



Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino

Erick Fonseca de Castilho¹, José Domingos Guimarães², Leonardo Franco Martins¹, Rogério Oliveira Pinho¹, Simone Eliza Facioni Guimarães³, Cláudio José Borela Espescht³

¹ *Doutorando em Reprodução Animal, DVT/UFV, Viçosa, MG.*

² *Departamento de Veterinária/UFV, Viçosa, MG.*

³ *Departamento de Zootecnia/UFV, Viçosa, MG.*

RESUMO - Os objetivos neste estudo foram verificar se a própolis e o ácido ascórbico têm efeito sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de caprinos e investigar o potencial desses antioxidantes no uso de meios diluidores de criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados cinco bodes adultos das raças Alpina (n = 2) e Saanen (n = 3). Após a coleta de sêmen, realizaram-se o exame físico do sêmen e morfológico dos espermatozoides, o teste supravital e o teste hiposmótico. Em seguida, o sêmen fresco foi diluído com o diluidor Bioxcell® (controle); Bioxcell® + 0,25% de extrato liofilizado de própolis; Bioxcell® + 0,5% de extrato liofilizado de própolis; Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico; ou Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico. Após as diluições finais, foram avaliados a motilidade e o vigor espermático obtidos com cada diluidor e posteriormente o sêmen foi submetido a envase, resfriamento e congelamento. No sêmen fresco, os aspectos físicos e morfológicos e os resultados dos testes supravital e hiposmótico não diferiram entre os animais nem entre raças. As médias gerais de motilidade e vigor espermático e dos testes supravital e hiposmótico obtidos logo após o descongelamento e após 3 horas de teste de termorresistência diferiram entre si, de modo que o diluidor contendo ácido ascórbico e o controle foram similares e superiores àqueles contendo própolis. O ácido ascórbico mantém a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides durante o processo de criopreservação, bem como sua viabilidade após o teste de termorresistência, e pode ser uma alternativa na composição de diluentes para criopreservação de sêmen caprino; a própolis não é eficaz na manutenção da integridade e da viabilidade espermática pós-descongelamento e é tóxica aos espermatozoides nas concentrações de 0,25 e 0,5%.

Palavras-chave: ácido ascórbico, antioxidantes, caprinos, criopreservação, própolis, sêmen

Use of propolis and ascorbic acid on goat semen cryopreservation

ABSTRACT - The objectives of this study were to verify whether propolis and ascorbic acid have an effect on plasmatic membrane integrity of goat spermatozoa and investigate the potential of these antioxidants in the use of goats spermatozoa cryopreservation extenders. Five adult boars were used of the Alpine (n = 2) and Saanen (n = 3) breeds. After semen collection, the evaluation consisted of the physical and morphological exam, live and dead cells (supravital test) and hyposmotic swelling test. Afterwards, the fresh semen was diluted with the Bioxcell® extender (control); Bioxcell® + 0.25% freeze dried propolis extract); Bioxcell® + 0.5% freeze dried propolis extract); Bioxcell® + 0.05% ascorbic acid) or Bioxcell® + 0.25% ascorbic acid). After final dilutions, the sperm motility and vigor were assessed obtained in each extender, and then the semen was sealed, cooled and frozen. In fresh semen, the physical and morphological aspects and the results of the supravital test and hyposmotic swelling test did not differ between animals or breeds. The general means of the sperm motility and vigor, supravital test and hyposmotic swelling test obtained immediately after thawing and after three hours of heat resistance test were different, so that the extender with ascorbic acid and the control were similar and higher than the extenders containing propolis. The ascorbic acid maintained the structural integrity of the spermatozoa membrane during the cryopreservation process and its viability after the heat resistance test, and may be an alternative in extender composition for cryopreservation of goat semen; the propolis was not effective in maintaining sperm integrity and viability after thawing and was toxic to spermatozoa at concentrations of 0.25 and 0.5%.

Key Words: acid ascorbic, antioxidants, cryopreservation, goat, propolis, spermatozoa

Introdução

O estresse oxidativo é um fator associado à diminuição da fertilidade durante a estocagem do sêmen. A geração de espécies reativas ao oxigênio é consequência normal do metabolismo oxidativo e parece estar envolvida nos danos dos espermatozoides em condições hipotérmicas de estocagem (Maxwell & Watson, 1996). O excesso de reação oxidativa tem efeito destrutivo na membrana espermática e no DNA dos espermatozoides. A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados (Zalata & Depuydt, 1998), os quais se tornam altamente sensíveis a espécies reativas de oxigênio (Comhaire et al., 1999).

O ácido ascórbico reduz o α -tocoferol, peróxidos e espécies reativas ao oxigênio (ROS), como superóxidos, e atua também prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (Nordberg & Årner, 2001). Em caprinos, a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico diminui significativamente com a suplementação de ácido ascórbico e α -tocoferol (Brzezinska-Slebozinska et al., 1995).

Borges (2003), criopreservando sêmen de bovinos com diluente contendo ácido ascórbico, observou excelentes resultados na motilidade durante a hora 0 (75%) e a hora 3 (63%) do teste de termoresistência, como observado por Foote et al. (2002), que, avaliando a eficácia do ácido ascórbico em diferentes concentrações sobre o sêmen bovino refrigerado a 5 °C, observaram motilidade espermática em 63%. Os autores concluíram que esse antioxidante pode ser uma excelente alternativa na criopreservação de sêmen.

No homem, vários trabalhos têm sido publicados divulgando e revisando as propriedades biológicas da própolis, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoária, hepatoprotetoras, antitumoral, cicatrizante, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, entre outras (Pereira et al., 2002; Sforcin et al. 2002).

Oliveira et al. (2007) estudaram o efeito da adição de própolis ao meio diluidor em diferentes concentrações (0,25 e 0,5%) e sua influência nas características físicas do sêmen equino resfriado a 5 °C e concluíram que a própolis não teve efeitos benéficos sobre as características físicas do sêmen equino resfriado a 5 °C.

