe vera*



*Figura 3:* Extração do gel da planta *Aloe vera*. A: catáfilo da planta; B: gel mucilaginoso sendo extraído; C: filtragem do gel para auxiliar na manipulação do diluidor.

Após serem elaborados, os diluidores foram avaliados quanto ao pH (PH-206 / Lutron, Ribeirão Preto, São Paulo) e à osmolaridade (Osmometer Automatic – Roebing, Burladingen, Alemanha) em todos os tratamentos (T1 a T5), obtendo-se médias compatíveis com os níveis ótimos para a sobrevivência espermática (Tabela 1).

*Tabela 1:* Média e erro padrão do pH e Osmolaridade dos diluidores utilizados no experimento.

Tratamentos	pH (0-14)	Osmolaridade (mOsm/ Kg H <sub>2</sub> O)
T1 (controle)	6,68 ± 0,05	342 ± 0,70
T2	6,73 ± 0,02	353 ± 1,11
T3	6,67 ± 0,04	353 ± 0,97
T4	6,66 ± 0,03	320 ± 1,06
T5	6,59 ± 0,03	303 ± 0,99

T1: ACP-101<sup>®</sup>; T2: ACP-101<sup>®</sup> + 5% gema de ovo; T3: ACP-101<sup>®</sup> + 10% gema de ovo; T4: ACP-101<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; T5: ACP-101<sup>®</sup> + 10% *Aloe vera*

### 6.3 Coletas, Avaliação e Resfriamento do Sêmen

Foram utilizados quatro reprodutores caprinos de três raças distintas, dois Saanen, um Boer e um Murciano-Granadina, com fertilidade comprovada e idade variando de 2 a 4 anos. Os caprinos pertencem ao LTSCO e foram mantidos sob um manejo intensivo, sendo alimentados com feno de Tifton (*Cynodon sp.*) e concentrado comercial com 18% de proteína bruta, além de sal mineral e água à vontade. As coletas seminais foram realizadas com intervalos de 48 horas nos meses de novembro/2009 e

janeiro/2010. Foi obtido um total de 48 ejaculados (12 ejaculados por animal), sendo obtidos 12 *pool's*, cada um, com um mínimo de dois mililitros de sêmen. A coleta do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39°C e acoplada a um tubo coletor de vidro e graduado. Foram realizadas ao final da tarde, buscando causar o mínimo de estresse nos animais. Cada *pool* foi avaliado subjetivamente quanto ao volume (tubo graduado), concentração (câmara de Neubauer –  $10^9$  spz/mL), motilidade massal (0 a 5), percentual de espermatozóides móveis (0 a 100%) e vigor (0 a 5), de acordo com a metodologia empregada por Chemineau et al. (1991). Os valores encontrados estão expressos em média e erro padrão (Tabela 2). Três amostras de um reprodutor foram descartadas e repostas posteriormente, sendo utilizados para o experimento, somente os ejaculados com motilidade total  $\geq 80\%$ , vigor  $\geq 3$  e motilidade massal  $\geq 3$  (Tabela 2).

Posteriormente, o sêmen mantido em banho-maria a 32°C, foi aliqotado (50  $\mu$ L) em tubos *ependorf* e adicionado a 450  $\mu$ L de cada diluidor, obtendo-se uma concentração final média de  $500 \times 10^6$  spz/ mL. Após a diluição, as amostras foram acondicionadas em geladeira previamente estabilizada a temperatura de 4°C para o resfriamento do sêmen. O tempo médio deste processo foi de aproximadamente duas horas, com média de decréscimo de 0,3°C/ min.

*Tabela 2:* Média e erro padrão dos parâmetros seminais de caprinos avaliados após formação dos *pools* dos ejaculados dos quatro reprodutores em cada coleta para realização do resfriamento.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média dos <i>pools</i></b>
Volume (mL)	2,76 $\pm$ 0,34
Vigor (0 a 5 pontos)	4,4 $\pm$ 0,15
Motilidade Total (%)	93,2 $\pm$ 1,54
Motilidade Massal (0 a 5 pontos)	3,5 $\pm$ 0,22
Concentração ( $10^9$ spz/ mL)	4,6 $\pm$ 1,18

#### 6.4 Re-diluição seminal para Análise Computadorizada e Teste de Vitalidade

Ao término de cada tempo de avaliação (0, 6, 12, 24 e 48 horas), para realizar as avaliações dos ejaculados, 10  $\mu\text{L}$  de cada tratamento foi re-diluído em 200  $\mu\text{L}$  do seu respectivo diluidor (T1 a T5), atingindo uma concentração de  $40 \times 10^6$  spzt/ mL. Sendo mantidos em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ .

#### 6.5 Análises Seminais Auxiliadas por Computador (CASA)

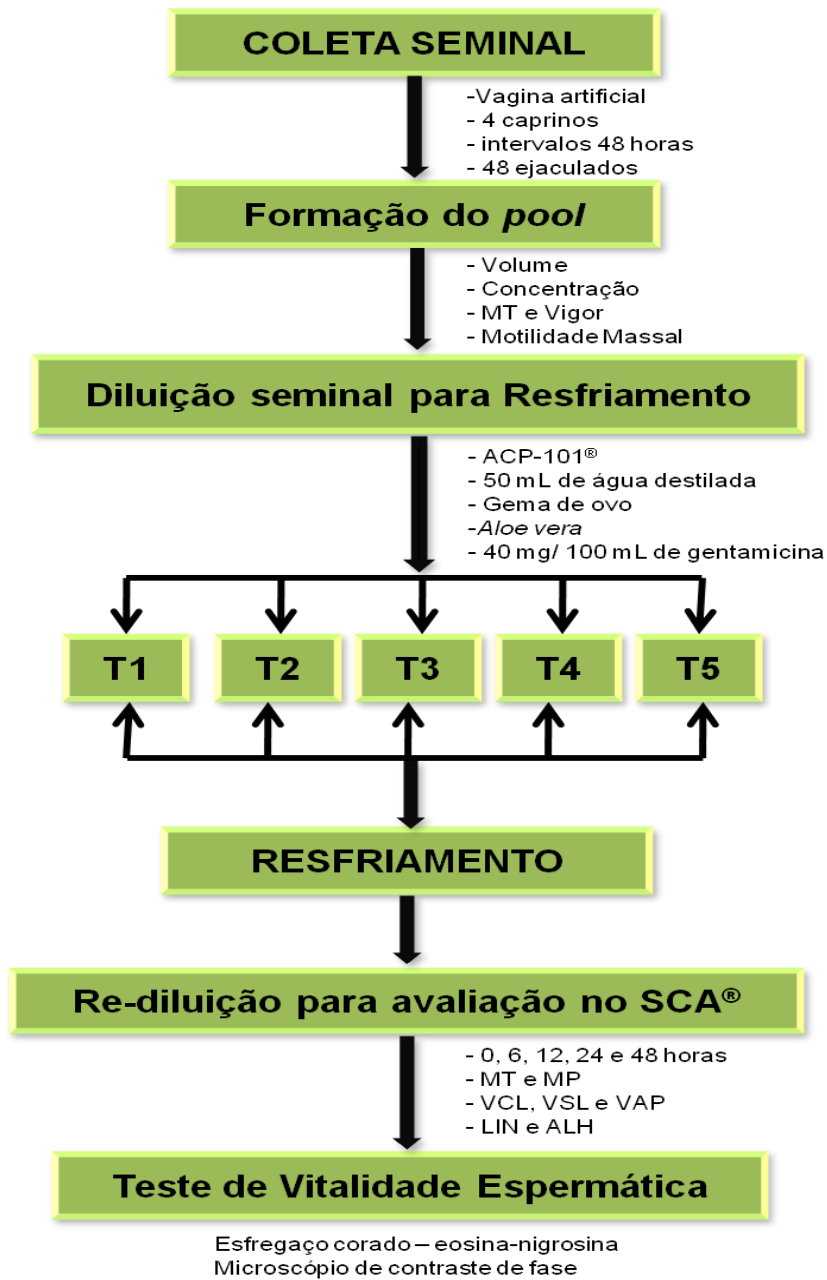
A cinética espermática foi avaliada com auxílio do programa *Sperm Class Analyser*<sup>®</sup> (SCA<sup>®</sup>, Microptics S.L, Barcelona, Espanha), tanto com o sêmen fresco diluído (0h) quanto com o sêmen resfriado (6, 12, 24 e 48 horas) a  $4^\circ\text{C}$ . A avaliação foi realizada após os cinco primeiros minutos de sua re-diluição em todos os tratamentos (T1 a T5). Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram analisadas individualmente sob lâmina e lamínula pré-aquecidas a  $37^\circ\text{C}$ . Foram utilizados os seguintes parâmetros do programa: velocidade limite para espermatozóides lentos:  $30\mu\text{m/s}$ ; limite para velocidade média:  $60\mu\text{m/s}$ ; retilinearidade mínima para espermatozóides progressivos: 80%, capturados em três campos. Um mínimo de 200 espermatozóides, por amostra foi avaliado pelo sistema CASA usando microscópio de contraste de fase, com objetiva de 10x. Dentre os parâmetros espermáticos fornecidos, foram avaliados: percentual de espermatozóides móveis (MT), percentual de espermatozóides com movimento progressivo (MP), velocidade curvilínea (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade em linha reta (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média do percurso (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN - %) e deslocamento lateral da cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ) (Figura 4).

