	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE** **PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**	

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA LIOFILIZADA DO FRUTO DO NONI NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO

VANICLEIDE DA SILVA SANTOS

Mestrado **2014**

PROZOOTEC – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

VANICLEIDE DA SILVA SANTOS

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA LIOFILIZADA DO FRUTO DO NONI NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientador:

Prof. Dr. Anselmo Domingos Ferreira Santos

Co-orienrador

Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo

SÃO CRISTÓVÃO –SE

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Santos, Vanicleide da Silva
S237p Potencial antioxidante da polpa liofilizada do fruto do noni na congelação do sêmen ovino / Vanicleide da Silva Santos / orientador : Anselmo Domingos Ferreira Santos. – São Cristóvão, 2014.
48f. : il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Zootecnia. 2. Lipoperoxidação. 3. Criopreservação. 4. Espermatozóide. 5. Ovino. 6. Noni. I. Santos, Anselmo Domingos Ferreira, orient. II. Título

CDU 636.32/.38.082

VANICLEIDE DA SILVA SANTOS

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA LIOFILIZADA DO FRUTO DO NONI NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

APRESENTADA em 30 de julho de 2014.

Prof. Dr. Anselmo Domingos Ferreira Santos
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Nízio Maria

Prof. Dr. Veronaldo Souza de Oliveira

SÃO CRISTÓVÃO –SE

2014

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliammuito.
(***Chico Xavier***)

DEDICO

A minha mãe Maria Lourdes,por todo amor ecompreensão.
Ao meu pai Sebastião pelo carinho e apoio.
Aos irmãos Uscre e Graziele pelo incentivo em seguir.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, nosso Divino Mestre pela orientação em todos os momentos da minha vida.

Aos **meus pais** Maria Lourdes e Sebastião por todas as coisas em prol do meu crescimento moral e intelectual. Amo vocês.

Aos **meus irmãos**, Uscre e Graziele pelo carinho, união. Vocês são um pedaço do meu coração, fora de mim.

A toda a **família** pelo acolhimento, palavras de carinho e sempre desejando o meu melhor. As conversas confortantes e inúmeras alegrias.

A **Enio Bruno**e a sua mãe **Edivalda,**pelo incentivo para eu nunca desistir e lutar por aquilo que mais almejo.

Ao professor **Anselmo Domingos**, orientador acadêmico, exemplo profissional e de ser humano. Aprendi com ele, mais sobre humildade, reconhecimento de erros e enxergar no outro suas melhores características. O que levo é um pouquinho de aprendizado científico e muito de ensinamentos de vida.

Ao co-orientador**Hymerson Azevedo**por suas contribuiçõescientíficas. Homem sério, mas também sereno. Contigo, aprendi a entender as dificuldades alheias e contribuir, não apenas aconselhando, mas exemplificando.

A amiga **Carlinha**, por todos os momentos juntas. As boas rizadas, seus conselhos, seu incentivo. Pode ser que um dia tomemos caminhos diferentes, mas tenho certeza que o carinho que nos une não deixará que nos afastemos. Conte sempre comigo.

As amigas **Arlene, Gleicianny, Claudineide, Rosylaine** pelos momentos de descontração e apoio umas as outras.

Aos amigos **Anna Lauren, Cláudio, Elison, Rebeca, Raquel, Davi, David, Clésio**. Vocês não são apenas um grupo de trabalho, são pessoas as quais levarei sempre nas minhas melhores lembranças. Obrigada pelo apoio, dedicação, carinho. Foi gratificante trabalhar com vocês.

Aos **professores do DZO/UFS DMV/UFS e PROZOOTEC/UFS,** que de forma direta ou indireta, contribuíram para minha formação.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REFERENCIAL TEÓRICO 2

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 8

CAPÍTULO I ADIÇÃO DA POLPA LIOFILIZADA DO FRUTO DO NONI COMO ANTIOXIDANTE EM DILUENTE PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO 13

RESUMO 14

INTRODUÇÃO 16

MATERIAL E MÉTODOS 17

CONCLUSÃO 36

REFERÊNCIAS 36

RESUMO

SANTOS, V. S. **Adição da Polpa Liofilizada do Fruto do Noni (*MorindaCitrifoliaLinn*) como Antioxidante a Diluente para Congelação de Sêmen Ovino.** Sergipe: UFS, 2014 48p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).

Objetivou-se avaliar o potencial antioxidante da polpa liofilizada do fruto do Noni (*Morindacitrifolia)* em adição a diluente para congelação de sêmen, nas concentrações de 2,35mg/mL; 4,70mg/mL e 4,70mg/mL sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides ovinos.Foram coletados um total de cinco ejaculados, provenientes de dois reprodutoresda raça Sant Inês com idade entre 1 e 2 anos, pela técnica da vagina artificial. O sêmen foi dividido em volumes iguais, diluído nos meios correspondentes a cada tratamento, armazenado em palhetas de 0,25mL, seguidoda refrigeração à – 0,25 ºC/min até 5ºC, um tempo de estabilização de uma hora e, congelação à – 20 º C/min até atingir – 140 º C, quando foram submersas em nitrogênio líquido à – 196 º C. As amostras foram descongeladas (37°C/30segundos) e avaliadas quanto a viabilidade, cinética espermática computadorizada, integridade de membrana plasmática, status de capacitação e reação acrossomal e aplicou-se o teste de teste de termorresistência lento quanto aos parâmetros motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática pelo teste hiposmótico. A adição da polpa liofilizada do fruto do noni na concentração de 4,70mg/mL reduziu a peroxidação lipídica do meios ($p<0,5$). Entretanto após diluição do sêmen, seguida da congelação/descongelação, os meios contendo concentrações superiores a 2,35mg/mL foram prejudiciais ($p<0,5$) a motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de percurso médio, velocidade progressiva, velocidade curvilinear, amplitude de deslocamento lateral da cabeça, batimento flagelar cruzado e na concentração 4,70mg/mL sobre a retilinearidade de espermatozóides ovinos, sem no entanto afetar a integridade da membrana plasmática e o status de capacitação e reação acrossomal. Nas concentrações utilizadas, não recomenda-se a utilização da polpa do Noni liofilizada, como ingrediente antioxidante em diluente para congelação de sêmen ovino.

Palavras chave: lipoperoxidação, criopreservação, espermatozóides, carneiro, Morindacitrifolia

.

ABSTRACT

SANTOS, V. S. **Addition of Lyophilized Pulp Fruit of Noni (Morindacitrifolia Linn) as Antioxidant for Freezing Semen Ram.**Sergipe: UFS, 2014 48p. (Dissertation – Master in Zootecnia).

Aimed to evaluate the antioxidant potential of freeze-dried pulp of the Noni (Morindacitrifolia) in addition to a diluent for semen freezing, the concentrations of 2,35mg / mL; 4,70mg / mL and 4,70mg / mL on the in vitro viability of sheep sperm. A total of five ejaculates from two breeding race Santa Inês aged 1 and 2 years, the technique of artificial vagina were collected. Semen was divided into equal volumes, diluted in the means corresponding to each treatment, stored in straws of 0.25 ml, followed by cooling to - 0.25 ° C / min to 5 ° C, a time of stabilization of an hour and freezing at - 20 º C / min up to - 140 º C, when they were submerged in liquid nitrogen at - 196 ° C. the samples were thawed (37 ° C / 30 seconds) and evaluated for feasibility, computerized sperm kinetics, plasma membrane integrity, status of training and acrosome reaction and applied the test of slow thermoresistance test for parameters like motility, vigor and integrity of the plasma membrane by hypoosmotic test. The addition of the freeze-dried noni fruit pulp concentration of 4.70 mg / mL reduced lipid peroxidation of the means ($p < 0.5$). However, after dilution of the semen, followed by freeze / thawing media containing higher concentrations 2,35mg / mL harmful ($p < 0.5$) the total motility, progressive motility, average path velocity, progressive velocity, curvilinear velocity, amplitude of lateral head displacement, beat cross cross and concentration 4,70mg / mL on the straightness of ram spermatozoa, without affecting the integrity of the plasma membrane and the status of capacitation and acrosome reaction. At the concentrations used, the use of freeze-dried Noni pulp is recommended as an antioxidant ingredient in diluent for freezing ram semen.

Keywords: lipid peroxidation, cryopreservation, sperm, sheep, Morindacitrifolia

1. INTRODUÇÃO

No sentido de aumentar a produtividade dos rebanhos ovinos, o uso de biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial com sêmen congelado permitem maior aproveitamento dos ejaculados dos reprodutores. Contudo, a manipulação dos espermatozoides durante os processos de congelação/descongelação, a exposição ao oxigênio e redução dos antioxidantes naturais do ejaculado pela diluição resultam num desequilíbrio de espécies reativas ao oxigênio (ROS) causando danos aos espermatozóides e consequentemente redução do potencial de fertilização.