Nesse sentido, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da própolis e do ácido ascórbico sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides e seu uso em diluentes na criopreservação de sêmen caprino.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido no mês de janeiro de 2008, no município de Viçosa, região da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil, no município localizado a 20°45'45" latitude Sul e 42°52'04" a Oeste de Greenwich, altitude média de 690 m, temperatura média anual de 20,9 °C, índice pluviométrico anual de 1.203 mm e clima do tipo CWA (inverno seco e verão chuvoso) pela classificação de Köppen.

Foram utilizados cinco reprodutores, dois da raça Alpina e três da raça Saanen criados em condições intensivas, com boa condição corporal, com aproximadamente 5 anos de idade, avaliados e aprovados para reprodução por meio de exame andrológico, de acordo com os padrões de qualidade de sêmen *in natura* preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

A alimentação foi feita duas vezes ao dia com silagem de milho e concentrado proteico (550 g/dia). Água e sal mineral foram fornecidos à vontade e o manejo sanitário empregado foi o mesmo utilizado para o rebanho da propriedade.

Utilizaram-se fêmeas em estro induzido com cipionato de estradiol (E.C.P.[®] - Pharmacia Brasil Ltda.) como manequim, contidas em tronco de coleta. Os ejaculados foram obtidos por meio de vagina artificial, com temperatura da água de 42 a 44 °C no momento da coleta e pressão de 40 a 60 mm Hg, de modo que se obteve 1 ejaculado/animal a cada 3 dias durante duas semanas, totalizando 5 ejaculados/animal. Os ejaculados coletados foram armazenados em tubos graduados protegidos de luz solar com papel laminado e posteriormente colocados em banho-maria a 37 °C.

Na avaliação física do sêmen *in natura*, foram analisados os seguintes aspectos: volume (mL), aspecto (aquoso, opalescente, leitoso e cremoso), turbilhonamento (0-5), motilidade espermática progressiva retilínea (%), vigor (0-5) e concentração espermática (espermatozoides/mL). Uma gota de sêmen de cada ejaculado foi colocada em uma lâmina previamente aquecida a 37 °C. Em aumento microscópico de 100 X, foi avaliado o tubilhonamento (movimento espermático em massa). Posteriormente, colocou-se uma lamínula previamente aquecida a 37 °C sobre a gota de sêmen e, em aumento de 400 X, foram avaliados a motilidade espermática progressiva retilínea (0 – 100%) e o vigor espermático (0 – 5) de acordo com o preconizado pelo CBRA (1998).

Em tubo plástico de 1,5 mL contendo 1 mL de formol-salino tamponado (Hancock, 1957) foram acondicionadas alíquotas do sêmen suficiente para turvar a solução, para análise morfológica dos espermatozoides por meio de

preparação úmida e com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1250 X. Foram contabilizadas 400 células por ejaculado e a porcentagem dos defeitos espermáticos foi registrada segundo os critérios estabelecidos por Blomm (1973) e preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Foram considerados ejaculados ideais para este estudo aqueles que apresentaram padrões físicos mínimos de volume total de 0,8 mL, vigor espermático 3 e motilidade espermática total de 70%, e padrões morfológicos máximos de 30% de defeitos totais e 10% de defeitos maiores (CBRA, 1998).

Após o exame físico, o sêmen fresco foi diluído na proporção 1:9 com solução de ringer com lactato a 37°C, homogeneizado, dividido em cinco alíquotas iguais em tubos graduados e centrifugados a 600 G por 10 minutos (Dell'Aqua Junior & Papa, 2001). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Cada pélete do sêmen formado foi ressuspenso até completar 1 mL com diluente, constituindo cinco soluções diluentes: controle - diluente comercial Bioxcell® - IMV; Bioxcell® + 0,25% de extrato liofilizado de própolis (Oliveira et al., 2007); Bioxcell® + 0,5% de extrato liofilizado de própolis (Oliveira et al., 2007); Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico (Foote et al., 2002); e Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico (Foote et al., 2002).

Após a ressuspensão de cada pélete do sêmen, adicionou-se uma alíquota de 10 µL de sêmen diluído de cada solução em 2 mL de solução formol-salina tamponada para determinação da concentração espermática/mL (método hematocitométrico) e cálculo do número de doses e do volume final de diluente a ser adicionado.

Após as diluições finais, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade e ao vigor espermático. Posteriormente, foram envasadas em palhetas de 0,25 mL (modelo francês; concentração total de 50 milhões de espermatozoides/dose ou 200 milhões/mL) em temperatura ambiente. As palhetas foram colocadas em um tubo de ensaio de 20 mL revestido por um refil (saco plástico) e colocadas dentro de um recipiente de plástico com capacidade de 240 mL, contendo 120 mL de álcool metílico absoluto. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira, com temperatura interna de 4 a 5 °C, durante 35 minutos. Após este período, o tubo de ensaio contendo as palhetas foi retirado do recipiente plástico e mantido na temperatura da geladeira por mais 25 minutos (Fürst et al., 2005; Bispo, 2005).

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas sobre um suporte de aço inox, a uma altura de 5 cm acima da lâmina de nitrogênio líquido, acondicionado em uma caixa de isopor com 40 cm

comprimento × 32 cm de altura × 20 cm de largura, contendo uma lâmina de 5 cm de altura de nitrogênio em seu interior, e pré-congeladas durante 14 minutos. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio para o congelamento final do sêmen e, em seguida, foram raqueadas e devidamente identificadas e estocadas em botijão com nitrogênio para análises posteriores.

As doses congeladas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL (Eppendorf®) e homogeneizadas para análise imediata de motilidade e vigor espermático, por meio de microscopia com contraste de fase, em aumento de 200 X ou 400 X (CBRA, 1998).

Uma amostra de sêmen de cada partida, após o descongelamento, foi submetida ao teste de termorresistência (TTR) para avaliação de sua motilidade após o estresse térmico. A motilidade espermática progressiva retilínea foi avaliada a cada 0, 60, 120 e 180 minutos até o final de 3 horas de incubação em banho-maria a 38 °C (Vogler et al., 1991). Da mesma forma, uma amostra de sêmen de cada partida ou sêmen fresco foi submetida ao teste supravital para avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides empregando-se eosina-nigrosina na proporção 1:1 (sêmen:corante), classificando-os em vivos (não-corados) e mortos (corados de rosa – avermelhados) (Smith & Murry, 1997), após 60 segundos de confecção da lâmina (Mayer et al., 1951; Swanson & Bearden, 1951).