#### 6.6 Teste de Vitalidade (Eosina-nigrosina)

Para este teste, foi realizado esfregaço em uma lâmina pré-aquecida a  $37^\circ\text{C}$  utilizando 5  $\mu\text{L}$  do corante eosina-nigrosina (eosina 1g, nigrosina 2g, citrato de sódio 3,57g e água destilada qsp. 100 mL - Baril et al., 1993), adicionado a 5  $\mu\text{L}$  do sêmen re-diluído. Um total de 200 espermatozóides foi avaliado, sendo identificados como corados (inviáveis) ou não corados (viáveis).

### *6.7 Análise Estatística*

Inicialmente os dados foram submetidos aos Testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlet para confirmação da distribuição normal e homogeneidade de variância entre tratamentos, respectivamente. Confirmado o atendimento das exigências para realização da Análise de Variância (ANOVA), esta foi executada por meio do procedimento GLM do Programa SAS (2002) e, o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) foi empregado para comparação das médias correspondentes às variáveis MP, VSL e VAP. As demais (VCL, LIN, ALH, MT e Teste de Vitalidade) não apresentaram homocedasticidade, mesmo após transformação dos dados, e foram analisadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



*Figura 4:* Descrição do processamento do sêmen de quatro caprinos desde a colheita seminal até as avaliações para comprovação de motilidade e vitalidade espermática.

## 7 RESULTADOS

---

Os parâmetros cinéticos de MT e MP estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Foram observadas diferenças significativamente superiores quanto a MT nos tempos de 0 e 6 horas de resfriamento, quando comparado o T2 com os tratamentos que utilizaram *Aloe vera* (T4 e T5) e também com o T1 (grupo controle) ( $p < 0,05$ ). Entretanto, nestes tempos, o T2 foi considerado semelhante ao tratamento que utilizou 10% de gema de ovo (T3).

Quando observados os tempos de 24 e 48 horas, o tratamento que utilizou 5% de *Aloe vera* (T4), obteve valores significativamente superiores quando comparado com os tratamentos que tinham em sua composição a gema de ovo. Mas, mostrou-se semelhante ao grupo controle (T1) e ao tratamento que utilizou 10% de *Aloe vera* (T5) ( $p > 0,05$ ), Tabela 3.

Quanto aos padrões de decréscimo no percentual da MT (Tabela 3), quando observados os tempos dentro de cada tratamento, foi ressaltado um comportamento gradual em todos os grupos do experimento. A partir das 6 horas de resfriamento o T1, T4 e T5 obtiveram médias inferiores ( $p < 0,05$ ) quando comparado com a avaliação à 0h, entretanto, após esse período pode-se observar que esta diminuição alcançou níveis constantes durante todo o experimento, não sendo observadas diferenças significativas dentro de cada tempo estudado.

Quando analisados os tratamentos que utilizaram gema de ovo (T2 e T3), estes se comportaram de forma semelhante, mantendo suas médias sem diferenças significativas até o tempo de 12 horas ( $p > 0,05$ ), mas a partir das 24 horas de resfriamento foi observada uma redução significativa em ambos os tratamentos (Tabela 3).

*Tabela 3:* Média  $\pm$  erro padrão da média da Motilidade Total de espermatozoides caprinos frescos diluídos em ACP-101<sup>®</sup> e resfriados a 4°C com duas concentrações de gema de ovo (T2 – 5% e T3 – 10%) ou *Aloe vera* (T4 – 5% e T5 – 10%) por um período de 48 horas, analisados através do *Sperm Class Analyser* (SCA<sup>®</sup>, Microptics, S.L., Espanha).

Tratamentos	0h	6h	12h	24h	48h
T1	78,82 $\pm$ 3,07 <sup>Ac</sup>	69,03 $\pm$ 4,67 <sup>ABc</sup>	57,71 $\pm$ 6,13 <sup>Bb</sup>	67,10 $\pm$ 5,05 <sup>ABab</sup>	52,96 $\pm$ 5,86 <sup>Bab</sup>
T2	93,89 $\pm$ 1,26 <sup>Aa</sup>	86,97 $\pm$ 6,77 <sup>Aa</sup>	73,57 $\pm$ 1,62 <sup>Aa</sup>	33,02 $\pm$ 13,09 <sup>Bbc</sup>	31,29 $\pm$ 13,00 <sup>Bbc</sup>
T3	88,32 $\pm$ 4,77 <sup>Aab</sup>	80,41 $\pm$ 8,80 <sup>Aab</sup>	57,09 $\pm$ 3,89 <sup>Aab</sup>	27,41 $\pm$ 11,58 <sup>Bc</sup>	19,74 $\pm$ 10,30 <sup>Bc</sup>
T4	86,93 $\pm$ 2,38 <sup>Abc</sup>	80,32 $\pm$ 2,57 <sup>ABbc</sup>	77,12 $\pm$ 4,09 <sup>ABab</sup>	70,32 $\pm$ 4,46 <sup>Ba</sup>	71,60 $\pm$ 4,13 <sup>Ba</sup>
T5	84,27 $\pm$ 2,98 <sup>Abc</sup>	66,32 $\pm$ 6,14 <sup>Bc</sup>	63,30 $\pm$ 4,75 <sup>Bb</sup>	52,65 $\pm$ 5,20 <sup>Babc</sup>	56,65 $\pm$ 7,01 <sup>Bab</sup>

Letras minúsculas na mesma coluna ( $p < 0,05$ ) e maiúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ )  
 T1: ACP-101<sup>®</sup>; T2: ACP-101<sup>®</sup> + 5% gema de ovo; T3: ACP-101<sup>®</sup> + 10% gema de ovo; T4: ACP-101<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; T5: ACP-101<sup>®</sup> + 10% *Aloe vera*

Na Tabela 4, o T2 apresentou médias significativamente superiores até as 6 horas de resfriamento quando comparado com o T1, T4 e T5 ( $p < 0,05$ ), sendo semelhante ao T3.