As células espermáticas utilizam o metabolismo do oxigênio como principal fonte de energia, capaz de gerar ROS que, em pequenas quantidades, são necessários para a função espermática normal, porém, em desequilíbrio são prejudiciais levando a peroxidação lipídica da membrana plasmática, alterando a estrutura do espermatozoide, reduzindo a capacidade de fertilização. Entretanto, a peroxidação lipídica pode ser controlada ou revertida pelo uso de antioxidantes no meio diluidor (MAIA e BICUDO, 2009). Assim, torna-se necessária a identificação de antioxidantes que possam ser utilizados para equilibrar a ação e produção das ROS durante os procedimentos de congelação/descongelação de sêmen e assim, controlar a peroxidação lipídica mantendo a viabilidade celular.

O Noni tem sido alvo de muitos estudos devido a presença de determinados compostos com função antioxidante, em várias partes da planta, o que o torna um provável ingrediente capaz de equilibrar ou reduzir a produção de ROS intensificados durante o processo de congelação/descongelação.

Diante da necessidade da redução de danos causados as células espermáticas pela ação das ROS durante os processos de congelação/descongelação, objetivou-se avaliar a adição da polpa liofilizada do fruto do Noni, em diferentes concentrações a diluente para congelação de sêmen ovino, sobre a viabilidade, motilidade subjetiva, vigor, integridade de membrana plasmática, cinética espermática por avaliação computadorizada, status de capacitação espermática e reação acrossomal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Processamento e danos celulares durante a congelação de sêmen

Os ejaculados da maioria dos animais domésticos contêm mais espermatozoides que o necessário para uma fecundação. Assim, a diluição do sêmen associada a biotécnica de inseminação artificial (IA) permite maior aproveitamento do mesmo, possibilitando sua utilização em diversos rebanhos (CASTELO et al., 2008) e, associada a congelação, permite ampla disseminação de material genético valioso (BUCAK et al., 2008). Entretanto, o uso de IA com sêmen congelado em ovinos ainda não obtém resultados satisfatórios e torna-se necessário, entre outros, o desenvolvimento de diluentes melhorados para aumentar as taxas de fertilidade (AISEN et al., 2005).

A congelação do sêmen consiste em submeter os espermatozoides a temperaturas reduzidas, inibindo de forma reversível o metabolismo celular (SALAMON & MAXWELL, 2000). Contudo, a manipulação dos espermatozoides com o intuito de preservá-los e utilizá-los por longos períodos ocasiona danos a estrutura espermática, comprometendo suas funções biológicas como a diminuição da capacidade respiratória, motilidade e integridade dos componentes estruturais (SOARES & GUERRA, 2009; SILVA & GUERRA, 2011).

Estes eventos são, provavelmente, provocados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, que diminuem o transporte e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino (SALAMON & MAXWELL, 2000; AISEN et al., 2005).

O modelo estrutural básico da membrana espermática é igual ao modelo biológico organizado em um mosaico fluído, constituído por duas camadas de fosfolipídios, interrompida por numerosas proteínas integrantes, as quais estariam intercaladas em vários graus dentro dessa estrutura (SINGER e NICHOLSON, 1972). Segundo Amann e Graham (1993), as proteínas são as principais responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos, os lipídios são responsáveis pela integridade estrutural, e os carboidratos desempenham importante papel nas interações entre as células.

O conteúdo lipídico da membrana plasmática dos mamíferos varia entre as diferentes espécies, em geral contém aproximadamente 70% fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% glicolipídios (MANN e LUTWAK-MANN, 1981). Quanto ao conteúdo de colesterol, é o fator mais variável da membrana plasmática, e está diretamente relacionada com a taxa

de capacitação, possivelmente porque ele deve ser retirado da mesma durante esse processo (YANAGIMACHI, 1994; FLESCH e GADELLA, 2000; FRITS et al., 2000).

As membranas plasmáticas apresentam-se em estado de fluidez, um pré-requisito para o desempenho de suas funções, sendo que fatores como a composição relativa entre fosfolipídios, colesterol e a temperatura a qual a membrana se encontra afetam esta fluidez (HAMMERSTED et al., 1990).

A congelação afeta a composição lipídica e organizacional da membrana plasmática de espermatozoides ovinos, resultando em danos estruturais e predispondo-os à defeitos morfológicos (HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989). Os danos à membrana causados pela congelação afetam a capacitação e hiperativação espermática, assim como o processo de fertilização, o que pode ser comprovado pela maior fertilidade do sêmen fresco comparado ao congelado quando o mesmo número de espermatozoides na dose inseminante é utilizado (WATSON, 1995).

2.1.1 Espécies reativas ao oxigênio e peroxidação lipídica

As células espermáticas são metabolicamente flexíveis em relação à utilização do oxigênio para seu metabolismo (CÂMARA & GUERRA, 2011) e a utilização do metabolismo oxidativo como principal fonte de energia é capaz de gerar biometabólitos ativos do oxigênio, denominados espécies reativas ao oxigênio (ROS) como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

O equilíbrio entre o potencial antioxidante do plasma seminal e o potencial oxidativo dos metabólitos espermáticos controlam a taxa de lipoperoxidação espermática (STRADAIOLI et al., 2007) e quando há o desequilíbrio na concentração de ROS, seja pelo aumento de sua produção ou pela diminuição da atividade de substâncias antioxidantes, o sistema encontra-se no estado de estresse oxidativo.

Para minimizar o estresse oxidativo e a lipoperoxidação, o espermatozoide possui um sistema antioxidante intracelular constituído da glutationa reduzida (GSH), glutationaperoxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) (AITKEN, 1995) e extracelularmente é protegido pelo plasma seminal que contém redutores de ROS enzimáticos e não enzimáticos como ácido ascórbico, ácido úrico, albumina, taurina, hipotaurina e vitamina E (ZINI et al., 2000).

As enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal são muito importantes para a proteção espermática entretanto, os processos de diluição e congelação-descongelação do sêmen induzem a mudanças consideráveis na distribuição e concentração dessas enzimas (AGARWAL et al., 2006; MARTI et al., 2008), resultando no desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes e, consequentemente, no estresse oxidativo (BILODEAU et al., 2000).

A controlada concentração de ROS como o anion superóxido e peróxido de hidrogênio possui papel importante na fisiologia espermática (De LAMIRADE et al., 1997) e a produção de pequenas quantidades destes elementos no sêmen é necessária para a função espermática normal, sendo um pré-requisito para capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão espermatozoide-ovócito (MAIA e BICUDO, 2009). No entanto altas concentrações dessas moléculas são prejudiciais, pois a membrana plasmática dos espermatozoides consiste no principal substrato das espécies reativas ao oxigênio, levando a peroxidação lipídica (HOLT, 2000).

A peroxidação lipídica inicia-se quando as ROS entram em contato com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana espermática e retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido graxo poli-insaturado. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação causando alterações da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático (AITKEN e KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002).

Os lipídios da membrana plasmática são ricos em ácidos graxos poli-insaturados que conferem a fluidez necessária para que ocorram os eventos de fusão de membranas associados com a fertilização. No espermatozóide oxidado, ocorre diminuição da fluidez da membrana, aumento da permeabilidade e diminuição da capacidade de fertilização, sendo a peroxidação lipídica uma causa importante de disfunção espermática (MAIA & BICUDO, 2009).

2.2 Meio diluidor e antioxidantes

Os diluentes utilizados para a conservação do sêmen devem ter capacidade de tamponamento, osmolaridade adequada e proteger as células espermáticas de lesão criogênica (SALAMON e MAXWELL, 2000), preservando a motilidade e a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, neutralizando produtos tóxicos produzidos,

atuando como fonte de energia e inibindo o crescimento bacteriano (AMANN e PICKETT, 1987).

Diluentes para congelação geralmente possuem um crioprotetor não permeável (gema de ovo ou leite), um crioprotetor penetrante (glicerol), um tampão (Tris), um ou mais açúcares (glucose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina, estreptomicina) (EVANS & MAXWELL 1987), com valor de pH entre 6,75 e 7 (BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

Baseando-se na composição e na dinâmica das membranas espermáticas, existem propostas para a adição de diversas substâncias aos meios diluidores, na tentativa de minimizar os danos impostos pela criopreservação aos espermatozoides (BICUDO et al., 2007).

Antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem a oxidação do substrato oxidável. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar uma reação em cadeia, formando produtos estáveis (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Peixoto et al. (2008), avaliando o efeito do tempo de incubação pós-descongelação sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos em diluente Tris-Gema suplementado com vitamina C e Trolox, constataram que a vitamina C determinou menor percentual de espermatozoides com estresse oxidativo.

Maia et al. (2009) verificaram que o uso de antioxidantes é eficaz para remover o excesso de ROS e manter o equilíbrio do sistema. Ao adicionar antioxidantes Trolox-C ou catalase ao diluidor, os autores constataram que houve efeito benéfico sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides ovinos, em relação ao controle (TRIS), assim como o percentual de espermatozoides viáveis com acrossomo intacto também foi maior.

Desta forma, a adição de antioxidantes ao diluente visa aumentar a viabilidade espermática, reduzindo o grau de danos celulares, melhoria da motilidade espermática e integridade acrossomal (SARLÓS et al., 2002). No entanto, a concentração ideal de antioxidantes ainda precisa ser determinada (MAIA et al., 2009).