As amostras do sêmen fresco e uma partida de sêmen descongelado de cada tratamento foram submetidas ao teste hiposmótico para determinação da integridade estrutural da membrana plasmática. Foram considerados normais os espermatozoides que responderam ao teste (reativos) enrolando a cauda após a adição da solução hiposmótica de 100 mOsm/kg (9 g de frutose, 4,9 g de citrato trissódico e 1.000 mL de água destilada) (Revell & Mrode, 1994).

Uma alíquota de 10 µL da amostra de sêmen foi adicionada em 1 mL de solução hiposmótica e, após a homogeneização, foi incubada em banho-maria a 37 °C. Após 1 hora de incubação, as amostras foram armazenadas em 0,5 mL de solução formol-salina tamponada para fixação. Em seguida, foram montadas entre lâmina e lamínula e analisadas em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1250 X, analisando-se 400 espermatozoides por dose descongelada ou amostra de sêmen *in natura*.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa estatístico SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007), segundo um delineamento inteiramente casualizado, arranjado em esquema fatorial 2 × 5, composto de duas raças (Saanen e

Alpina) e cinco soluções diluentes. Os dados foram analisados separadamente por não haver interação entre os fatores. Para todas as características estudadas, realizaram-se a estatística descritiva (médias, desvios-padrão e coeficiente de variação) e a correlação simples de Pearson.

Para os valores quantitativos, realizou-se teste de Lilliefors e Cochran-Bartlett para verificar, respectivamente, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias e, quando necessário, foi feita a conversão pertinente dos dados, que novamente foram analisados por esses testes. Quando não atenderam às premissas da ANOVA, os dados foram analisados por análise não-paramétrica (Kruskal Wallis). Para as características quantitativas, foi empregada a ANOVA e aquelas que se apresentaram diferenças significativas no teste F foram comparadas pelo teste Tukey, com probabilidade de erro de 5%.

Para o teste de termorresistência, os dados obtidos com cada diluente foram analisados por análise de regressão para verificar o comportamento dos dados durante 3 horas de incubação e também pela ANOVA.

Resultados e Discussão

No sêmen fresco, o aspecto, o volume, a motilidade espermática, o vigor espermático, o teste supravital, o teste hiposmótico e os defeitos espermáticos maiores e menores variaram ($P > 0,05$) entre os animais, porém sem diferença significativa (Tabelas 1 e 2). No entanto, os

resultados de turbilhonamento e defeitos espermáticos totais diferiram ($P < 0,05$) entre os animais, o que indica efeito individual sobre determinados parâmetros reprodutivos. Apesar dessas diferenças, todos os parâmetros estão dentro da normalidade para a espécie caprina (CBRA, 1998).

Os valores de motilidade e vigor espermático deste estudo corroboram os estudos realizados por Azerêdo et al. (2001), Bittencourt et al. (2005) e Palhão (2006) e indicam que os animais utilizados foram excelentes e homogêneos quanto aos aspectos físicos do sêmen. Da mesma forma, a média geral de defeitos maiores, menores e totais não ultrapassou os valores normais para caprinos preconizados pelo CBRA (1998), classificados como aptos à reprodução.

Os valores obtidos no teste supravital foram semelhantes aos observados por Bispo (2005) e muito próximos aos valores de motilidade espermática no sêmen fresco, o que reflete acurácia na subjetividade da avaliação da motilidade, confirmando os estudos de Mayer et al. (1951) e Swanson & Bearden (1951).

Para o teste hiposmótico, valores similares foram obtidos por Bittencourt et al. (2005) e muito superiores aos verificados por Bispo (2005). Neste estudo e nos estudos citados, o percentual de espermatozoides reativos ao teste foi inferior aos valores de motilidade espermática e de espermatozoides não-corados no teste supravital, o que comprova a importância do teste hiposmótico para avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides para o sêmen fresco.

Tabela 1 - Percentual de espermatozoides não-corados no teste supravital e aspectos físicos do sêmen fresco em caprinos adultos criados em regime intensivo

Animal	Aspecto (0 - 4)	Volume (mL)	Turbilhonamento (0 - 5)	Motilidade (%)	Vigor (0 - 5)	Teste supravital (%)
1	3,6 ± 0,5a	0,8 ± 0,1a	3,8 ± 0,7ab	92,0 ± 4,4a	3,9 ± 0,4a	89,0 ± 6,0a
2	3,6 ± 0,5a	1,1 ± 0,3a	3,7 ± 0,6b	88,0 ± 5,7a	3,9 ± 0,2a	87,2 ± 5,6a
3	4,0 ± 0,0a	1,1 ± 0,5a	4,0 ± 0,3ab	91,0 ± 2,2a	4,2 ± 0,2a	88,2 ± 6,2a
4	4,0 ± 0,0a	0,8 ± 0,3a	4,8 ± 0,2a	91,0 ± 6,5a	4,3 ± 0,4a	90,6 ± 6,6a
5	3,8 ± 0,4a	0,8 ± 0,3a	3,8 ± 0,4ab	90,0 ± 3,5a	4,2 ± 0,4a	88,0 ± 3,3a
Geral	3,8 ± 0,4	0,9 ± 0,3	4,0 ± 0,6	90,4 ± 4,5	4,1 ± 0,3	88,6 ± 5,3

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

Tabela 2 - Percentual de espermatozoides reativos no teste hiposmótico e das características morfológicas dos espermatozoides de caprinos adultos criados em regime intensivo

Animal	Defeitos espermáticos			Teste hiposmótico (%)
	Maiores (%)	Menores (%)	Totais (%)	
1	10,6 ± 2,5a	9,8 ± 2,5a	20,4 ± 1,8a	69,4 ± 11,8a
2	7,4 ± 1,8a	7,8 ± 1,2a	15,2 ± 2,1b	78,4 ± 19,0a
3	7,4 ± 2,4a	6,9 ± 1,5a	14,1 ± 2,6b	59,2 ± 29,2a
4	7,6 ± 1,7a	6,9 ± 2,3a	14,5 ± 2,2b	84,4 ± 11,5a
5	8,2 ± 1,3a	7,5 ± 1,7a	15,7 ± 2,1b	59,8 ± 18,9a
Geral	8,2 ± 2,2	7,7 ± 2,0	16,0 ± 3,0	70,2 ± 20,3

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

A concentração espermática, o percentual de espermatozoides reativos no teste supravital e hiposmótico, os defeitos espermáticos e os aspectos físicos do sêmen fresco não diferiram ($P > 0,05$) entre as raças (Tabela 3). Os valores de motilidade espermática nas raças Saanen deste estudo são superiores aos registrados por Rovay (2006), que registrou 86%, no entanto, para a raça Alpina, os valores de motilidade espermática foram similares aos registrados por esse autor (84%).