Em contrapartida, a partir das 12 horas, o T4 apresentou médias percentuais significativamente superiores de MP quando confrontado com os tratamentos que utilizaram gema de ovo ( $p < 0,05$ ), sendo semelhante ao controle (T1) e ao T5 (Tabela 4).

Observando ainda as médias dos percentuais de MP encontrados no estudo (Tabela 4), pode-se observar que às 24 horas de resfriamento, o T4 apresentou-se significativamente superior ao T2 e T3, e semelhante ao T1 e o T5 ( $p > 0,05$ ). Por conseguinte, o T4 comportou-se de forma semelhante, quando comparados os tratamentos no tempo de 48 horas do resfriamento.

Ao se analisar as médias dos tempos de resfriamento (0, 6, 12, 24 e 48 horas), de cada tratamento, estas apresentaram o mesmo padrão de comportamento quando avaliados os percentuais de MT.

As médias dos parâmetros cinéticos de velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do percurso (VAP), linearidade (LIN) e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) estão expostos na Tabela 5.

Quanto a VCL, os tratamentos T1, T2 e T4 apresentaram valores significativamente superiores nos tempos 0, 6 e 12 horas de resfriamento sendo semelhantes entre si. Entretanto, o T1 apresentou-se com médias significativamente

superiores quando comparado com o T3 e o T5 ( $p < 0,05$ ), e o T2 e o T4 foram considerados semelhantes a estes tratamentos.

No decorrer dos tempos analisados (24 e 48 horas), o T1 e o T4 apresentaram as médias mais elevadas ( $p < 0,05$ ), sendo estatisticamente superiores a todos os demais tratamentos (T2, T3 e T5) às 24 horas de resfriamento, entretanto, às 48 horas, o T5 comportou-se de forma semelhante ao T4.

Na variável tempo, dentro de cada tratamento, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) no tratamento com 5% de *Aloe vera* (T4), pois este manteve constantes os padrões de VCL durante todo o decorrer do experimento (0, 6, 12, 24 e 48 horas). Contudo, nos demais tratamentos, foram observadas diferenças significativas a partir das 6 horas de resfriamento ( $p < 0,05$ ).

Quando analisada a VSL, o grupo controle apresentou médias significativamente superiores ao T5 e ao T3 e T5 nos tempos de 0 e 6 horas de resfriamento, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Nestes tempos de análise, o T1 se comportou de forma semelhante aos demais tratamentos (Tabela 5).

A partir das 12 horas de resfriamento foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos T1, T2 e T4, onde estes foram superiores ao T3, e semelhantes ao T5. Às 24 horas, o T1 e o T4 foram semelhantes, mas, superiores quando comparados com os demais tratamentos. Por conseguinte, quando observado o último tempo de avaliação (48 horas), o T1 permaneceu com suas médias elevadas e foi significativamente superior a todos os outros tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Analisando a VAP, na primeira hora de avaliação (0h) todos os tratamentos se comportaram de forma semelhante ao observado na VSL. Entretanto, nas horas seguintes, 6 e 12 horas, o T1, T2 e T4 obtiveram as melhores médias e estas foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) quando comparadas com as médias do T3 e do T5 (Tabela 5).

Ao se comparar os tempos de 24 e 48 horas de avaliação da VAP (Tabela 5), o grupo controle (T1) e o grupo que utilizou 5% de *Aloe vera* (T4) foram significativamente superiores aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ), entretanto, no tempo de 48 horas, o tratamento com 10% de *Aloe vera* (T5) se comportou de forma semelhante ao T4. Neste mesmo parâmetro, dentro de cada tratamento em relação aos tempos avaliados, foi observado que o T1 e o T5 mantiveram suas médias constantes durante

todo o estudo, entretanto, nos demais tratamentos a partir das 6 horas (T3 e T4) foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A LIN e a ALH obtiveram resultados semelhantes entre os tratamentos até 6 horas de resfriamento, não sendo observadas diferenças estatísticas entre todos os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Às 12 horas de resfriamento, as médias de LIN permaneceram constantes, não sendo observadas diferenças entre os tratamentos. Mas, quando observada a ALH, o T1, T2 e T4 alcançaram as maiores médias ( $p < 0,05$ ), entretanto, o T3 e o T5 foram semelhantes ao T4 (Tabela 5).

Ainda na Tabela 5, quando observados os tempos de 24 e 48 horas, os tratamentos T1, T4 e T5 foram significativamente superiores quando comparados com os demais tratamentos estudados quanto aos parâmetros cinéticos de LIN e ALH ( $p < 0,05$ ).

*Tabela 4:* Média  $\pm$  erro padrão da Motilidade Progressiva de espermatozóides caprinos frescos, diluídos em ACP-101<sup>®</sup> e resfriados a 4°C com duas concentrações de gema de ovo (T2 – 5% e T3 – 10%) ou *Aloe vera* (T4 – 5% e T5 – 10%) por um período de 48 horas, analisados através do *Sperm Class Analyser* (SCA<sup>®</sup>, Microptics, S.L., Espanha).

Tratamentos	0h	6h	12h	24h	48h
T1	38,46 $\pm$ 1,94 <sup>Ab</sup>	35,21 $\pm$ 2,48 <sup>ABa</sup>	28,07 $\pm$ 4,00 <sup>ABab</sup>	30,62 $\pm$ 2,42 <sup>ABab</sup>	26,64 $\pm$ 2,69 <sup>Bab</sup>
T2	39,52 $\pm$ 3,80 <sup>Aab</sup>	39,83 $\pm$ 3,81 <sup>Aa</sup>	38,31 $\pm$ 6,34 <sup>Aab</sup>	13,50 $\pm$ 5,46 <sup>Bc</sup>	16,59 $\pm$ 7,15 <sup>Bbc</sup>
T3	39,01 $\pm$ 3,84 <sup>Aab</sup>	34,48 $\pm$ 4,58 <sup>Aa</sup>	25,74 $\pm$ 6,91 <sup>Ab</sup>	8,27 $\pm$ 3,70 <sup>Bc</sup>	5,96 $\pm$ 3,48 <sup>Bc</sup>
T4	45,02 $\pm$ 1,88 <sup>Aab</sup>	42,32 $\pm$ 2,70 <sup>Aa</sup>	43,47 $\pm$ 3,53 <sup>Aa</sup>	39,88 $\pm$ 3,18 <sup>Aa</sup>	31,97 $\pm$ 2,33 <sup>Ba</sup>
T5	45,61 $\pm$ 3,28 <sup>Aa</sup>	33,20 $\pm$ 3,61 <sup>ABa</sup>	35,13 $\pm$ 4,48 <sup>ABab</sup>	26,91 $\pm$ 3,85 <sup>Bb</sup>	27,75 $\pm$ 3,82 <sup>Ba</sup>

Letras minúsculas na mesma coluna ( $p < 0,05$ ) e maiúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ )

T1: ACP-101<sup>®</sup>; T2: ACP-101<sup>®</sup> + 5% gema de ovo; T3: ACP-101<sup>®</sup> + 10% gema de ovo; T4: ACP-101<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; T5: ACP-101<sup>®</sup> + 10% *Aloe vera*

Em relação ao teste de vitalidade espermática foram observadas diferenças estatísticas no tempo de 0h de resfriamento, onde o T2 apresentou-se significativamente superior quando comparado com o T1, T4 e T5, sendo semelhante ao controle. Quando observado o tempo de 12 horas de resfriamento, não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Entretanto, quando observados os tempos de 24 e 48 horas, o T4 apresentou-se significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao T2 e T3, mas em contrapartida, semelhante, aos demais tratamentos, dados apresentados na Tabela 6.