2.2.1 Noni e Atividade Antioxidante

O Noni é uma planta da família *Rubiaceae* (WANG et al., 2002), com 3-10 m de altura, flores pequenas e frutos ovais e carnosos, com muitas sementes, ligeiramente enrugados, semi-translúcidos e de coloração entre verde e amarelo conforme o estágio de maturação. Em condições favoráveis, a planta produz frutos nove meses após o plantio e continua a produzir o ano todo (CHAN-BLANCO et al., 2006).

A espécie tem sido foco de muitos estudos (WANG et al., 2002; SU et al., 2005; TEMITOPE et al., 2011, BRAMORSKI et al., 2010; AHMAD et. al., 2012), o que pode ser constatado pelo aumento no número de patentes, principalmente nos anos de 2005 e 2007 (SERAFINI et al., 2011) devido a seus prováveis efeitos potenciais sobre o tratamento e prevenção de várias doenças. Entretanto, precisa-se identificar os compostos que justifiquem o seu uso (BRAMORSKI et al., 2010).

O efeito benéfico do noni pode resultar de determinados compostos extraídos das raízes, folhas, cascas e frutas tais como óxido nítrico, alcalóides e esteróis com ação antioxidante (CHAN-BLANCO et al., 2006). As distintas partes do Noni apresentam teores variáveis dos compostos bioativos (vitamina C e carotenóides totais), com destaque para a polpa como maior fonte de vitamina C (COSTA et al., 2013).

Estudos realizados por Serafiniet al. (2011) indicam que o extrato aquoso das folhas do Nonipossui significativas atividade antioxidante e anti-inflamatória, fornecendo evidência farmacológica para o seu uso populare e que os efeitos do extrato da folha pode depender dos seus componentes fenólicos.

O noni épredominantemente composto por carboidratos e é rico em polissacarídeos pécticos (BUI et al, 2006). Há também em sua composição compostos fenóicos que representam o maior grupo de micronutrientes funcionais do suco e entre esses compostos, os mais importantes são as antraquinonas (WANG e SU, 2001) e além destes, compostos como escopoletina, óxido nítrico, e esteróis podem ser os responsáveis pelos benefícios atribuídos ao consumo do noni (CHAN-BLANCO et al., 2006).

Ahmad et al. (2012) observaram que o suco do fruto do Noni possui atividade antioxidante e protege os indivíduos de radicais livres de oxigênio e conseqüenteperoxidação lipídica. Tendo como um dos principais componentes a proxeronina, precursora do alcalóidexeronina que ativa as enzimas catalisadoras do metabolismo celular (TOMBOLATO et al., 2005).

Temitopeet al. (2011), estudando os efeitos do suco de noni taitiano (TNJ®), vitamina E e vitamina C sobre as funções reprodutivas masculinas em ratos, observaram maior motilidade e menor porcentagem de espermatozoides anormais, em ratos tratados com o TNJ® em comparação com outros grupos.

Kutvoelgyi (2008), estudando a inclusão do sobrenadante neutralizado do extrato do fruto do Nonino sêmen equino, verificou redução de danos à membrana e células danificadas, proporcionando assim uma melhor qualidade do sêmen, com maior proporção de espermatozoides intactos e motilidade após o congelação/descongelação.

Diante da relevância que tem alcançado os estudos sobre as propriedades medicinais do Noni, são de fundamental importância pesquisas que avaliem os reais benefícios que este fruto pode trazer (COSTA et al, 2013).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGARWAL, A.; SAID, T,M.; BEDAIWY, M. A. et al.,Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility Sterility**, v.86, p.503-512, 2006.

AHMAD, M. D. S; SHEEBA, A. A.; RAI, K. B. Cancer preventive Effect of *Morindacitrifolia*(Noni) fruit juice against the AflatoxinB1-induced genotoxicity in human peripheral lymphocytes in vitro. **Journal of Pharmacy,** v. 2(2), p: 228-234, 2012.

AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V. et al.,Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v 50, p. 239-49, 2005.

AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction,** v.122, p. 497-506, 2001.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function.**Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Sermatozoal function.**Equine reproduction**, p. 715-745, 1993.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, E. R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells.**Cell Tissue Bank**, v.10, p. 49-62, 2009.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, S.M. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae,** v35, Supl., p. 787-798, 2007.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A. et al., Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BRAMORSKI, A.; CHEREM, A. R.; MARMENTINI, C. P. et al.Total polyphenol content and antioxidant activity of commercial Noni (*Morindacitrifolia*L.) juice and its components. **BrazilianJournalofPharmaceuticalSciences,** v. 46, n. 4, 2010.

BUCAK, M.N.; ATEŞŞAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process.**SmallRuminantResearch**, v.75, p.128-134, 2008.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v.35, n.1, p.33-40, 2011.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações Sobre a Criopreservação do sêmen de Caprinos. **Acta VeterinariaBrasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M. et al. The noni fruit (*Morindacitrifolia* L.): a review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties**. Journal of Food Composition and Analysis,** v. 19, p.645–654, 2006.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A. M. C.; SILVA, A. M. O. et al. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (*Morindacitrifolia* Linn). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.2, pp. 345-354, 2013.

DE LAMIRANDE E.; JIANG H.; ZINI A. et al. Reactive Oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48-54, 1997.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goat**. Sydney: Bulterworths, p.194, 1987.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.**BiochimicaetBiophysicaActa**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FRITS, M.; FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dyanamics of the mammalian sperm plasma membarne in the process of fertilization.**Biochinica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDE, J.M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3º ed. Oxford University Press, Oxford. 2000. 936 p.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survice. **Journal of Andrology**, v.11(1), p.73-88, 1990.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phosphoslipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v.26, p. 70-75, 1989.

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

KUTVOELGYI, G. **Use of morindacitrifolia (noni) extract for improving sperm preservation**. EP Pat. WO 2008032132 A2, 20 mar. 2008.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C. et al. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **SmallRuminantResearch**, v. 85, p. 85–90, 2009.

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

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductivefunctionandsemen**, Springer, Berlin, 1981.

MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. et al. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MARTI, E.; MARTÍ, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.29, p.459-467, 2008.

PEIXOTO, A.L.V.A.; MONTEIRO Jr, P.L.J.; CÂMARA, D.R. et al. Efeito do tempo de incubação pós-descongelação sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina c e trolox. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, no 1, p. 16 - 24, 2008.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1, p.77-111, 2000.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta VeterinariaHungarica**, v.50, p.235-245, 2002.

SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G. et al. *Morindacitrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration**. Journalof Medicinal Food**, v.14.p.1159–1166, 2011.

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

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L.The fluid mosic model of the structure of cells membranes.**Science**, v.175, p.720-731, 1972.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia e CiênciaAgropecuária,** v.3, n.2, p.53-63, 2009.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L. et al.,Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v.67, p.1249-1255, 2007.

SU, B. N.; PAWLUS, A. D.; JUNG, H. A. et al. Chemical Constituents of the Fruits of *Morindacitrifolia*(Noni) and Their Antioxidant Activity. **Journal of Natural Products**, v.68, n.4, p.592-595, 2005.

TEMITOPE, A, A.; O. TOLULOPE, A.; FUNLOLA, C. T et al. Protective Effect of Tahitian Noni Juice on the Reproductive Functions of Male Wistar Rats Traeted with Cyclophosphamide. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v.10, n.1, p. 39-43, 2011.

TOMBOLATO, F.C.A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.et al. **Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimatação no Brasil**. Informações técnicas: O agronômico, Campinas.; V. 57(1), P.21, 2005.

WANG, M.Y.; WEST, B.J.; JENSEN, C.J. et al. Morindacitrifolia (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **ActaPharmacolSinica**, v.23, p.1127–1141, 2002.

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

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization**. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), The physiology of reproduction, Raven Press, New York, v. 2, p. 189-317, 1994.

ZINI, A.; FINELLI, A.; PHANG, D.et al. Influence of semen processing techniqueon human sperm DNA integrity.**Urology**, v. 56, p. 1081-1084, 2000.

CAPÍTULO I

ADIÇÃO DA POLPA LIOFILIZADA DO FRUTO DO NONI COMO ANTIOXIDANTE EM DILUENTE PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO

Adição da polpa liofilizada do fruto do Nonicomo antioxidante em diluente para congelação de sêmen ovino*

Addition of freeze-dried Noni fruit pulp as an antioxidant in diluent for freezing ram semen

RESUMO

Objetivou-se avaliar o potencial antioxidante de diferentes concentrações da polpa liofilizada do fruto do Noni (*Morindacitrifolia)* em adição a diluente para congelação de sêmen, sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides ovinos. Cinco ejaculados foram coletados, avaliados, diluídos em meio a base Tris-Gema-Glicerol, acrescido ou não da polpa liofilizada, armazenados em palhetas (0,25mL; $50x10^6$ espermatozoides). Os tratamentos consistiram em D1 – grupo controle, sem adição da polpa liofilizada, D2, D3 e D4, diluentes contendo 2,35mg/mL, 4,70mg/mL e 7,05mg/mL, respectivamente. As amostras foram descongeladas (37°C/30segundos) e imediatamente avaliadas quanto a viabilidade, cinética espermática computadorizada, integridade de membrana plasmática, status de capacitação e reação acrossomal e aplicou-se o teste de teste de termorresistência lento quanto aos parâmetros motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática pelo teste hiposmótico. A adição da polpa liofilizada do fruto do noni na concentração de 4,70mg/mLreduz significativamente a peroxidação lipídica dos meios. Entretanto após diluição do sêmen, seguida da congelação/descongelação, os meios contendo concentrações superiores a 2,35mg/mL são prejudiciais a motilidade total, motilidade

*Artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista Ciência Rural

progressiva, velocidade de percurso médio, velocidade progressiva, velocidade curvilinear, amplitude de deslocamento lateral da cabeça, batimento flagelar cruzado e na concentração 4,70mg/mL sobre a retilinearidade de espermatozóides ovinos, sem no entanto afetar a integridade da membrana plasmática e o status de capacitação e reação acrossomal.