Os valores médios de espermatozoides reativos ao teste supravital para as raças Saanen e Alpina estão de acordo com os observados por Rovay (2006), de 89,8 e 92,6%, respectivamente. No teste hiposmótico, os valores foram superiores aos observados por Santos et al. (2006), de 33% na raça Saanen e 39,8% na raça Alpina, porém esses autores utilizaram solução hiposmótica de 60 mOsm/kg. Martins et al. (2006) empregaram o teste hiposmótico (100 mOsm/kg) em caprinos da raça Alpina e observaram valores inferiores (24,5% de espermatozoides reativos) aos deste estudo. Fonseca et al. (2005) avaliaram várias concentrações de soluções hiposmóticas (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 mOsm) no sêmen fresco de caprinos e não notaram diferença no percentual espermatozoides reativos entre as soluções de 60 e 100 mOsm.

Os valores obtidos neste estudo comprovam que, em condições normais, não há efeito da raça sobre as características seminais, mesmo quando o sêmen é submetido a testes complementares.

Não houve correlação do aspecto e do turbilhonamento com as demais variáveis. Houve correlação média e negativa ($r = -0,46$) entre o volume e o teste hiposmótico, o que indica que os maiores números de espermatozoides reativos foram aqueles presentes em ejaculados de menor volume. Provavelmente, os menores volumes dos ejaculados ocorreram pela frequência das coletas durante a metade final do experimento, conseqüentemente, menor tempo de

estocagem na cauda do epidídimo, o que não ocorreu no início do estudo, uma vez que os animais, apesar de terem sido submetidos a sessões de coletas para esgotar a reserva extra gonádica, foram submetidos previamente a um período de repouso sexual prolongado.

A motilidade espermática apresentou correlação média e positiva com vigor ($r = 0,52$) e o teste supravital ($r = 0,55$), o que, de certo modo, comprova a acurácia na avaliação da motilidade espermática por meio de microscopia convencional, visto que os valores atribuídos para esses parâmetros foram semelhantes entre os procedimentos de avaliação e, em número absoluto, pouco superiores, o que indica grande percentual de espermatozoides vivos no sêmen fresco. Portanto, a avaliação da motilidade espermática, embora feita de forma subjetiva, quando realizada por técnico previamente treinado, apresenta boa relação com a real qualidade seminal.

Houve correlação alta e positiva ($r = 0,73$ e $0,69$) entre defeitos espermáticos maiores e menores com os defeitos totais, indicando que tanto os defeitos espermáticos menores e maiores estavam presentes nos ejaculados estudados. Houve também relação média e negativa ($r = -0,40$) entre os defeitos espermáticos maiores e o teste hiposmótico, mas não foram observados defeitos menores, o que é esperado, uma vez que o teste hiposmótico representa principalmente os defeitos de cabeça e que são avaliados somente os dobramentos e enrolamentos de caudas. Entre os defeitos maiores, foram observados defeitos de cauda, que são as principais anomalias espermáticas nesta classificação e mostraram-se pouco reativos ao teste hiposmótico por estarem relacionadas a problemas de membrana plasmática.

A maioria dos estudos não aborda a relação dos testes complementares (teste hiposmótico e teste supravital) e dos aspectos físicos (motilidade e vigor espermático) no

Tabela 3 - Concentração espermática, teste supravital, aspectos físicos do sêmen e características morfológicas dos espermatozoides de caprinos adultos das raças Saanen e Alpina criados em regime intensivo

	Raça Saanen	Raça Alpina	Geral
Aspecto (0 a 4)	3,9 ± 0,3	3,7 ± 0,5	3,8 ± 0,4
Volume (mL)	0,9 ± 0,4	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,4
Turbilhonamento (0 a 5)	4,2 ± 0,6	3,7 ± 0,5	4,0 ± 0,6
Motilidade espermática progressiva (%)	91,3 ± 4,4	89,0 ± 4,6	90,4 ± 4,5
Vigor espermático (0 a 5)	4,1 ± 0,4	4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,4
Teste supravital (%)	89,3 ± 5,9	87,6 ± 4,4	88,6 ± 5,3
Concentração espermática por mL	686,7 ± 286,1	643,0 ± 295,4	669,2 ± 284,5
Defeitos espermáticos maiores (%)	8,5 ± 2,5	7,8 ± 1,5	8,2 ± 2,2
Defeitos espermáticos menores (%)	7,8 ± 2,7	7,6 ± 1,4	7,7 ± 2,0
Defeitos espermáticos totais (%)	16,4 ± 3,6	15,4 ± 2,0	16,0 ± 3,0
Teste hiposmótico (%)	71,0 ± 20,9	69,1 ± 20,4	70,2 ± 20,3

sêmen descongelado de acordo com a variação individual e racial; restringem-se apenas ao sêmen fresco.

As médias da motilidade do sêmen diluído (pré-resfriamento) de todos os diluentes em cada raça não diferiram entre si ($P>0,05$), comprovando que os diluentes contendo ácido ascórbico e própolis mantiveram a viabilidade espermática após a diluição final (Tabela 4).

Durante o teste de termorresistência, em ambas as raças, o diluente controle e aqueles contendo ácido ascórbico resultaram em motilidade espermática superior à observada com os diluentes contendo própolis, porém o diluente controle manteve maior estabilidade da motilidade espermática em comparação àqueles contendo ácido ascórbico ao longo do teste de termorresistência. A própolis mostrou-se tóxica aos espermatozoides durante o processo de criopreservação e no teste de termorresistência.