Ao observar os tratamentos, individualmente, dentro de cada tempo pode-se constatar que o T1 foi o único grupo que não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Porém, quando analisados os tratamentos que utilizaram *Aloe vera* independente da concentração adicionada, foi observada diferença significativamente superior quando comparado o tempo de 0h com os demais tempos ( $p < 0,05$ ), não sendo observadas outras diferenças.

Em contrapartida, o T2 e T3, mesmo apresentando comportamento inicial semelhante aos tratamentos com *Aloe vera*, estes com o decorrer das horas de resfriamento obtiveram uma redução acentuada no percentual de espermatozóides vivos no teste de vitalidade aplicado neste estudo ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5: Médias  $\pm$  erro padrão dos parâmetros da velocidade curvilinear (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade em linha reta (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média do percurso (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN - %) e deslocamento lateral de cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ) de sêmen caprino diluído em ACP-101<sup>®</sup> e resfriado a 4°C por um período de 48 horas.

Parâmetros Cinéticos	Tratamentos/ Tempos	0h	6h	12h	24h	48h
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	T1	121,05 $\pm$ 6,21 <sup>Aa</sup>	108,02 $\pm$ 5,73 <sup>ABa</sup>	98,82 $\pm$ 5,94 <sup>Ba</sup>	105,24 $\pm$ 4,03 <sup>ABa</sup>	104,36 $\pm$ 3,88 <sup>ABa</sup>
	T2	106,52 $\pm$ 8,05 <sup>Aab</sup>	101,13 $\pm$ 6,28 <sup>Aa</sup>	88,01 $\pm$ 11,83 <sup>Aa</sup>	40,64 $\pm$ 11,99 <sup>Bc</sup>	37,41 $\pm$ 13,35 <sup>Bc</sup>
	T3	95,97 $\pm$ 7,69 <sup>Ab</sup>	81,55 $\pm$ 5,68 <sup>ABb</sup>	57,36 $\pm$ 13,27 <sup>Bb</sup>	26,54 $\pm$ 8,44 <sup>Cc</sup>	17,14 $\pm$ 21,84 <sup>Cc</sup>
	T4	106,45 $\pm$ 4,15 <sup>Aab</sup>	99,48 $\pm$ 3,46 <sup>Aa</sup>	95,57 $\pm$ 4,14 <sup>Aa</sup>	98,82 $\pm$ 2,76 <sup>Aa</sup>	90,87 $\pm$ 5,46 <sup>Aab</sup>
	T5	87,14 $\pm$ 4,21 <sup>Ab</sup>	80,11 $\pm$ 2,57 <sup>ABb</sup>	72,42 $\pm$ 6,97 <sup>Bb</sup>	83,26 $\pm$ 3,15 <sup>ABb</sup>	78,34 $\pm$ 4,09 <sup>ABb</sup>
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	T1	79,75 $\pm$ 10,28 <sup>Aa</sup>	73,42 $\pm$ 5,51 <sup>Aa</sup>	64,93 $\pm$ 4,85 <sup>Aa</sup>	68,97 $\pm$ 2,35 <sup>Aa</sup>	68,12 $\pm$ 3,56 <sup>Aa</sup>
	T2	68,54 $\pm$ 5,88 <sup>Aab</sup>	67,04 $\pm$ 4,79 <sup>Aab</sup>	58,94 $\pm$ 8,02 <sup>Aa</sup>	27,98 $\pm$ 8,74 <sup>Bc</sup>	25,83 $\pm$ 9,99 <sup>Bc</sup>
	T3	63,67 $\pm$ 5,99 <sup>Aab</sup>	52,10 $\pm$ 4,27 <sup>ABb</sup>	37,93 $\pm$ 8,94 <sup>Bb</sup>	18,18 $\pm$ 6,09 <sup>Cc</sup>	10,99 $\pm$ 4,95 <sup>Cc</sup>
	T4	72,07 $\pm$ 2,94 <sup>Aab</sup>	68,04 $\pm$ 3,50 <sup>Aab</sup>	66,01 $\pm$ 3,43 <sup>Aa</sup>	70,99 $\pm$ 2,53 <sup>Aa</sup>	58,55 $\pm$ 5,06 <sup>Ab</sup>
	T5	57,77 $\pm$ 4,86 <sup>Ab</sup>	52,07 $\pm$ 3,08 <sup>Ab</sup>	49,36 $\pm$ 5,72 <sup>Aab</sup>	54,51 $\pm$ 4,95 <sup>Ab</sup>	50,98 $\pm$ 3,87 <sup>Ab</sup>
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	T1	101,66 $\pm$ 5,77 <sup>Aa</sup>	92,15 $\pm$ 5,71 <sup>Aa</sup>	82,68 $\pm$ 5,53 <sup>Aa</sup>	88,29 $\pm$ 3,11 <sup>Aa</sup>	87,45 $\pm$ 4,17 <sup>Aa</sup>
	T2	88,27 $\pm$ 7,09 <sup>Aab</sup>	85,12 $\pm$ 5,99 <sup>Aa</sup>	74,33 $\pm$ 10,00 <sup>Aa</sup>	32,89 $\pm$ 10,18 <sup>Bc</sup>	30,98 $\pm$ 11,72 <sup>Bc</sup>
	T3	80,28 $\pm$ 7,01 <sup>Aab</sup>	66,70 $\pm$ 5,26 <sup>ABb</sup>	47,98 $\pm$ 11,28 <sup>Bb</sup>	21,58 $\pm$ 7,09 <sup>Cc</sup>	13,75 $\pm$ 6,13 <sup>Cc</sup>
	T4	90,42 $\pm$ 3,35 <sup>Aab</sup>	84,81 $\pm$ 3,50 <sup>ABa</sup>	81,23 $\pm$ 3,78 <sup>ABa</sup>	84,88 $\pm$ 2,66 <sup>ABa</sup>	73,27 $\pm$ 5,65 <sup>Bab</sup>
	T5	70,58 $\pm$ 5,36 <sup>Ab</sup>	64,08 $\pm$ 3,30 <sup>Ab</sup>	59,34 $\pm$ 6,87 <sup>Ab</sup>	65,00 $\pm$ 5,12 <sup>Ab</sup>	62,34 $\pm$ 4,69 <sup>Ab</sup>
LIN (%)	T1	65,88 $\pm$ 1,48 <sup>Aa</sup>	67,66 $\pm$ 2,96 <sup>Aa</sup>	65,68 $\pm$ 3,30 <sup>Aa</sup>	65,98 $\pm$ 2,26 <sup>Aa</sup>	65,67 $\pm$ 2,34 <sup>Aa</sup>
	T2	63,98 $\pm$ 2,32 <sup>Aa</sup>	65,70 $\pm$ 2,37 <sup>Aa</sup>	60,18 $\pm$ 6,14 <sup>Aa</sup>	38,10 $\pm$ 8,87 <sup>Bb</sup>	31,34 $\pm$ 10,09 <sup>Bb</sup>
	T3	65,89 $\pm$ 2,38 <sup>Aa</sup>	63,08 $\pm$ 2,01 <sup>Aa</sup>	44,05 $\pm$ 9,55 <sup>ABa</sup>	38,01 $\pm$ 10,00 <sup>ABb</sup>	25,03 $\pm$ 9,16 <sup>Bb</sup>
	T4	67,96 $\pm$ 1,73 <sup>ABa</sup>	68,10 $\pm$ 2,07 <sup>ABa</sup>	69,13 $\pm$ 1,95 <sup>ABa</sup>	71,97 $\pm$ 2,00 <sup>Aa</sup>	63,44 $\pm$ 2,61 <sup>Ba</sup>
	T5	65,15 $\pm$ 3,00 <sup>Aa</sup>	64,90 $\pm$ 3,27 <sup>Aa</sup>	66,88 $\pm$ 3,00 <sup>Aa</sup>	64,56 $\pm$ 4,67 <sup>Aa</sup>	64,37 $\pm$ 2,94 <sup>Aa</sup>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	T1	2,96 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	2,73 $\pm$ 0,14 <sup>Aa</sup>	2,69 $\pm$ 0,16 <sup>Aa</sup>	2,82 $\pm$ 0,12 <sup>Aa</sup>	2,80 $\pm$ 0,11 <sup>Aa</sup>
	T2	2,87 $\pm$ 0,15 <sup>Aa</sup>	2,72 $\pm$ 0,13 <sup>Aa</sup>	2,21 $\pm$ 0,34 <sup>ABa</sup>	1,20 $\pm$ 0,37 <sup>BCb</sup>	1,02 $\pm$ 0,38 <sup>Cb</sup>
	T3	2,61 $\pm$ 0,15 <sup>Aa</sup>	2,60 $\pm$ 0,08 <sup>Aa</sup>	1,64 $\pm$ 0,36 <sup>Bb</sup>	0,94 $\pm$ 0,31 <sup>Cb</sup>	0,62 $\pm$ 0,28 <sup>Cb</sup>
	T4	2,63 $\pm$ 0,11 <sup>Aa</sup>	2,50 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	2,50 $\pm$ 0,08 <sup>Aab</sup>	2,48 $\pm$ 0,09 <sup>Aa</sup>	2,73 $\pm$ 0,09 <sup>Aa</sup>
	T5	2,54 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	2,53 $\pm$ 0,13 <sup>Aa</sup>	2,28 $\pm$ 0,10 <sup>Ab</sup>	2,76 $\pm$ 0,20 <sup>Aa</sup>	2,63 $\pm$ 0,20 <sup>Aa</sup>