Palavras chave: lipoperoxidação, criopreservação, espermatozóides, carneiro, Morindacitrifolia

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antioxidant potential of different concentrations of lyophilized pulp of the Noni (Morindacitrifolia) in addition to a diluent for semen freezing on the in vitro viability of sheep sperm. Five ejaculates were collected, evaluated, dissolved in half the Tris-yolk-glycerol base, with or without the pulp freeze-dried, stored in straws (0.25 ml; 50x106 spermatozoa). The treatments consisted of D1 - control group without addition of lyophilized pulp, D2, D3 and D4, diluents containing 2,35mg / mL, 4,70mg / mL and 7,05mg / mL, respectively. The samples were thawed (37 ° C / 30 seconds) and immediately evaluated for feasibility, computerized sperm kinetics, plasma membrane integrity, capacitation status and acrosomal reaction and applied the test of slow thermoresistance test for parameters like motility, vigor and integrity of the plasma membrane by hypoosmotic test. The addition of the freeze-dried noni fruit pulp in concentration 4,70mg / mL significantly reduces lipid peroxidation media. However, after dilution of the semen, followed by freeze / thawing media containing higher concentrations 2,35mg / mL are detrimental to total motility, progressive motility, average path velocity, progressive velocity, curvilinear velocity, amplitude of lateral head displacement, beat cross cross and concentration 4,70mg / mL on the straightness of ram spermatozoa,

without affecting the integrity of the plasma membrane and the status of capacitation and acrosome reaction.

Keywords: lipid peroxidation, cryopreservation, sperm, sheep, Morindacitrifolia

INTRODUÇÃO

A diluição do sêmen associada asbiotécnicas de inseminação artificial (IA) e congelação permitem um maior aproveitamento dos ejaculados, possibilitando ampla disseminação de material genético (BUCAK et al., 2008). Contudo, a manipulação dos espermatozóides e os processos de congelação/descongelação ocasionam danos a estrutura espermática, comprometendo suas funções biológicas (SOARES & GUERRA, 2009) como diminuição da motilidade e integridade dos componentes estruturais (SILVA & GUERRA, 2011).

A congelação afeta a composição lipídica e organizacional da membrana plasmática de espermatozoides (HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989), implicando no aumento da permeabilidade da membrana e da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (HSU et al., 1998), que em concentração controlada possuem papel importante nos processos de capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão espermatozoide-ovócito (MAIA & BICUDO, 2009). Porém em altas concentrações iniciam a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática dos espermatozóides, causando alterações da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático (AITKEN & KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002) e redução da fluidez da membrana, necessária para os eventos de fusão de membranas e fecundação (MAIA & BICUDO,

2009). A peroxidação lipídica pode ser controlada ou revertida pelo uso de antioxidantes ao meio diluidor (MAIA & BICUDO, 2009) mantendo a viabilidade celular.

O Noni tem sido alvo de muitos estudos devido a presença de determinados compostos com função antioxidante, em várias partes da planta, o que o torna um provável ingrediente capaz de equilibrar ou reduzir a produção de ROS intensificados durante o processo de congelação/descongelação.

Diante da necessidade da redução de danos causados as células espermáticas pela ação das ROS durante os processos de congelação/descongelação, objetivou-se avaliar a adição da polpa liofilizada do fruto do Noni, em diferentes concentrações a diluente para congelação de sêmen ovino, sobre a viabilidade, motilidade subjetiva, vigor, integridade de membrana plasmática, cinética espermática por avaliação computadorizada, status de capacitação espermática e reação acrossomal.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Período

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Produção (CEPAP) e executado na Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, Sergipe, Brasil, a 11º01'S e 37º12' W. Os frutos do Noni foramobtidos de plantas do Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil, localizado 10° 55’ S e 37° 12’W, com clima tipo As tropical chuvoso, conforme a classificação de Köeppen, temperatura média anual de 25,2ºC, verão seco e precipitação pluviométrica média anual de 1.300 mm, com chuvas concentradas nos meses de abril a setembro (SANTOS et al., 2009). As análises de atividade antioxidante e lipoperoxidação foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioquímica, Departamento de Fisiologia (UFS) e as análises laboratoriais do sêmen foram efetuada nos Laboratórios de Reprodução

Animal do Departamento de Medicina Veterinária (UFS) e Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LABRA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe, Brasil. Durante o período de março a julho de 2014.

Colheita do fruto e elaboração do liofilizado

Os frutos foram coletados diretamente da copa das árvores e, como critério de escolha, determinou-se o estágio de maturação indicado pela coloração do fruto em amarelo esbranquiçado (SILVA et al.,2012) e textura muito firme. Em seguida, foram mantidos a temperatura ambiente até atingir o estado de maturação com cor amarela pálida e textura firme (CHAN-BLANCO et al., 2006). A partir daí retirou-se a película que reveste o fruto e realizou-se o despolpamento por passagem em peneira, 450 micras. A polpa obtida neste processo teve seu pH aferido por meio de pHmetro digital. No copo próprio do aparelho liofilizador foram pesados cinquenta gramas da polpa, acondicionada em freezer (-18 a -22ºC) e apóscongelada. Em seguida, procedeu-se a liofilização por aproximadamente 24 horas, até total secagem da amostra.

Determinação dos níveis de Inclusão

Para a determinação das concentrações a serem incluídas ao meio diluidor, foram realizadas análises para quantificação de fenóis totais existentes na polpa liofilizada do fruto, através do método espectrofotométrico de oxi-redução do Folin-Ciocalteau conforme SOUSAet al.(2007). Em seguida, realizou-se análise para verificação da atividade antioxidante (AA) pelo Método de captura do radical DPPH$^{\bullet}$(2,2 difenil-1-picril-hidrazil) conforme metodologia descrita por SOLER-RIVASet al. (2000) e ARGOLO et al. (2004), utilizando soluções contendo diferentes concentrações do extrato alcóolico da polpa liofilizada (150, 100, 50, 25 e 10 μg/mL), com leituras de absorbâncias realizadas por espectrofotômetro nos tempos de 1; 5; 10; 20 e 30 minutos após o início da reação e acompanhadas por um controle positivo (ácido gálico). A partir da equação da curva de

calibração a 515nm tida como branco o metanol, e dos valores de absorbância para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de $DPPH^{\bullet}$ remanescentes ($\%DPPH^{\bullet}_{REM}$), conforme a equação1:

$$\%DPPH^{\bullet}_{REM} = [DPPH^{\bullet}]_{T=t} \div [DPPH^{\bullet}]_{T=0} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

$[DPPH^{\bullet}]_{T=t}$ corresponde a concentração de $DPPH^{\bullet}$ no meio, após a reação com o extrato;

$[DPPH^{\bullet}]_{T=0}$ é a concentração inicial de $DPPH^{\bullet}$.

Utilizando-se o programa MicrocalOrigin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando no eixos das abscissa as concentrações da amostra (μg/mL) e do controle positivo e no eixo das ordenadas, a porcentagem de $DPPH^{\bullet}$ remanescente ($\%\ DPPH^{\bullet}_{REM}$), determinou-se a Concentração Eficiente ($EC_{50}\ \mu g.mL^{-1}$).

A atividade antioxidante foi determinada através do índice de atividade antioxidante (IAA) conforme SCHERER & GODOY (2009) e calculada através da equação:

$$IAA = \%DPPH^{\bullet}_{REM}\ (\mu g.mL^{-1}) \div CE_{50}\ (\mu g.mL^{-1})$$

Elaboração dos diluentes

Para elaboração dos meios diluentes utilizou-se uma solução padrão do fabricante Multiplique® (Multiplique sêmen e embriões, Pres. Prudente – SP) pH 6,5±2. Foram utilizados 20mL da solução padrão, 20mL de gema de ovo e água ultrapura em quantidade suficiente para (q.s.p) 100mL. Sendo que, para os meios contendo a polpa liofilizada, diluíram-se os miligramas equivalentes de cada tratamento a água Milli-q. Os diluentes foram filtrados em filtro coletor de embrião de 75 micras e tela de nylone tiveram o pH aferido e armazenados em tubos de ensaio previamente identificados e mantidos congelados em freezer (-18 e -22ºC).