De acordo com os valores de motilidade espermática mínima pós-descongelamento e com o teste de termorresistência de cinco minutos, preconizados pelo CBRA (1998) (30%), as amostras de sêmen criopreservados utilizando-se os diluentes contendo ácido ascórbico e controle (ambas as raças) foram aprovadas quanto à viabilidade para o uso nos programas de inseminação artificial.

Santos et al. (2006), utilizando tris-citrato-gema-glicerol e o teste de termorresistência com duração de 2

horas, observaram na raça Saanen valores de motilidade espermática (início e final do termorresistência) inferiores (26,9 e 18,9%, respectivamente) aos obtidos com o diluente contendo ácido ascórbico e o controle e superiores aos observados com o diluente contendo própolis. No teste hiposmótico (60 mOsm/kg), os autores observaram valores superiores aos determinados com o diluente contendo própolis e similares àqueles contendo ácido ascórbico e controle na raça Saanen, uma vez que 303% dos espermatozoides reagiram ao teste hiposmótico.

Na raça Alpina, Santos et al. (2006) observaram valores de motilidade espermática (início e final do teste de termorresistência) similares (31,9 e 25%, respectivamente) aos obtidos com os diluentes contendo ácido ascórbico e controle e superiores aos encontrados com o diluente contendo própolis. No teste hiposmótico (60 mOsm/kg), os mesmos autores observaram valores superiores, com reação ao teste hiposmótico em 39,3% dos espermatozoides.

As médias do vigor espermático do sêmen fresco na raça Saanen não diferiram ($P>0,05$) entre os indivíduos e entre diluentes (Tabela 6), enquanto, na raça Alpina, houve diferença entre os demais diluentes, de modo que somente os diluentes controle e 0,5% de ácido ascórbico diferiram entre si ($P<0,05$). Apesar das diferenças, os valores são considerados normais para a espécie caprina (CBRA, 1998).

Tabela 4 - Motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e percentual de espermatozoides não-corados nos teste supravital e reativos no teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento durante o teste de termorresistência em cada diluente em caprinos adultos das raças Saanen e Alpina criados em regime intensivo

Diluente	Motilidade no sêmen diluído	Motilidade espermática (horas)				Teste supravital (0 hora)	Teste hiposmótico (0 hora)
		0	1	2	3		
Saanen							
Controle (Bioxcell®)	83,6 ± 6,9a*	43,6 ± 18,2a	40,0 ± 16,6a	36,6 ± 16,5a	32,0 ± 14,6a	24,8 ± 11,2a	24,0 ± 8,8a*
Bioxcell® + 0,25% de própolis	82,3 ± 7,5a*	10,6 ± 9,0bc	9,2 ± 9,4bc	4,3 ± 5,6bc	1,3 ± 2,2bc	5,0 ± 7,8bc	12,0 ± 5,8b*
Bioxcell® + 0,5% de própolis	82,6 ± 5,3a*	4,5 ± 4,8bce	2,5 ± 4,1bce	0,6 ± 1,7bce	0bce	2,4 ± 3,2bce	11,4 ± 6,1b*
Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico	83,6 ± 5,5a*	42,0 ± 16,5adfg	37,0 ± 15,6adfg	31,6 ± 16,6adfg	19,6 ± 14,0adfg	28,0 ± 13,2adfg	26,9 ± 11,7a*
Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico	83,3 ± 5,8a*	41,0 ± 17,7adfg	36,6 ± 17,4adfg	30,3 ± 18,6adfg	15,3 ± 15,3acfg	21,0 ± 14,7acfg	23,5 ± 10,0a*
Alpina							
Controle (Bioxcell®)	83,5 ± 5,3a*	39,0 ± 12,6a	36,0 ± 12,2a	33,5 ± 12,0a	28,5 ± 8,1a	21,6 ± 7,6a*	21,3 ± 8,3ab
Bioxcell® + 0,25% de própolis	84,5 ± 5,9a*	10,5 ± 9,8bc	7,0 ± 8,8bc	3,5 ± 4,1bc	0,5 ± 1,5bc	4,0 ± 2,7b*	11,8 ± 5,2bc
Bioxcell® + 0,5% de própolis	82,5 ± 6,3a*	2,7 ± 2,4bce	1,5 ± 2,4bce	0,2 ± 0,6bce	0bce	1,8 ± 3,7b*	8,1 ± 4,3c
Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico	83,5 ± 6,2a*	32,5 ± 7,5acfg	30,5 ± 7,2adfg	26,5 ± 8,1adfg	17,0 ± 10,3adfg	15,1 ± 6,3a*	22,2 ± 8,0a
Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico	81,5 ± 6,6a*	39,5 ± 16,4adfg	32,5 ± 16,5adfg	29,5 ± 16,0adfg	17,5 ± 12,5adfg	23,6 ± 3,9a*	24,1 ± 11,5a

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

* = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5%.

No teste de termorresistência, em ambas as raças, o diluente controle e aqueles contendo o ácido ascórbico resultaram em valores médios de vigor espermático superiores aos obtidos com o diluente contendo própolis. Diferentemente da motilidade espermática observada nas duas raças, o vigor, no caso dos diluentes contendo ácido ascórbico e controle, mostrou estabilidade similar entre si durante o teste (Tabela 5). No caso dos diluentes contendo própolis, observou-se redução significativa do vigor espermático, com valores próximos ou iguais a zero no final do teste de termorresistência, que indicam toxicidade da própolis.

Santos et al. (2006) observaram na raça Saanen valores de vigor espermático, no momento do descongelamento e ao final do teste de termorresistência de duas horas (vigor 2,8 e 2,1, respectivamente), similares aos diluentes contendo ácido ascórbico, controle e 0,25% de própolis, e superiores àquele contendo 0,5% de própolis. Na raça Alpina, observaram valores de vigor espermático, no momento do descongelamento (vigor 2,8), similares àqueles contendo ácido ascórbico, ao controle e àqueles com 0,25% de própolis, e superiores ao diluente contendo 0,5% de própolis. Já no final do teste de termorresistência de duas horas, observaram valores similares (vigor 2,3) aos obtidos com os diluentes contendo ácido ascórbico e controle, e superiores aos dos diluentes contendo própolis.