Letras minúsculas na mesma coluna ( $p < 0,05$ ) e maiúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ )

T1: ACP-101<sup>®</sup>; T2: ACP-101<sup>®</sup> + 5% gema de ovo; T3: ACP-101<sup>®</sup> + 10% gema de ovo; T4: ACP-101<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; T5: ACP-101<sup>®</sup> + 10% *Aloe vera*

*Tabela 6:* Média  $\pm$  erro padrão dos espermatozóides caprinos frescos, diluídos em ACP-101<sup>®</sup> e resfriados a 4°C com duas concentrações de gema de ovo (T2 – 5% e T3 – 10%) ou *Aloe vera* (T4 – 5% e T5 – 10%) por um período de 48 horas, não corados através de eosina-nigrosina para o Teste de Vitalidade.

Tratamentos	0h	6h	12h	24h	48h
T1	78,54 $\pm$ 2,53 <sup>Ab</sup>	71,46 $\pm$ 3,61 <sup>Aa</sup>	65,50 $\pm$ 4,52 <sup>Aa</sup>	65,67 $\pm$ 3,72 <sup>Aa</sup>	64,92 $\pm$ 4,45 <sup>Aa</sup>
T2	87,54 $\pm$ 2,05 <sup>Aa</sup>	72,67 $\pm$ 5,01 <sup>Ba</sup>	66,58 $\pm$ 7,77 <sup>Ba</sup>	37,33 $\pm$ 8,67 <sup>Cb</sup>	21,63 $\pm$ 7,88 <sup>Cb</sup>
T3	83,38 $\pm$ 2,93 <sup>Aab</sup>	74,25 $\pm$ 6,14 <sup>ABa</sup>	61,83 $\pm$ 7,22 <sup>Ba</sup>	37,00 $\pm$ 8,16 <sup>Cb</sup>	22,54 $\pm$ 8,89 <sup>Cb</sup>
T4	77,79 $\pm$ 1,62 <sup>Ab</sup>	67,29 $\pm$ 3,52 <sup>Ba</sup>	66,58 $\pm$ 3,23 <sup>Ba</sup>	63,88 $\pm$ 6,20 <sup>Ba</sup>	60,00 $\pm$ 5,77 <sup>Ba</sup>
T5	75,71 $\pm$ 3,06 <sup>Ab</sup>	64,54 $\pm$ 4,26 <sup>Ba</sup>	63,71 $\pm$ 3,03 <sup>Ba</sup>	54,58 $\pm$ 6,85 <sup>Bab</sup>	55,00 $\pm$ 4,59 <sup>Ba</sup>

Letras minúsculas na mesma coluna ( $p < 0,05$ ) e maiúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ )

T1: ACP-101<sup>®</sup>; T2: ACP-101<sup>®</sup> + 5% gema de ovo; T3: ACP-101<sup>®</sup> + 10% gema de ovo; T4: ACP-101<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; T5: ACP-101<sup>®</sup> + 10% *Aloe vera*

## 8 DISCUSSÃO

---

Ao estudar um diluidor para caprinos, pobre em fosfolipídios e abundante no Nordeste do Brasil, foi desenvolvido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará junto com a Empresa ACP Biotecnologia o diluidor água de coco em pó (ACP<sup>®</sup>). Este processo buscou viabilizar um meio alternativo, de baixo custo e de simples acesso para os produtores, centrais de pesquisas e bancos de germoplasma. Além disso, a substituição dos componentes do diluidor, como a gema de ovo, é outro entrave a ser solucionado. Possivelmente a composição de origem vegetal presente no ACP- 101<sup>®</sup> (açúcares, aminoácidos, vitaminas e minerais) em especial a frutose, principal fonte de energia utilizada pelo espermatozóide (BALL E PETERS, 2006), contribuiu para a manutenção da qualidade espermática encontrada neste estudo.

O *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) permite uma avaliação objetiva e precisa, não somente sobre a proporção de células móveis em uma amostra de sêmen, mas também sobre a qualidade do movimento das mesmas. As trajetórias do espermatozóide são individualmente determinadas pela função flagelar. Características como velocidade, frequência de batimento flagelar e amplitude do deslocamento irão, corretamente, refletir a condição fisiológica de cada célula (VERSTEGEN et al., 2002), auxiliando de forma mais precisa na apuração dos dados reais deste trabalho.