Inibição da Lipoperoxidação da polpa nos diluentes e após descongelação

A capacidade da polpa do noni liofilizada nos meios diluidores em inibir a lipoperoxidação foi determinada através do monitoramento da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) conforme técnica de DRAPER & HADLEY (1990), com modificações, em meio lipídico. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de $FeSO_4$ (0,17 M). O Trolox foi usado como molécula antioxidante de referência (controle positivo) e o controle negativo consistiu no liofilizado mais metanol. As reações foram realizadas por 30 min a 37 ºC. Em seguida, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 g por 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de TBA (0,67%) e aquecida a 95 °C por 60 min. Após o resfriamento, as absorbâncias foram medidas usando espectrofotômetro a 532 nm. Para verificação da inibição da lipoperoxidaçãoapós descongelação,duas palhetas (250µL foram descongeladas a 37°C por 30segundos) e procedeu-se análises conforme metodologia descrita anteriormente.

Animas Experimentais

Como doadores de sêmen utilizou-se dois reprodutores com idade entre 1 e 2 anos, da raça Santa Inês (S.I.) e como manequim para coleta, uma fêmea S.I., clinicamente saudáveis e submetidos a exames andrológico e ginecológico prévios, respectivamente. Durante o período experimental os animais permaneceram em cercados coletivos, separados por categoria (sexo), alimentados com capim elefante (*Pennisetumpurpureum)* e concentrado comercial, com fornecimento de água e sal mineral a vontade.

Coleta e Processamento do sêmen

Foram realizadas cinco coletas de sêmen pela técnica da vagina artificial, com água aquecida entre 47 e 50ºC. A fêmea (manequim) teve seu estro induzido pela aplicação de

1,0 mg de cipionato de estradiol E.C.P.® (Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos, SP) no primeiro dia e 0,5 mg quando a fêmea se tornou menos receptiva ao macho.

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi encaminhado ao laboratório, avaliado quanto ao volume no próprio tubo de coleta e mantido em banho-maria a 30-32°C até o momento da diluição. Retirou-se uma gota de sêmen para avaliação do turbilhonamento (de 0 a 5), motilidade subjetiva (0 a 100%) e vigor (0 a 5), sobre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C, por microscopia óptica sob magnitude de 100x. Como critério para congelação, foram utilizados apenas ejaculados com motilidade progressiva ≥ a 70%, vigor ≥ 3 e viabilidade espermática ≥ a 70%, pela técnica de coloração com eosina-nigrosina (BARTH & OKO, 1989).

Em seguida, adicionou-se 20µL de sêmen a um microtubocontendo 2mL de solução formol-salina tamponada, de onde foram retiradas alíquotas para avaliação imediata da concentração espermática e posterior análise morfológica em câmara úmida e lâmina corada. A concentração espermática ($x10^6$sptz/mL) foi determinada pela contagem de células em câmara de Neubauer por microscopia ótica com magnitude de 400x. A partir da contagem, foi definido o número de doses inseminantes a serem preparadas.

O sêmen foi dividido em quatro alíquotas de mesmo volume, diluído nos meios correspondentes a cada tratamento e armazenado em palhetas de 0,25mL, seguido da refrigeração e congelação em máquina TK-4000sob curva P2S2, com resfriamento de -0,25°C/min até 5°C por um tempo de estabilização de uma hora e - 20°C/min até atingir --140°C. Em seguida as palhetas foram armazenadas em raques, em botijão criogênico, com nitrogênio líquido a -196°C.

Análises Laboratoriais do sêmen

Os parâmetros integridade de membrana plasmática através do teste hiposmótico, motilidade subjetiva e vigor foram avaliados no momento da diluição, imediatamente após descongelação e durante os tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após descongelação (TTR).

As avaliações referentes a cinética espermática por análise computadorizada, viabilidade espermática por sondas fluorescentes e integridade da membrana plasmática e status de capacitação e reação acrossomal foram realizadas imediatamente após o descongelação.

Morfologia Espermática

Do microtubo contendo sêmen e solução formol salina tamponada, retirou-se alíquotas para análise de alterações morfológicas de cabeça em esfregaço corado com Kit Instant-Prov (Newprov® produtos para laboratório, Pinhais – PR) enquanto para avaliação morfológica de cauda e acrossoma, utilizou-se a técnica de câmara úmida (HANCOCH, 1957). Para ambas as análises, foram contadas 200 células espermáticas em microscopia de contraste de fases com magnitude de 1000x.

Teste de Termorresistência Lento (TTR)

As doses de sêmen foram descongeladas (37°C/ 30s) e realizado o teste de termorresistência lento (TTR), seguindo as recomendações do CBRA (1998), com algumas modificações. O volume seminal das palhetas foi acondicionado em microtubos (1,5mL), previamente aquecidos, recoberto por uma gota de óleo mineral e incubados a mesma temperatura de descongelamento. Sucedeu-se a avaliação imediata da motilidade subjetiva e do vigor espermático durante os tempos de 1, 2, 3, e 4 horas após a descongelação, por meio de microscopia óptica, com magnitude de 100x.

Teste hiposmótico (HOST)

Realizou-se o teste hiposmótico do sêmen diluído e durante o TTR, seguindo-se a técnica utilizada por FONSECAet al. (2005), utilizando solução com osmolaridade de 125mOsm/L. Em microtubo contendo 1,5 mL de solução hiposmótica e mantido em banho-maria a 37ºC, adicionou-se 10µL de sêmen diluído fresco e descongelado nos tempos Zero, 1, 2, 3 e 4 horas, os quais foram incubado por uma hora. Decorrido o tempo, entre lâmina e lamínula em microscópio de contraste de fases com magnitude de 1000X, foram contadas 200 células e o resultado expresso em porcentagem de espermatozoides com calda dobrada subtraindo-se os defeitos de cauda dobrada relacionadas a patologias.

Cinética Espermática por Avaliação Computadorizada

Para análise da cinética espermática, uma palheta de sêmen (0,25 mL) de cada tratamento foi submetida a descongelação (a 37ºC/30s) e o volume depositado em um microtubo, mantido incubado em bloco aquecedor a mesma temperatura de descongelação.

Em seguida, 25 µl da amostra seminal foram depositados em 250 µl de solução de avaliação X-cell (AZEVEDO 2006), de onde retirou-se uma alíquota de 3µl e transferida para uma câmara Makler® (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) preaquecida a 37°C, seguida da captura de imagens por meio de uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies® 602FC, Ahrensburg, Alemanha) conectada a um microscópio com contraste de fase (Nikon® 50i, Japão), sob magnitude de 100x.

As imagens foram capturadas em quatro campos distintos a partir de um ponto central e analisadas pelo software SpermClassAnalyzer (SCA®, Microptics, S.L. Versão 5.0, Barcelona, Espanha). Os parâmetros avaliados foram: motilidade total (MT,%), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de percuso médio (VAP, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), amplitude de

deslocamento lateral da cabeça (ALH, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %). Tomou-se como base o *set-up*de fábrica para a espécie ovina.

Foi realizada a análise de integridade da membrana plasmática (IM) pela combinação das sondas fluorescentes *SYBR® Green* e iodeto de propídio - P.I- (Kit 1-7011 LIVE/DEAD, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), adaptando-se a técnica descrita por GARNER & JOHNSON (1995).

Da amostra seminal diluída na solução de avaliação X-cell, 50µL foram transferidos para microtubos previamente aquecidos (37°C) e acrescentou-se 2,5µL de *SYBR® Green* (10µM), mantendo-se a amostra incubada por cinco minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 2,5 µl de iodeto de propídio (120µM) e1,0 µL de glutaraldeído a 1% diluído em solução Tampão Fosfato-Salina (PhophateBuffered Saline - PBS) sem cálcio (BARTH & OKO, 1989) e após incubação de cinco minutos, realizada a leitura da amostra.

Para tanto, um volume de 12 µl foi depositado entre lâmina e lamínula e foram analisadas 200 células, em microscópio com iluminação epifluorescente (Nikon® 50i, Japão) sob magnitude de 1000x, usando-se filtro com comprimento de onda de excitação de 450-490nm e de emissão de 515nm. Os espermatozoides foram classificados como portadores de membrana plasmática íntegra ou lesada quando apresentavam-se coradas de verde ou vermelho, respectivamente.

Capacitação e Reação Acrossomal

As avaliações de status de capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides foram efetuadas pela clortetraciclina (CTC) segundo técnica descrita por GILLANet al. (1997) adaptada por AZEVEDO (2006).

Ao microtubo contendo o sêmen descongelado, foram adicionados 1000µl de solução Tampão Fosfato-Salina (PhophateBuffered Saline - PBS) sem cálcio (BARTH & OKO, 1989) preaquecida a 37°C. A amostra foi centrifugada a 400g por quatro minutos,

sucedida da retirada do sobrenadante, restando apenas um *pellet* de sêmen, ressuspendido com 150µl de PBS.

Após a ressuspensão, foi retirada uma alíquota de 5µl e adicionada a um microtubo contendo 20µL de solução de CTC (1mM), de onde retirou-se uma alíquota de 12µl e entre lâmina e lamínula, foram analisados 200 espermatozoides por microscópio epifluorescente (Carl ZeissAxioImager A2, Alemanha) sob magnitude de 1000x, excitação de 450-490nm e de emissão de 515nnm.

As células foram classificadas como: F – não capacitadas com acrossomo intacto, com fluorescência amarela por toda a cabeça; B – capacitados com acrossomo intacto, com fluorescência amarelada na região anterior da cabeça e ausência de fluorescência na região pós-acrossomal; e AR – com acrossomo reagido caracterizado pela ausência de fluorecência na região da cabeça correspondente ao acrossomo.