Segundo os valores mínimos de vigor espermático pós-descongelamento e após teste de termorresistência de cinco 5 minutos, preconizados pelo CBRA (1998) (vigor 2), as partidas de sêmen congelado estiveram dentro da normalidade para a espécie e aptas para uso em programas de inseminação artificial.

As médias gerais de motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) não diferiram entre si ($P>0,05$) (Tabela 6), comprovando que o processo de centrifugação,

remoção do plasma seminal e ressuspensão do pélete de espermatozoides foram eficazes na manutenção da motilidade espermática, viabilizando as amostras para o processo de resfriamento e congelamento. Por meio dos testes supravital e hiposmótico, verificou-se que o ácido ascórbico manteve a integridade estrutural da membrana e aumentou a viabilidade espermática em relação à própolis, embora não tenha se mostrado superior ao diluente controle ($P>0,05$) (Tabela 6). Essa manutenção pode ser explicada pela proteção da membrana espermática da peroxidação lipídica, reduzindo a produção de espécies reativas ao oxigênio e a lesão espermática, tornando os espermatozoides inviáveis no programa de inseminação artificial (Ochsendorf, 1999; Pereira et al., 2002).

A própolis não proporcionou estabilização estrutural da membrana espermática, embora fossem esperados melhores valores de motilidade espermática ao descongelamento. Por outro lado, o ácido ascórbico manteve a estabilidade celular e a qualidade seminal durante o teste de termorresistência.

De acordo com Nordberg & Árner (2001), o ácido ascórbico pode reduzir a ação de radicais livres, principalmente o superóxido e espécies reativas ao oxigênio sobre os espermatozoides, prevenindo a formação de hidroperóxidos de lipídios nas lipoproteínas celulares e mantendo a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação, protegendo as células dos danos oxidativos. No caso da própolis, além de apresentar inúmeras substâncias em sua composição e em diferentes concentrações (Pereira et al., 2002; Sforcin et al., 2002), ainda não foi elucidada sua verdadeira ação antioxidante *in vitro* sobre os espermatozoides. Apesar da baixa concentração nos diluentes, alguma substância presente na própolis pode ter sido tóxica às células, de modo que a baixa viabilidade espermática foi verificada após o

Tabela 5 - Vigor espermático do sêmen fresco e diluído após descongelamento durante o teste de termorresistência

Diluente	Vigor no sêmen diluído	Vigor espermático (horas)			
		0	1	2	3
Saanen					
Controle (Bioxcell®)	3,9 ± 0,4a*	3,6 ± 0,4a	3,5 ± 0,4a	3,2 ± 0,3a	2,9 ± 0,7a
Bioxcell® + 0,25% de própolis	3,9 ± 0,4a*	2,4 ± 0,9bc	2,3 ± 0,8bc	0,9 ± 0,9bc	0,4 ± 0,7bc
Bioxcell® + 0,5% de própolis	3,8 ± 0,4a*	1,4 ± 1,2bce	0,7 ± 0,9bce	0,1 ± 0,2bce	0bcd
Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico	4,2 ± 0,4a*	3,5 ± 0,4adfg	3,4 ± 0,5adfg	2,7 ± 0,9adfg	1,7 ± 1,1acef
Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico	4,0 ± 0,5a*	3,5 ± 0,3adfg	3,1 ± 0,4acfg	2,5 ± 1,0adfg	1,4 ± 1,1bcef
Alpina					
Controle (Bioxcell®)	3,6 ± 0,3b*	3,4 ± 0,2a	3,3 ± 0,3a	3,3 ± 0,3a	2,9 ± 0,4a
Bioxcell® + 0,25% de própolis	3,8 ± 0,3ab*	2,6 ± 0,7ac	1,5 ± 1,1bc	0,8 ± 0,8bc	0,1 ± 0,3bc
Bioxcell® + 0,5% de própolis	3,8 ± 0,2ab*	1,4 ± 1,4bcd	0,5 ± 0,8bce	0,1 ± 0,3bce	0bce
Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico	4,1 ± 0,4ab*	3,5 ± 0,4acef	3,3 ± 0,4adfg	3,0 ± 0,5adfg	2,1 ± 1,0adfg
Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico	4,0 ± 0,3a*	3,5 ± 0,5acef	3,3 ± 0,4adfg	2,8 ± 0,5adfg	1,9 ± 1,0acfg

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5%.

descongelamento com diluentes contendo a própolis. Em contrapartida, no sêmen diluído (pré-resfriamento) houve manutenção da viabilidade, motilidade espermática progressiva e vigor espermático, sugerindo que a própolis não é tóxica aos espermatozoides de caprinos quando associada ao sêmen fresco. Watson (2000) afirma que o espermatozoide é sensível aos efeitos tóxicos dos crioprotetores e diluidores, o que torna o uso de determinados componentes comumente utilizados para outras células inviáveis para a célula espermática.

A avaliação da morfologia espermática não foi realizada no sêmen descongelado, visto que a maioria dos trabalhos comprova que não há diferença significativa após a criopreservação (Borges, 2003). O processo de peroxidação lipídica induz alterações estruturais e metabólicas aos espermatozoides, resultando em perda irreversível da motilidade espermática e aumento da taxa de liberação de componentes intracelulares (Jones & Mann, 1977). Desse modo, a adição de antioxidantes em meios diluidores, não alteraria os testes complementares e a avaliação morfológica dos espermatozoides.

Os valores médios gerais da motilidade espermática no momento do descongelamento dos diluentes contendo ácido ascórbico e controle estão de acordo com CBRA (1998), sendo partidas consideradas aptas para uso em programa de inseminação artificial. Independentemente dos diluidores e crioprotetores utilizados no processo de criopreservação, os valores médios obtidos para motilidade espermática nos diluentes contendo ácido ascórbico e controle após o descongelamento foram semelhantes ou próximos aos dados registrados por Khalifa & El-Saidy (2005), Bittencourt et al. (2006) e Rovay (2006), que utilizaram o diluente à base de TRIS (hidroxi-metil-amino-metano), gema de ovo e leite desnatado, respectivamente, e superiores aos valores obtidos por Azerêdo et al. (2001), que utilizaram diluentes à base de hidroxi-metil-amino-metano, enquanto Barbosa et al. (1999) obtiveram valores

médios superiores a todos os estudos anteriormente citados utilizando diluente à base de leite desnatado. Contudo, nas concentrações utilizadas neste estudo, o uso da própolis resultou na perda da motilidade espermática pós-descongelamento, com resultados muito baixos ou nulos, demonstrando a inviabilidade da própolis na composição dos meios crioprotetores para a espécie caprina.