A motilidade é a mais importante característica de viabilidade espermática e capacidade fecundante do ejaculado (JANUSKAUSKAS et al., 1999). Quando observadas as taxas de motilidade total do tratamento utilizando 5% de *Aloe vera* estas foram superiores (0h:  $86,93 \pm 2,38$ ; 6h:  $80,32 \pm 2,57$ ; 12h:  $77,12 \pm 4,09$ ; 24h:  $70,32 \pm 4,46$ ; 48h:  $71,60 \pm 4,13$ ) às taxas encontradas por Viana et al. (2006), quando estes utilizaram TRIS-2,5% gema de ovo no resfriamento seminal de caprinos durante o mesmo período de 48 horas (0h:  $84,06 \pm 8,46$ ; 6h:  $77,66 \pm 13,96$ ; 12h:  $69,75 \pm 23,63$ ; 24h:  $56,28 \pm 26,62$ ; 48h:  $40,62 \pm 29,61$ ). Quando comparados os tratamentos que utilizaram gema de ovo em sua composição (T2 e T3) com os valores encontrados por esses autores, até seis horas de resfriamento, estes, também foram inferiores. Após esse período (24 e 48 horas), a média encontrada por Viana et al. (2006) foi superior ( $56,28 \pm 26,62\%$  e  $40,62 \pm 29,61\%$ ). A diferença encontrada entre os resultados obtidos neste trabalho pode estar relacionada ao alto percentual de gema adicionado ao diluidor (5% e 10%), que apesar de seus constituintes apresentarem ação preservadora sobre o

metabolismo, motilidade e fertilidade de espermatozoides conservados a baixas temperaturas (O'SHEA E WALLIS, 1967), podendo estar relacionada ao produto das glândulas bulbouretrais dos caprinos, produzem uma fosfolipase (EYCE), que hidrolisa a lecitina da gema de ovo, formando ácidos graxos e lisolecitina. Estes produtos atuam sobre a membrana espermática, danificando-a (ROY, 1957), sendo passível de estar relacionado com a diminuição da motilidade nos tratamentos que utilizaram a gema de ovo. Essa lisolecitina é tóxica devido a sua ação detergente sobre os lipídios da membrana plasmática (NUNES, 1982).

O movimento espermático pode ser influenciado por fatores como: temperatura de análise, processamento do sêmen, concentração espermática e defeitos quanto a sua morfologia (GRAVANCE et al., 1998). A motilidade progressiva é importante, pois fornece uma avaliação aproximada da vitalidade do sêmen (BALL E PETERS, 2006), podendo ser correlacionada positivamente com a fertilidade (CORTELL, 1981).

Quando utilizada a água de coco *in natura* para o resfriamento do sêmen caprino as motilidades espermáticas encontradas por Campos et al. (2004) foram de 68,61%  $\pm$  2,46; 53,14%  $\pm$  3,10; 38,97%  $\pm$  3,28, nos tempos de 0, 24 e 48 horas, respectivamente. Quando confrontado com os dados do presente estudo nos tratamentos que utilizaram ACP-101<sup>®</sup> adicionado ou não de *Aloe vera* (T1: 78,82%  $\pm$  3,07; 67,10%  $\pm$  5,05; 52,96%  $\pm$  5,86, T4: 86,93%  $\pm$  2,38; 70,32%  $\pm$  4,46; 71,60%  $\pm$  4,13 e T5: 84,27%  $\pm$  2,98; 52,65%  $\pm$  5,20; 56,65%  $\pm$  7,01) estes foram superiores, mostrando que a padronização e estabilização do produto água de coco, na forma de pó, ressaltou ainda mais a característica conservadora e nutritiva deste diluidor.

A capacidade da planta *Aloe vera* de aumentar a permeabilidade celular (MATOS, 1998), pode ter contribuído para a redução nos resultados do teste de viabilidade quando são comparados aos tratamentos com gema de ovo, principalmente nas primeiras horas do resfriamento (0 e 6h). Outro questionamento está relacionado com a padronização da *Aloe vera* já que neste trabalho foi utilizado o extrato bruto da planta. Isto pode ter contribuído para alguma modificação nos parâmetros espermáticos, mesmo sem ter demonstrado variações de pH e osmolaridade no diluidor. Para constatação desta influência nos resultados, é necessária a realização de testes mais específicos e comparações com outros extratos sintéticos extraídos da referida planta. Entre eles a avaliação da membrana acrossomal, morfometria, anormalidades espermáticas, além do teste de fertilidade para comprovação *in vivo* do real potencial dos espermatozoides conservados nesse meio.

Em contrapartida, a viscosidade do gel mucilaginoso da *Aloe vera* utilizado no experimento possivelmente poderá ter interferido na diminuição dos parâmetros de velocidade encontrados nesta pesquisa, mas vale ressaltar que, mesmo com padrões inferiores, os parâmetros foram constantes durante todo o processamento e análise do sêmen. Além disso, as qualidades nutricionais e antioxidantes da planta, em associação, auxiliaram a manutenção do padrão da qualidade espermática obtido neste estudo, já que os antioxidantes lutam contra os radicais livres, componentes instáveis produzidos pelo metabolismo do corpo retardando o envelhecimento celular (SARABIA et al., 1999).

Relatos na literatura utilizando o gel de *Aloe vera* são datados da década de 80. Onde, Rodriguez et al. (1988) utilizaram o gel desta planta para substituição do diluidor seminal na inseminação cervical e intrauterina em ovelhas. Por conseguinte, em 2006, Gutiérrez e colaboradores utilizaram a *Aloe vera* para congelação do sêmen ovino encontrando 70% de espermatozóides vivos (0h) com a adição de 40% desta substância ao diluidor e, com 90 dias de estocagem a taxa atingiu 60%. Estes resultados foram considerados satisfatórios, entretanto, quando comparados com os obtidos no presente estudo, são inferiores, pois no mesmo tempo de avaliação (0h) foi observada a média de 86,93% de MT mesmo utilizando uma concentração oito vezes menor que a empregada pelos autores anteriormente citados.

Outro parâmetro, a linearidade, é calculado como  $VSL/VCL \times 100$ . A elevada linearidade acontece quando a velocidade curvilínea apresenta baixa amplitude de deslocamento de cabeça (ALH) e em geral o movimento é quase que o mesmo observado em linha reta (MORTIMER, 1997). Neste estudo resultados superiores de linearidade foram mantidos quando foi utilizado o ACP-101<sup>®</sup>, associado ou não ao extrato da *Aloe vera* para a conservação dos espermatozóides.

Mesmo os tratamentos com *Aloe vera* apresentando semelhança estatística com o grupo controle (ACP-101<sup>®</sup>), o único tratamento que permitirá uma I.A. é o tratamento que utilizou 5% de *Aloe vera*, já que é o tratamento que manteve os padrões mínimos de qualidade espermática, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal em 1998, que enfatiza que o padrão de motilidade mínimo deve ser de 30%.

Além disso, já que o resfriamento é o primeiro passo para os processos de criopreservação, mesmo o T1 apresentando valores considerados semelhantes aos tratamentos que utilizaram *Aloe vera*, o diluidor sozinho não tem a capacidade de manter os espermatozóides viáveis durante os processos de congelação/descongelação.

A deficiência de trabalhos utilizando a *Aloe vera* como componente e aditivo do diluidor seminal dificultou a comparação destes resultados com a literatura. Sendo assim tornam-se necessárias novas pesquisas envolvendo o ACP<sup>®</sup> associado a *Aloe vera*, para que possam enfatizá-los como substâncias ideais para a manutenção da sobrevivência e da qualidade espermáticas.

## 9 CONCLUSÕES

---

A utilização do extrato bruto de *Aloe vera* adicionado ao diluidor ACP-101<sup>®</sup>, na concentração de 5%, é capaz de manter os parâmetros espermáticos por um período de resfriamento a 4°C de até 48 horas, sendo um estudo prévio para a avaliação da interação desta substância com este diluidor.

Além do mais, a *Aloe vera* pode ser considerada um crioprotetor eficiente na conservação das células espermáticas de machos caprinos, em substituição à gema de ovo, para sua posterior utilização nos processos de criopreservação, já que o diluidor ACP-101<sup>®</sup>, sozinho, não tem a capacidade de proteger os espermatozóides durante as fases deste processo.