Análise Estatística

Verificou-se a normalidade dos dados através do teste Shapiro-wilk,utilizando o programa estatístico SAS 9.3 (StatisticalAnaliysis System, 2010) onde os que não apresentaram distribuição normal foram transformadas em log(X+1).

As varáveis que apresentaram distribuição normal (motilidade diluído; HOST durante o TTR; CTC padrão F, B e AR; MOT; VCL; VSL; VAP; ALH; BCF), assim como as que não apresentaram normalidade inicial, porém normalizadas pela transformação (MP; IM), foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e as médias avaliadas pelo teste de comparação múltipla Student – Newman – Keuls (NSK) e as que mesmo após transformação não apresentaram normalidade (HOST do sêmen diluído; vigor diluído; vigor e motilidade durante o TTR; LIN, STR) , seguiram para análise de dados não paramétricos de Kruskal-Wallis, com comparação múltipla de médias pelo teste de Dunn.

Adotou-se diferença significativa entre os dados quando $p < 0,05$. Para tanto, utilizou-se o programa estatístico GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego,CA, E.U.A.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A polpa do fruto do noni*in natura* apresentou pH ácido, em torno 3,5 e porcentagem de matéria seca após liofilização de 11,7%. O pH do meio diluidor apresentou os valores de 6,8; 6,7; 6,5 e 6,6 para os tratamentos D1, D2, D3 e D4, respectivamente.

A polpa liofilizada do fruto do Noni apresentou quantidade de fenóis totais (FT) em torno de 16,7 mg/100g de amostra e apesar da atividade antioxidante da amostra ter sido considerada baixa pelo IAA, na concentração de 150 µg/mL, foi responsável por uma redução de 68,45% do radical DPPH contra 97% do ácido gálico (Tabela 1). Entretanto, vale ressaltar que o ácido gálico trata-se de um composto antioxidante puro e que a redução do radical em questão pode ter sido ocasionada, tanto pelos pouco compostos fenóicos quantificados quanto pela presença de possíveis outros compostos antioxidantes existentes na polpa.

A partir do valor da EC_{50}, pôde-se observar que são necessárias mais de 141 µg/mLda polpa liofilizada para reduzir o radical DPPH em 50% conforme podemos observar na tabela1. Os valores encontrados neste trabalho são inferiores aos encontrados por Costa et al. (2013) estudando a atividade antioxidante do extrato alcoólico da polpa in natura do noni com valor do EC_{50} = 40,98 µg/mL para frutos maduros, o que pode ser explicado devido as diferentes condições edafoclimáticas em que a planta se encontra.

Tabela 1- Fenóis totais (FT), potencial de inibição (IP), Concentração Eficiente (EC_{50}) e Índice de Atividade Antioxidante (IAA) da polpa liofilizada do Noni

AMOSTRA	FT (mg GA /100g amostra)	IP	EC_{50}	IAA
*M. citrifolia**	16,7 ± 1,2	68,45 ± 7,32[a]	141,88 ± 6,31[a]	0,28
A. gálico (A.G)**	-	97,55 ± 3,51[b]	9,33 ± 0,22[b]	4,29

FT – fenóis totais expresso em equivalente de ácido gálico; *concentração de 150 μg/mL; **concentração de 10 μg/mL no tempo de 30 minutos. IP – potencial de inibição; EC_{50} – concentração de antioxidante eficiente para reduzir a concentração do radical DPPH em 50%; IAA – Índice de Atividade Antioxidante.[a,b] Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si ($p<0,05$) pelo teste de Dunnet.

O efeito protetor da polpa liofilizada pôde ser observado quando se avaliou a capacidade de inibição da lipoperoxidação (Figura 1). Em meio lipídico contendo como indutor da peroxidação o sulfato ferroso, a inclusão da polpa liofilizada na concentração de 200μg/mL, apresentou efeito protetor significativo $p < 0,05$ impedindo a peroxidação lipídica na ordem de 80%, em relação controle negativo, onde não havia nenhum componente antioxidante contra 97% de inibição do controle positivo trolox.

O efeito redutor da lipoperoxidação pode ter sido influenciado pelos compostos fenóicos existentes, como também devido a outros grupos de compostos fenóicos não identificados pelo método de extração, ou pela existência de outros componentes com capacidade de reduzir a oxidação no meio como,por exemplo, a vitamina C,antraquinonas (WANG & SU, 2001), escopoletina, óxido nítrico, e esteróis (CHAN-BLANCO et al., 2006).

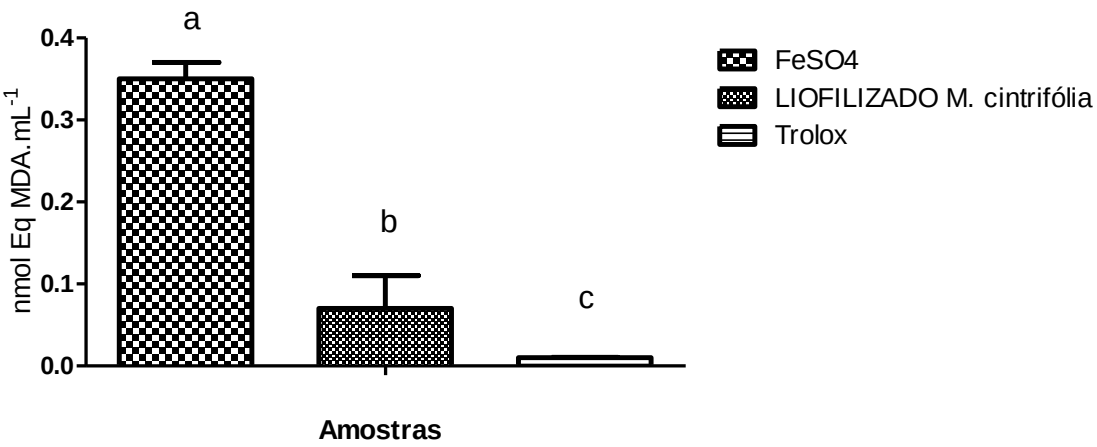

Figura 1- Capacidade de inibição da lipoperoxidação induzida por sulfato ferroso (0,17 M). Dados expressos em média ± desvio padrão. Trolox – controle positivo anti-lipoperoxidativo. Letras diferentes indicam diferença estatística para $p < 0,05$ após avaliação dos dados por ANOVA seguida com pós-teste de Dunnet.

Buscando observar o efeito da polpa liofilizada do fruto do noni quando inclusa a meio diluidor de sêmen (figura 2), foi verificado que a adição da polpa foi capaz de prevenir significativamente ($p<0,05$) a oxidação lipídica induzida pelo $FeSO_4$quando utilizado ao meio diluidor no tratamento D3 contendo 4,70mg/mL numa ordem de 85,96 %. Por outro lado, quando observado a adição nos tratamentos D2 (2,35mg/mL) e D4 (7,05mg/mL), reduziram a lipoperoxidação na ordem de 57,89 e 66,66%, semelhantes ao controle negativo, na ausência de substancia antioxidante, o que leva a pressupor que em concentrações inferiores a 4,70mg/mLe superiores a 7,05mg/mL, a polpa exerce efeito pro-oxidante, favorecendo a lipoperoxidação no meio, o que pode ser justificado devido ao fruto do noniconstituir numa fonte rica de vitamina C, onde apesar da grande eficiência antioxidante, a vitamina C também age paradoxalmente como pró-oxidante (HALLIWELL& GUTTERIDE, 2000).

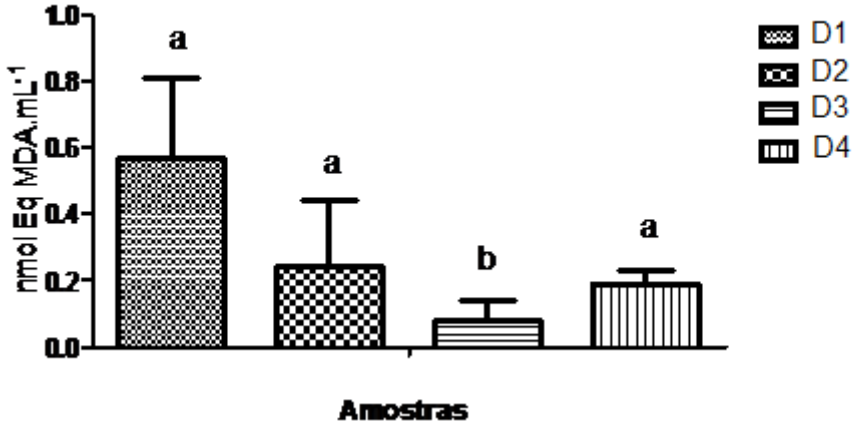

Figura 2- Produção de nmolEq MDA em meios diluidores de sêmen com ou sem a adição da polpa do fruto do Noniliofilizada . D1- grupo controle, sem adição da polpa liofilizada;D2 – diluidor contendo 2,35mg/mL; D3- 4,70mg/mL e D4- 7,05mg/mL. Letras diferentes indicam diferença estatística para $p < 0,05$ após avaliação dos dados por ANOVA ao teste de Dunnet.