Os valores médios gerais observados no teste supravital (0 hora) diferiram ($P < 0,05$) entre os diluentes, no entanto, os diluentes contendo ácido ascórbico e controle foram similares e superiores aos diluentes contendo a própolis. Valores superiores foram observados por Rovay (2006) que registrou 44,2% de células vivas. No teste hiposmótico, as médias gerais diferiram ($P < 0,05$) entre os diluentes, de modo que os diluentes contendo ácido ascórbico e controle foram similares e superiores aos diluentes contendo a própolis. Valores superiores foram observados por Rovay (2006), que registrou 44,1% de células reativas ao teste. O balanço metabólico positivo entre oxidante e antioxidante pode ter evitado a formação de peróxidos causando estresse oxidativo e diminuindo as lesões celulares e a manutenção da motilidade espermática (Ochsendorf, 1999).

As médias gerais do vigor espermático do sêmen diluído (pré-resfriamento) diferiram ($P < 0,05$) entre os diluentes, uma vez que os diluentes controle e com 0,5% de própolis foram diferentes do diluente com 0,05% de ácido ascórbico e iguais aos diluentes com 0,25% de própolis e 0,25% de ácido própolis (Tabela 7). Da mesma forma, houve diferença após o descongelamento; os diluentes contendo ácido ascórbico e controle foram similares e superiores aos diluentes contendo própolis. No final do período de incubação, os diluentes contendo ácido ascórbico e controle apresentaram vigor espermático superior aos preconizados pelo CBRA (1998) e aos observados por Rovay (2006), sendo semelhante apenas às amostras de sêmen criopreservadas em meios diluidores contendo própolis.

Tabela 6 - Motilidade espermática do sêmen diluído (pré-resfriamento) e teste supravital, teste hiposmótico e motilidade espermática pós-descongelamento durante o teste de termorresistência

Diluyente	Motilidade espermática		Motilidade espermática (horas)				Teste supravital em %	Teste hiposmótico em %
	progressiva do sêmen diluído	0	1	2	3			
Controle (Bioxcell®)	83,6 ± 6,2a*	41,8 ± 16,1a	38,4 ± 14,9a	35,4 ± 14,7a	30,6 ± 12,3a	23,5 ± 9,9a	22,9 ± 8,6a	
Bioxcell® + 0,25% de própolis	83,2 ± 6,9a*	10,6 ± 9,1bc	8,3 ± 9,0bc	4,0 ± 5,0bc	1,0 ± 2,0bc	4,6 ± 6,2bc	11,9 ± 5,5bc	
Bioxcell® + 0,5% de própolis	82,6 ± 5,6a*	3,8 ± 4,0bce	2,1 ± 3,5bce	0,4 ± 1,4bce	0bce	2,1 ± 3,4bce	10,8 ± 5,6bce	
Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico	83,6 ± 5,6a*	38,2 ± 14,2adfg	34,4 ± 13,1adfg	29,6 ± 13,9adfg	18,2 ± 12,5adfg	22,8 ± 12,6adfg	25,0 ± 10,5adfg	
Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico	82,6 ± 6,1a*	40,4 ± 16,8adfg	35,0 ± 16,8adfg	30,0 ± 17,3adfg	16,0 ± 14,0adfg	22,0 ± 14,1adfg	23,7 ± 10,4adfg	

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5%.

Tabela 7 - Vigor espermático do sêmen caprino diluído (pré-resfriamento) e após o descongelamento durante o teste de termorresistência

Diluyente	Vigor espermático do sêmen após descongelamento (0 a 5)	Vigor espermático (horas)			
		0	1	2	3
Controle (Bioxcell®)	3,8 ± 0,4b*	3,5 ± 0,3a	3,4 ± 0,3a	3,2 ± 0,3a	2,9 ± 0,6a
Bioxcell® + 0,25% de própolis	3,8 ± 0,4ab*	2,5 ± 0,8bc	2,0 ± 1,0bc	0,8 ± 0,9bc	0,2 ± 0,6bc
Bioxcell® + 0,5% de própolis	3,8 ± 0,8b*	1,4 ± 1,2bce	0,6 ± 0,8bce	0,1 ± 0,2bce	0bce
Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico	4,1 ± 0,4a*	3,5 ± 0,4adfg	3,4 ± 0,5adfg	2,8 ± 0,8adfg	1,8 ± 1,1adfg
Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico	4,0 ± 0,4ab*	3,5 ± 0,4adfg	3,2 ± 0,4adfg	2,6 ± 0,9adfg	1,6 ± 1,1bdfg

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Kruskal-Wallis; * = ANOVA, comparação pelo teste Tukey a 5%.

Contudo, os valores médios para todos os diluentes assemelham-se aos estudos feitos por Azerêdo et al. (2001) e Bittencourt et al. (2006). De maneira geral, a própolis também foi ineficaz em manter a intensidade dos movimentos espermáticos.

Os valores obtidos no teste supravital apresentaram correlação alta e positiva com a motilidade espermática, em todos os diluentes (Tabela 8), e correlação alta e positiva ($r = 0,63$; $r = 0,64$; $r = 0,71$; respectivamente) entre os valores registrados nos testes supravital e hiposmótico nos diluentes contendo ácido ascórbico e controle. Os valores observados no teste hiposmótico e a motilidade espermática apresentaram correlação alta e positiva com o diluente controle ($r = 0,78$) e aquele contendo 0,25% de ácido ascórbico ($r = 0,65$), e correlação média e positiva com o diluente contendo 0,05% de ácido ascórbico ($r = 0,44$).