## 10 PERSPECTIVAS

---

- Estudar a viabilidade e fertilidade do sêmen caprino, diluído em água de coco em pó (ACP-101<sup>®</sup>) e resfriado a 4°C adicionado de *Aloe vera*, a fim de promover a melhoria da sobrevivência das células espermáticas, permitindo desta forma, seu emprego a longas distâncias e em locais de difícil acesso;
- Elucidar o mecanismo de ação da *Aloe vera* adicionada ao diluidor ACP-101<sup>®</sup> no sêmen caprino;
- Estudar a composição da planta *Aloe vera* objetivando enfatizar quais os componentes que são responsáveis pela crioproteção e, posteriormente estabelecer o protocolo ideal para a conservação do sêmen na espécie caprina para a aplicação em programas de inseminação artificial;
- O desenvolvimento de novos protocolos com o intuito de prolongar a sobrevivência dos espermatozóides sob condições artificiais a partir de um melhor entendimento sobre a atuação do extrato de *Aloe vera* poderá se constituir em linhas de pesquisa em programas de conservação do sêmen caprino.

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n.3, p.317-325, 2004.
- ANDRADE, M.M.J. Insulina e hipoglicemiantes orais. In: *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, São Paulo: Guanabara Koogan, 2002, 345-353.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, E.; DE PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction of Domestic Animals**, v.41, n.2, p.30-42, 2006.
- AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E.; CATALANO, S.; ANDO, S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinol.** 146, 552-557, 2005.
- ARAUJO, I. S. *Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluidor do sêmen ovino*. Fortaleza, 1990. 35f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE), Fortaleza, Ceará, 1990.
- ARRUDA, R. P. *Avaliação dos efeitos dos diluentes e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso da microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análise computadorizada da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. São Paulo, 2000, 130f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2000.
- ASHCROFT, S.J. Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. **Diabetologia**, 18, 5-15, 1980.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Reprodução em bovinos. 3ed. São Paulo: Roca, 2006, p.27-37.
- BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, 1993, p.121-170.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2000.
- BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M. L.; FAUSTO, R Thermal study of simple aminoalcohol solution, **Cryobiology**, v.44, p.150-160, 2002.

BBC GARDENING, *Aloe vera*". British Broadcasting Corporation. Disponível em:[http://www.bbc.co.uk/gardening/plants/plant\\_finder/plant\\_pages/7686.shtml](http://www.bbc.co.uk/gardening/plants/plant_finder/plant_pages/7686.shtml) > Data de acesso: 12 de fevereiro de 2010.

BEARDEN, H. J.; FUQUAY, J. W. Applied Animal Reproduction. New Jersey: Prentice-Hall, 1992, 478p.

BLUME, H.; MARQUES JR., A. P. V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murúdeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, p.97-104, 1997.

BOUDREAU, M. D.; BELAND, F. A. Uma avaliação das propriedades biológicas e toxicológicas de *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*". **Jornal da ciência ambiental e da saúde. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicologia**, v.24, p.103-54, 2006.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.

BOYERS, S. P.; DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Automated semen analysis. **Current. Prob. Obstetr. Gynecol.**, v.12, p.167-200, 1989.

BRASIL, A. V. F. **Brasil Aloe vera Forever**. Disponível em: <<http://www.nossosaopaulo.com.br/AloeVeraForever/>>, Data de acesso: 15 de dezembro de 2009.

CAMERON, R. D. Semen collection and evaluation in the ram. The effect of method of stimulation on response to eletroejaculation. **Australian Veterinary Journal**, v.53, n.8, p.380-383, 1977.

CAMPOS, A. C. N.; NUNES, J. F.; MONTEIRO, A. W. U.; FIGUEIRÊDO, E. L.; PINHEIRO, J. H. T.; FERREIRA, M. A. L.; ARAÚJO, A.A. Viabilidade do sêmen caprino lavado e não lavado diluído em água de coco, resfriado e armazenado a 4°C, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.11, p.178-182, 2004.

CAMPOS, A.C. N.; NUNES, J. F.; MONTEIRO, A. W. U.; PINHEIRO, J. H. T.; FERREIRA, M. A. L.; ARAÚJO, A. A.; CRUZ, J. F. Conservação do sêmen caprino a 4°C durante o período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 4, p.620-624, 2003.

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

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

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

CHANTLER, E.; ABRAHAM-PESKIR, J. V.; LITTLE, S.; MCCANN, C.; MEDENWALDT, R. Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. **Cryobiology**, v.41, p.125-134, 2000.

CHAUHAN, M. S.; ANAND, S. R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. **Theriogenology**, v.34, p.1003-1013, 1990.

CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. **Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1991, 223p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 2ª Ed., Belo Horizonte, 1998.

CORTELL, J. M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. Nouzilly – Fance: INRA, 1981, 28p.

CORTELL, J. M. Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. In: Proc. 5<sup>TH</sup> Int. Conf. on Goats., vol. II, New Delhi, India, 1992, p. 290-297.

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.

DAS, K. K.; RAJKONWAR, C. K. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. **International Journal of Animal Science**, v.10, p.127-128, 1995.

DE PAUW, I. M. C.; VAN SOOM, A.; MINTIENS, K.; VERBERCKMOES, S.; KRUIF, A. In vitro of bovine spermatozoa stored at room temperature under Epididymal conditions. **Theriogenology**, v.59, p. 1093-1107, 2003.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos Animais Domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1980. In: EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 192p.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, London, 1987, 194p.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.251-260, 1996.

FAUSTINO, L. R. Sêmen humano criopreservado em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-113). Fortaleza, 2007. 58p. II. Monografia (Curso de Ciências

Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Ciências Biológicas. Fortaleza, Ceará, 2007.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo: Varela, 2002, pp. 227-260.

FIGUERÊDO, E. L.; MONTEIRO, A. W. U.; SILVA FILHO, A. H. S.; CAMPOS, A.C. N.; NUNES, J. F. Avaliação in vitro do sêmen ovino resfriado diluído em água de coco previamente criopreservado em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.1, p.430-431, 2001.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 1991.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.119-139, 2003.

FOOTE, R.H.; PARKS, R.W. Factors effects preservation and fertility of bull sperm: a brief review. **Reproduction Fertility Development**, 5, 665-673, 1993.

GRAHAM. J.K. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology**, v.41,p.1151-1162, 1994.

GRAVANCE, C. G.; CHAMPION, Z. J.; CASEY, P. J. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.49, p.1219-1230, 1998.

GUTIÉRREZ, A. J.; COSME, R. W.; JIMÉNEZ, C. J. A.; RAMÍREZ, G. J. A. Agua de coco, suero fetal bovino, aloe vera y sus combinaciones para criopreservar semen ovino, **Archivos de Zootecnia**, v.55, p.101-104. 2006.

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

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6 ed. Barueri – SP: Manole, 1995, 582p.

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. **Veterinary Medicine**, v.50, n.1, p.24-32, 2005.

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

HOPKINS, S. M.; EVANS, L. E. In: **Endocrinología Veterinaria y Reproducción**. 4 ed. Interamericana: México, 1991.

IBGE/IPECE, Perfil Básico Municipal, 2009. Governo do Estado do Ceará. Disponível em <<http://www.ipece.ce.gov.br/>>, Data de acesso: 04 de maio de 2010.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SODERQUIST, L.; HAARD, M. G. M.; HAARD, M.CH.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, A. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy Bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v.52, p.641-658, 1999.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.

KAI, M.; HAYASHI, K.; KAIDA, I.; AKI, H.; YAMAMOTO, M. Permeation-Enhancing Effect of Aloe-emodin Anthrone on Water-Soluble and Poorly Permeable Compounds in Rat Colonic Mucosa. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.12, p. 1608-1613, 2002.