Em relação à motilidade subjetiva, após a diluição dos ejaculados nos diferentes tratamentos observou-se diferença significativa ($p<0,05$), onde o uso do diluente com a adição da polpa do Noni liofilizada, na concentração de 7,05mg/mL determinou menor motilidade espermática. Entretanto, manteve-se semelhante ($p<0,05$) após a descongelação e durante o teste de termorresistência lento (Tabela 2), mantendo o valor mínimo preconizado pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998) de trinta por cento (30%) de células móveis para sêmen descongelado. Embora os valores de motilidade observados nos diferentes tempos do TTR sejam numericamente diferentes, a ausência de efeito significativo pode ter ocorrido devido ao alto desvio padrão em decorrência do baixo valor de N utilizado (N=5).

Os valores de motilidade encontrados são semelhantes aos encontrados por CARVALHO et al. (2008) avaliando diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino, encontraram valores de 68% após a diluição e 46% para o sêmen após congelamento de sêmen em em diluente Tris Gema.

Tanto a motilidade espermática (tabela 2) quanto o vigor (tabela 3) durante o teste de termoresistência (TTR), apresentaram comportamento semelhante, sendo altos nas primeiras horas, diminuindo nas intermediárias e, posteriormente, estabilizando em baixos valores nas horas finais do teste. O comportamento manteve-se com o encontrado na literatura, onde MCLAUGHLINet al. (1992) verificaram que o processo de criopreservação diminui a motilidade média dos espermatozóides em aproximadamente 40% sobre os valores iniciais.

Tabela 2- Motilidade subjetiva (%) do sêmen ovino fresco, diluído, descongelado e durante o TTR em diluente contendo diferentes concentraçõesda polpa do noni liofilizada[1].

Variáveis	Tratamento				P
	D1	D2	D3	D4	
Motilidade Diluído	$79\pm3,2_{a}$	$76\pm1,6_{ab}$	$76\pm3,2_{abc}$	$69\pm3,2_{d}$	0,0084
Motilidade TTR 0h	50±4,0	38±12,4	35,6±15,3	23±16,4	0,0550
Motilidade TTR 1h	42± 4,4	31,2±13,0	24,2±19,0	19±15,2	0,2228
Motilidade TTR 2h	21±11,2	23±18,4	21±16,8	10±10	0,5164
Motilidade TTR 3h	12±10,4	13±11,6	12±12,4	0,6±1,0	0,5164
Motilidade TTR 4h	7±9,2	6±7,6	10±10,0	0±0	0,2650

[1]Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ($p<0,05$). TTR – Teste de Termorresistência; D1- grupo controle, sem adição da polpa liofilizada;D2- diluidor contendo 2,35mg/mL; D3- 4,70mg/mL e D4- 7,05mg/mL.

Não foi observado efeito ($P>0,05$) da adição da polpa liofilizada do Noni sobre o vigor espermático (Tabela3) após diluição do sêmen, assim como após descongelação e durante o teste de termorresistência. Permanecendo o vigor mínimo necessário (vigor 3) preconizado pelo CBRA (1998) após a diluição e durante a primeira hora após o descongelação.

Tabela 3- Vigor espermático subjetivo do sêmen ovino fresco, diluído e durante o TTR em diluente contendo diferentes concentraçõesda polpa do noni liofilizada.

Variáveis	Tratamento				P
	D1	D2	D3	D4	
Vig Diluído	3,7± 0,2	3,6± 0,2	3,7± 0,2	3,2± 0,2	0,0667
Vigor TTR 0	3,5±0,0	3,3± 0,2	2,9± 0,6	2,3 ± 1,0	0,0815
Vigor TTR 1h	3,4± 0,2	3± 0,4	2,2± 1,4	1,9± 1,5	0,2723
Vigor TTR 2h	2,4± 0,5	1,8± 1,4	1,8± 1,4	1,4± 1,1	0,8590
Vigor TTR 3h	1,4± 1,3	1,6± 1,3	1,3± 1,2	0,4± 0,6	0,5164
Vigor TTR 4h	0,8± 1,0	0,8± 1,0	1,2± 1,0	0± 0	0,2650

TTR – Teste de Termorresistência; D1- grupo controle, sem adição da polpa liofilizada; D2- diluidor contendo 2,35mg/mL; D3- 4,70mg/mL e D4- 7,05mg/mL. Dados submetidos ao teste Kruskal-Wallis em nível de 5% de significância.

Conforme os resultados da avaliação computadorizada da cinética espermática do sêmen após a descongelação (Tabela 4), verificou-se que a adição da polpa liofilizada do fruto doNoni exerceu efeito ($p<0,05$) sobre a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de percurso médio (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e Batimento Flagelar Cruzado (BCF) onde se observou que a adição da polpa liofilizada do Noni em concentrações superiores a 2,35mg/mL foi prejudicial aos espermatozóides, e a Retilinearidade (STR) foi reduzida com a adição da polpa na concentração de 4,70mg/mL.

Tabela 4- Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Velocidade de Percurso Médio (VAP), Velocidade Progressiva (VSL), Velocidade curvilinear (VCL), Amplitude de Deslocamento Lateral da cabeça (ALH), Batimento Flagelar Cruzado (BCF), Retilinearidade (STR), Linearidade (LIN) de espermatozoides ovinos submetidos a congelação em meio diluidor contendo polpa do noni liofilizada [1].

Variáveis	Diluentes				P
	D1	D2	D3	D4	
MT(%)	$51\pm14,1_{a}$	$41,5\pm8,5_{abc}$	$20,1\pm8,3_{bc}$	$16,9\pm13,9_{c}$	0,0088
MP (%)	$32,6\pm10,7_{a}$	$21,5\pm8,3_{ab}$	$7,5\pm4,9_{c}$	$3,8\pm2,7_{c}$	0,0009
VAP (µm/s)	$119,7\pm22,6_{a}$	$118,8\pm28,3_{ab}$	$68,3\pm17,3_{c}$	$47,5\pm12,7_{c}$	0,0009
VSL (µm/s)	$98,7\pm19,6_{a}$	$76,2\pm22,9_{ab}$	$53,8\pm17,7_{bc}$	$35\pm9,4_{c}$	0,0023
VCL (µm/s)	$198,1\pm39,3_{a}$	$161,6\pm42,9_{ab}$	$123,4\pm22,5_{bc}$	$82,8\pm20,4_{c}$	0,0029
ALH (Hz)	$2,8\pm0,8_{a}$	$2,5\pm0,7_{ab}$	$1,5\pm0,4_{bc}$	$1\pm0,3_{c}$	0,0062
BCF	$43,1\pm1,0_{a}$	$37,2\pm8,7_{ab}$	$34,7\pm12,4_{bc}$	$30,6\pm10,4_{c}$	0,0048
STR (%)	$68,7\pm7,5_{b}$	$56,5\pm17,5_{ab}$	$46,7\pm3,6_{ab}$	$69,8\pm8,7_{a}$	0,0117
LIN (%)	45,3±3,1	39,9±7,6	32,9±12	24,2±2,1	0,0804

[1]Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste SNK ($p<0,05$). D1- grupo controle, sem adição da polpa liofilizada; D2- diluidor contendo 2,35mg/mL; D3- 4,70mg/mL e D4 - 7,05mg/mL. * Submetido ao teste Wilcoxon.**Submetido a anova.

Os resultados sugerem redução da capacidade de fertilização dos espermatozóides ovinos, visto que as variáveis velocidade de percurso médio (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) estão diretamente relacionadas a habilidade do espermatozóide em alcançar o local de fertilização (COX et al., 2006) e o ALH é

importante para a progressão de espermatozóides no muco cervical e está associado a capacidade de penetração do espermatozóide no ovócito (VERSTEGEN, et al. 2002).

É possível que as concentrações utilizadas neste estudo tenham exercido ação pró-oxidante nos meios. Como também podem ter ocorrido interações entre os antioxidantes e o diluidor, fazendo com que os compostos com atividade antioxidante da polpa atuassem como protetores da peroxidação lipídica quando avaliado isoladamente no meio, mas quando adicionado o sêmen, falhem na proteção devido as lesões causadas pelo processo de congelação.

A adição da polpa liofilizada do fruto do Noni não promoveu alterações (P>0,05) relacionadas à funcionalidade da membrana plasmática, determinada pelo teste hiposmóticodo sêmen diluído e durante o teste de termorresistência (Tabela 5). Entretanto, observou-se uma resposta positiva do sêmen descongelado durante o TTR ao teste hiposmótico, com valores superiores a 50%. A reação de enrolamento e/ou dobramento da cauda é considerada como uma reação positiva ao teste, sendo característica de integridade funcional da membrana, que é de fundamental importância para o funcionamento da célula espermática, sendo um dos requisitos mínimos para o processo de fertilização (OBERST et al., 2003).

Os valores de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico encontrados no presente trabalho, imediatamente após a descongelação apresentaram-se superiores aqueles encontrados por FUKUI et al. (2004) para validação de um Analisador de Qualidade Espermática (SQA) e do teste hiposmótico para o sêmen congelado/descongelado de ovinos e Baleia Minke, onde encontraram valores de 41,5% e 44,8% de espermatozóides ovinos reativos ao teste hiposmótico nos momentos 0 e 1 hora após descongelação em solução frutose-citrato a 157 mOsmol/L.