Apesar dos valores de correlações os entre os valores médios registrados nos testes supravital e hiposmótico com a motilidade espermática, o parâmetro motilidade espermática parece não ser isoladamente eficaz em prever a viabilidade espermática de sêmen congelado para uso em programa de inseminação artificial, sendo necessário uso de testes complementares para aumentar a acurácia em prever a fertilidade do sêmen e suas relações com a taxa de não-retorno ao estro. Neste estudo, os valores médios obtidos nos testes complementares foram inferiores aos da motilidade espermática e indicam menor concentração de espermatozoides viáveis e com potencial fecundante presentes em uma dose empregada na inseminação artificial.

Tanto no momento do descongelamento (0 hora) quanto ao final do teste de termorresistência (3 horas), o teste supravital e a motilidade espermática não apresen-

Tabela 8 - Correlações Simples de Pearson entre as médias gerais nos testes supravital e hiposmótico, motilidade e vigor espermático do sêmen caprino descongelado

	Motilidade	Vigor	Teste supravital	Teste hiposmótico
Controle (Bioxcell®)				
Motilidade	1	0,55	0,71	0,78
Vigor		1	NS	NS
Teste supravital			1	0,63
Teste hiposmótico				1
Bioxcell® + 0,25% de própolis				
Motilidade	1	0,58	0,81	NS
Vigor		1	NS	NS
Teste supravital			1	NS
Teste hiposmótico				1
Bioxcell® + 0,5% de própolis				
Motilidade	1	0,65	0,66	NS
Vigor		1	0,46	NS
Teste supravital			1	0,42
Teste hiposmótico				1
Bioxcell® + 0,05% de ácido ascórbico				
Motilidade	1	0,60	0,74	0,44
Vigor		1	0,37	0,40
Teste supravital			1	0,64
Teste hiposmótico				1
Bioxcell® + 0,25% de ácido ascórbico				
Motilidade	1	0,54	0,71	0,65
Vigor		1	0,37	0,55
Teste supravital			1	0,71
Teste hiposmótico				1

NS = não-significativo a $P > 0,05$.

taram correlação com as motilidades espermáticas dos diluentes deste estudo. Entretanto, no momento do descongelamento (0 hora), os valores médios observados no teste hiposmótico do sêmen fresco apresentaram correlação média e positiva com a motilidade espermática dos diluentes controle e com 0,25% de própolis e correlação alta e positiva com a motilidade espermática do diluente contendo 0,25 % de ácido ascórbico. Da mesma forma, às 3 horas de teste de termorresistência, verificou-se correlação média e positiva com a motilidade espermática dos diluentes contendo ácido ascórbico e controle.

Por meio destes valores, pode-se inferir que o teste hiposmótico do sêmen fresco é uma ferramenta excelente e confiável (42% de probabilidade de acerto) na predição da sua congelabilidade e manutenção da viabilidade de determinada amostra de sêmen após o teste de termorresistência.

Conclusões

O ácido ascórbico mantém a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides durante o processo de criopreservação e sua viabilidade após o teste de termorresistência, portanto, pode ser uma alternativa na composição de diluentes para criopreservação de sêmen caprino. A própolis não mantém a integridade e viabilidade espermática do sêmen após o descongelamento e é tóxica aos espermatozoides nas concentrações de 0,25 e 0,5%. O teste hiposmótico realizado no sêmen fresco é eficaz em prever a congelabilidade da amostra de sêmen e sua viabilidade ao final do teste de termorresistência de 3 horas.

Literatura Citada

- AZERÊDO, G.A.; ESPER, C.R.; RESENDE, K.T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v.41, p.257- 263, 2001.
- BARBOSA, L.P.; GUIMARÃES, J.D.; ESPESCHIT, C.J.B. et al. Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial em cabras Alpinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.283-285, 1999.
- BISPO, C.A.S. **Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado a 5°C em função de curvas de resfriamento e diluidores**. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.
- BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R.; ALVES, S.G.G. et al. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.1, p.27-37, 2006.
- BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R.; SANTOS, A.D.F. et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciências Animal Brasileira**, v.6, n.3, p.213-218, 2005.

- BLOMM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinariaer Medicin**, v.25, p.383-392, 1973.
- BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. 2003. 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.
- BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v.47, p. 69-74, 1995.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E. et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction**, v.5, n.5, p.393-398, 1999.
- DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA F.O. Efeito de diluente e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.460-462, 2001.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILL, V.V. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.139-144, 2005.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23, 2002.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M. et al. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.599-607, 2005.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v.76, p.84-97, 1957.
- JONES, R.; MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, n.2, p.255-260, 1977.
- KHALIFA, T.A.A.; EL-SAIDY, B.E. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. **Animal Reproduction Science**, v.93, n.3-4, p.303-315, 2005.
- MARTINS, L.F.; PEREIRA, M.C.B.; GUIMARAES, J.D. et al. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1653-1659, 2006.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1-4, p.55-65, 1996.
- MAYER, D.T.; SQUIERS, C.D.; BOGART, R. et al. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. **Journal of Animal Science**, v.10, p.206-235, 1951.
- NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.
- OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction**, v.5, n.5, p.399-420, 1999.
- OLIVEIRA, R.R.; GUIMARÃES, J.D.; CHAVES, K.A. et al. Efeito da adição de própolis ao meio diluidor e suas influências nas características físicas do sêmen equino resfriado a 5°C. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18., 2007, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. (CD-ROM).
- PALHÃO, M.P. **Avaliação do sêmen caprino diluído em citrato-gema, resfriado e armazenado a 5°C por 24 horas**. 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

- PEREIRA, S.A.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n.2, 2002.
- REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.77-86, 1994.
- ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempo de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 56f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- RUSSO, N.T.; TRONCOSO, N.; SANCHEZ, F. et al. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo-alfa-pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, v.78, p.1401-1406, 2006.
- SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F. et al. 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.
- SFORCIN, J.M.; NOVELLI, E.L.B.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of brazilian propolis on seric biochemical variables. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, n.2, p.244-254, 2002.
- SMITH, J.F.; MURRY, G.R. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.57, p.246-250, 1997.
- SWANSON, E.W.; BEARDEN, H.J. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.10, p.981-987, 1951.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007, 142p.
- VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H. et al. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3827-3835, 1991.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.
- ZALATA, A.A.; DEPUYDT, C.E. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.21, p.154-162, 1998.