KEITH, S. L. *Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa*. Colorado, 1998. 104p. Tese (Master of Science). Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 1998.

KING, G. K.; YATES, K. M.; GREENLEE, P. G. O efeito da Acemannan Immunostimulant em combinação com cirurgia e radioterapia em espontânea fibrossarcomas canina e felina. **Journal of Animal Hospital da Associação Americana**, v.31, p.439-47, 1995.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.

LLEÓ, C.A. *Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del "Sperm Class Analyzer"*. Valencia, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade de Valencia, Espanha, 2003.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Efeito do tipo racial e da época do ano sobre o ejaculado de caprinos criados em região semi-árida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v.9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p.433.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, p. 61-72, 1995.

MAMPOUYA, C. *Etude de la survie et de la fécondance Du sperm de bélier après conservation à l'état liquide et congele*. France, 1973. Thèse de Docteur de troisième cycle. U.E.R. Sciences Exactes et Naturelles – Université de Clermont – Ferrand, 1973.

- MARQUES, A. L. V. *Água de coco*. Informativo Soccego, nº 92, 1982.
- MARTINEZ, M. L.; VERNEQUET, R. S.; TEODORO, R. L.; PAULA, R. O.; CRUZ, M.; CAMPOS, J. P.; RODRIGUES, L. H.; DE OLIVEIRAS, J.; VIEIRA, F.; BRUSCHI, J. H. Correlações entre Características da Qualidade do Sêmen e a Circunferência Escrotal de Reprodutores da Raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.700-706, 2000.
- MATHEW, J.; RAJA, C. K. S. U.; NAIR, K. P. Preservation of Buck semen in TRIS yolk diluent. In: Internation Conference on goats. Proceedings: Tuckson Dairy Goats J. Pub. Co., 1982, p.506.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**. 3.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1998.
- MAURELLE, J. A. F.; RODRIGUEZ, F. M.; GUITIERREZ, Z. P. Acción analgésica del extrato acuoso liofilizado de *Aloe vera L.* em ratones. **Revista Cubana Plantas Medicinai**s, n.2, p.15-17, 1996.
- MAXWEEL, W. M. C.; SALAMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: a Rewiew. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.613-638, 1993.
- MAXWEEL, W. M.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.
- MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRÃO, R. N. Congelação do sêmen ovino na primavera. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, p.27-57, 1982.
- MONTEZUMA JR., P.; VIANA NETO, C.; NUNES, J. F. Água de coco como diluidor de sêmen de cães In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UECE, Anais... 1994.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.
- NEWTON, L. E. **Em defesa do nome *Aloe vera***. O Cactus e Suculentas Oficial da Grã-Bretanha, v.41, p.29-30, 1979.
- NUNES J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Varela, 2002, cap.5, p. 83-104.

NUNES, J. F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: Simpósio da caprinocultura do Estado do Rio. Niterói, Sn., 1986.

NUNES, J. F. A inseminação artificial em caprinos no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 12, p. 85-91, 1988.

NUNES, J. F. Artificial insemination in goats. In: 4ª Conferência Internacional de Caprinos, Brasília, 1987.

NUNES, J. F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie *in vitro* des spermatozoïdes de bouc. 1982. Thèse (Doctorat) - 3e cycle, Paris VI, Paris, França, 1982.

NUNES, J. F. Avaliação das características de sêmen de carneiros da raça Somalis. In: XVII Congresso Brasileiro de Veterinária, **Anais...**Fortaleza, Ceará, 1980.

NUNES, J. F.; CIRÍACO, A. L. T.; SUASSUNA, U. Produção e Reprodução de Caprinos e Ovinos, Fortaleza: Gráfica, 1997, 199p.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1995.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y.; OLIVEIRA, L. F.; TEIXEIRA, M. D. Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação *in vitro* e avaliação *in vivo* do sêmen na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.2, p.34, 1996.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y.; PRYSCILA, L. Utilisatio d'une substance active "JYP" present dans l'eau de coco pour la conservation *in vitro* et la fertilité des spermatozoides des mammifères. S.I.: Sn. 1994.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C.M. Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v.1, p.17-46, 1999.

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

NUNES, J.F; CORTELL, J.M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Rôle du plasma seminal dans la suvie *in vitro* des spermatozoïdes de bodes. **Reproduction, Nutrition and Development**, 22, 76-86, 1982.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; PERÉZ-PÉREZ, R.; BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, 1-14, 2002.

REYNOLDS, T. *Aloés: A Aloe Género*. **CRC Press**, 2004.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VASQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Ruminant Research.**, v.25, p.147-153, 1997.

ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; VASQUEZ, J. M.; LUCAS, X.; PARRILA, I.; MARTINEZ, E. A. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.103-112, 2000.

RODRIGUES, A. P. R.; TORRES, M. Z. G.; OLIVEIRA, L. F.; NUNES, J. F. Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluidores do sêmen caprino, In: XXIII. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Olinda, 1994, 540p.

RODRIGUES, B. A. Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado. Porto Alegre, 176p., 1997. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

RODRIGUEZ, F.; BALDASSARRE, H.; SIMONETTI, J.; ASTE, F.; RUTTLE, J. L. Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with Aloe vera gel. **Theriogenology**, v.30, p.843-854. 1988.

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

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.L.P.; VIEIRA, V.L.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.5, p.96-98, 2002.

SAMPAIO NETO, J.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J.F. Utilização do diluente ACP-105<sup>®</sup> na refrigeração do sêmen equino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, 5, 137-139, 2002.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; JEFERSON, F. F.; BORGES, A. M.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.5, p.1934-1942, 2006.

- SARABIA, J. E. L.; CLARES, V. P. R.; CLARES, R. A. R.; HERNANDEZ, V. P. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante del ungüento rectal de *Aloe vera L.* **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, n.3, p.106-109, 1999.
- SATISH, S.; RAVEESHA, K. A.; JANARDHANA, G. R. Atividade antibacteriana de extratos vegetais no patovares fitopatogênicos *Xanthomonas campestris* **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.145-147, 1999.
- SKINNER, W. J. Aloe vera resultou em injeções de suspensão para licença médica. **Medicina Natural Law**, 1997.
- SOBREIRA NETO, J. A. Avaliação *in vitro* do sêmen equino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C, 2008. Dissertação (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília) Brasília, 70 p., 2008.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: Cooled and frozen Stallion Semen, b09, 1999.
- TONIOLLI, R.; MESQUITA, S. M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, p.249-254, 1990.
- VELOSO, C. C.; PEGLOW, K. Plantas Mediciniais. Porto Alegre: EMATER/ RS – ASCAR, 2003.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veteribary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2002.
- VIANA, A. K. S.; CHALHOUB M.; RIBEIRO FILHO. A. L., ALMEIDA, A. K.; PORTELA, A. P. M.; BITTENCOURT, R. F.; ALVES, S. G.G.; BITTENCOURT, T. C. C.; QUINTELA, A. T., Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, p.67-76, 2006.
- VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, N. A.; ÓRFÃO, L. H.; CARVALHO, A. M.; NUNES, J. F. Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. 8º ISRPF, Santo Malo, França, 2008, p.137.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WIKIPÉDIA, **Babosa**. In: Wikipédia: A Enciclopédia Livre. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Babosa>>, Data de acesso: 10 de novembro de 2009.
- WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v.33, p.320-329, 1996.

YATES, A. Yates Garden Guide. Harper Collins, Austrália, 2002.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.349-355, 2000.