Tabela 5 - Percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST) em sêmen diluído e durante o TTR em meio diluidor contendo polpa do noni liofilizada

Variáveis	Tratamento				P
	D1	D2	D3	D4	
% HOST diluído	68,3±9,8	77,1±1,5	76,5±3,2	72,1±4,1	0,2839
% HOST TTR 0	51,9±8,8	58,3±7,8	52,5±12,0	46,3±9,9	0,6398
% HOST TTR 1h	51,3±7,8	50,7±17,8	45,7±13,0	44,7±9,8	0,8899
% HOST TTR 2h	49,9±6,7	45,7±16,6	50,4±7,7	49,1±8,9	0,9496
% HOST TTR 3h	39,5±11,6	48,1±11,4	45,9±14,4	43,4±14,6	0,8806
% HOST TTR 4h	31,8±9,9	47,8±18,3	45,8±8,3	44,3±17,8	0,7691

TTR – Teste de Termorresistência; D1- grupo controle, sem adição da polpa liofilizada; D2- diluidor contendo 2,35mg/mL; D3- 4,70mg/mL e D4 - 7,05mg/mL.

A inclusão do Noni ao diluidor de sêmen ovino não comprometeu (P>0,05) a integridade das membranas plasmática e acrossomal, e manteve os valores de células com acrossoma intacto e capacitação espermática (Tabela 6). A manutenção das membranas dos espermatozóides é de grande importância, pois a capacitação iniciada quando os espermatozóides deixam o epidídimo não deve ser completada até a ocorrência da ovulação (MEDEIROS et al.,2002) e manteve a proporção próxima a recomendada por AZEVEDO (2006) com valor após o descongelamento próximo ou acima de 20% de células não capacitadas e com acrossomo não reagido.

Tabela 6 – Status de capacitação espermática, reação acrossomal e percentual de espermatozóides com membrana

Variáveis	Tratamento				P
	D1	D2	D3	D4	
CTC F	26,8±5,4	25±6,4	28,4±5,7	28,6±7,5	0.8465
CTC B	12,8±2,9	18,2±6,2	11,4±3,5	12,4±4,9	0.1178
CTC AR	60,4±7,9	56,8±9,4	60,2±8,2	59±5,2	0.3721
IM (%)	11,6±7,9	12,0±8,0	9,6±6,6	9,6±5,1	0.5164

F - espermatozóides não capacitados com acrossomo intacto; B – espermatozóides capacitados com acrossomo intacto; AR – espermatozóides com acrossomo reagido. IM - integridade da membrana plasmática e acrossomal.

A redução da motilidade e das velocidades espermáticas a medida que adicionou-se a polpa liofilizada a partir da concentração de 4,70mg/mL, sem influenciar significativamente ($p>0,05$) a integridade da membrana plasmática pelo HOST, a IM por sondas fluorescentes e status de capacitação e reação acrossomal, pode estar associada a existência de algum composto tóxico aos espermatozóides ovinos.

A inclusão da polpa liofilizada do Noni ao diluente não exerceu efeito significativo ($p>0,05$) sobre a redução da peroxidação lipídica de acordo a produção de MDA nas amostras descongeladas (Figura 3). O que pode ter ocorrido devido as concentrações utilizadas não serem suficientes para reduzir a peroxidação lipídica decorrente da ação de radicais livres produzidos pelos espermatozóides através do metabolismo celular.

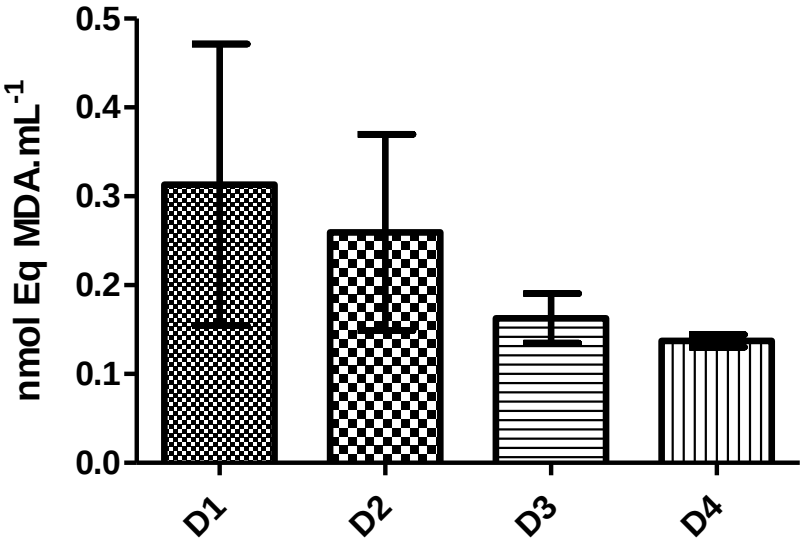

Figura 3 - Produção de nmolEq MDA de sêmen em diluidores sem adição da polpa liofilizada(D1); diluidor contendo 2,35mg/mL (D2); 4,70mg/mL(D3) e 7,05mg/mL (D4).

CONCLUSÃO

A polpa liofilizada do fruto do noniapresentou grande potencial antioxidante quando adicionado em meio diluente para congelação de sêmen ovinona concentração de 4,70mg/mL,reduzindo significativamente aperoxidação lipídica do meio. Entretanto, as concentrações da polpa liofilizada do fruto do noni superiores a 2,35mg/mLtestadas neste estudo foram prejudiciais ao sêmen congelado/descongelado de ovinos quanto aos parâmetros *in vitro* avaliados, sendonecessários mais estudos com a adição da polpa liofilizada do fruto do Noni em diferentes concentrações como ingrediente antioxidante em diluente para congelação de sêmen ovino.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. D. S; SHEEBA, A. A.; RAI, K. B. Cancer preventive Effect of *Morindacitrifolia* (Noni) fruit juice against the AflatoxinB1-induced genotoxicity in human peripheral lymphocytes in vitro. **Journal of Pharmacy,** v. 2(2), p: 228-234, 2012.

ARGOLO, A. C. C. et al. Antioxidant activity of leaf extracts from Bauhinia monandra. **Bioresouce Technology**.v 95, p. 229-233, 2004.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.268-275, 2008.

AZEVEDO, H. C. Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e alfa-lactoalbumina. **Tese** (Doutorado). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista, 2006.

BARTH AD, OKO RJ. **Preparation of semen for morphological evaluation. In: Abnormal morphology of bovine spermatozo**a. Ames, IA: Iowa State University Press, p.285,1989.

BRAMORSKI, A. et al.Total polyphenol content and antioxidant activity of commercial Noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and its components. **BrazilianJournalofPharmaceuticalSciences,** v. 46, n. 4, p. 651-656, 2010.

CARVALHO, F. P. et al. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p. 612-620, 2008

CHAN-BLANCO, Y. et al. The noni fruit (*Morindacitrifolia* L.): a review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties**. Journal of Food Composition and Analysis,** v. 19, p.645–654, 2006.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal,** (2 ed), Belo Horizonte, CBRA, 1998. 49p.

COX, J.F. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, .66, p. 860-867, 2006.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, [S.n.], p. 421-431, 1990.

FONSECA, J. F. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 139-144, 2005.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v.2, p. 276 – 284, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDE, J.M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3º ed. Oxford University Press, Oxford. 2000. 936 p.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar espermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Societ**, v. 76, p. 84 – 97, 1957.

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

LÓPEZ-GATIUS, F. Effect of solid storage at 15ºC on subsequent motility and fertility of rabbit semen. **Theriogenology**, v.64, p. 252-260, 2005.

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

MARTI, E. et al. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology,** v.29, p.459-467, 2008.

McLAUGHLIN, E.A. et al. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.527-534, 1992.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**,v.57, p.327-344, 2002.

MOURA, L. C. O. et al. Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. 1, p. 146-150, 2010.

OBERST, E.R. et al. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática de carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.375-376, 2003.

SANTOS, A.D.F. et al. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 438-439, 2001.

SANTOS, V. P. et al. Fertirrigação da bananeira cv. Prata-Anã com N e K em um argissolo vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.2, p. 567-573, 2009.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chem.** v. 112, p. 654-658, 2009.

SILVA, L. R. et al. Caracterização do fruto de *Morinda citrifolia L. (noni)*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.17, n.1, p. 93-100, 2012.

SOLER-RIVAS et al. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochem Analysis.** v. 11, p. 330-338, 2000.

SOUSA, C. M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

SU, B. N. et al. Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. **Journal of Natural Products**, v.68, n.4, p.592-595, 2005.

TEMITOPE, A, A. et al. Protective Effect of Tahitian Noni Juice on the Reproductive Functions of Male Wistar Rats Traeted with Cyclophosphamide. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v.10, n.1, p. 39-43, 2011.

VERSTEGEN, J. et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and

1 veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

2 WANG, M.Y. et al. Morinda citrifolia (Noni): a literature review and recent advances in

3 Noni research. **Acta Pharmacol Sinica**, v.23, p.1127–1141, 2002.