

## Adição de sucos de laranja, abacaxi e beterraba em diluidor para criopreservação de sêmen de carneiros

Addition of orange, pineapple and beet juices as extenders for cryopreservation of ram semen

Alexandre da Rocha Bozzi<sup>1</sup> , Luiz Henrique Particelli<sup>1</sup> , Carlos Henrique Cabral Viana<sup>2</sup> , Célia Raquel Quirino<sup>3</sup> , André Furugen Cesar de Andrade<sup>4</sup> , Flávia Vieira de Freitas<sup>4</sup> , Marina da Silva Passarelli<sup>4</sup> , Eneiva Carla de Carvalho Celeghini<sup>4</sup> , Héctor Javier Narvaez Bedoya<sup>5</sup> , Alfonso Juventino Chay-Canul<sup>6</sup> , Ricardo Lopes Dias da Costa<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Instituto de Zootecnia (IZ/APTA/SAA), Nova Odessa, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil.

<sup>5</sup>Universidad de Santander (UNDES), Bucaramanga, Santander, Colômbia.

<sup>6</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

\*Autor correspondente: [rldcosta@sp.gov.br](mailto:rldcosta@sp.gov.br)

### Resumo

Em busca de melhorias na criopreservação do sêmen, substâncias naturais são comumente estudadas com o objetivo de melhorar a qualidade do sêmen. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de sucos de laranja, abacaxi e beterraba em diferentes concentrações e combinações ao diluidor de criopreservação de sêmen ovino. Foram utilizados cinco ejaculados de cinco carneiros adultos. O pool de sêmen foi diluído em diluente à base de gema de ovo e misturado com os seguintes 15 tratamentos (na concentração final de 400x10<sup>6</sup> spz/ml): laranja 10% (O10) e 15% (O15); abacaxi 10% (P10) e 15% (P15); beterraba 10% (B10) e 15% (B15); abacaxi + laranja 10% (PO10) e 15% (PO15); abacaxi + beterraba 10% (PB10) e 15% (PB15); beterraba + laranja 10% (BO10) e 15% (BO15); abacaxi + beterraba + laranja 10% (PBO10) e 15% (PBO15); e o grupo controle (CON). Pós-descongelamento em palhetas de 0,25 ml a análise da qualidade do sêmen criopreservado foi realizada pelo CASA e citometria de fluxo. A análise de variância foi realizada e as médias comparadas pelo teste SNK. O teste de correlação de Pearson também foi realizado. Nenhum efeito foi observado na adição de sucos ao diluidor de sêmen antes da criopreservação. Após o descongelamento, embora estatisticamente semelhante ao grupo controle, a motilidade total do grupo B10 atingiu padrões aceitáveis de motilidade total. Além disso, o grupo B10 apresentou os maiores valores (p<0,05) de motilidade progressiva que o grupo controle ou os outros tratamentos. A adição de 10% de suco de beterraba ao diluente de sêmen ovino pode melhorar a criopreservação da motilidade espermática.

**Palavras-chaves:** antioxidante; congelamento; sêmen; diluidor de sêmen

### Abstract

Searching for improvements in semen cryopreservation, natural substances are commonly studied focusing to improve the sperm quality. The aim of this study were evaluated the effect of adding orange, pineapple, and beet juices in different concentrations and combinations to the ram semen cryopreservation extender. Five ejaculates from five adult rams were used. The semen pool was diluted in egg yolk-based extender and mixed with the following 15 treatments (at a final concentration of 400.10<sup>6</sup> spz/mL): orange 10% (O10) and 15% (O15); pineapple 10% (P10) and 15% (P15); beet 10% (B10) and 15% (B15); pineapple + orange 10% (PO10) and 15% (PO15); pineapple + beet 10% (PB10) and 15% (PB15); beet + orange 10% (BO10) and 15% (BO15); pineapple + beet + orange 10% (PBO10) and 15% (PBO15); and the control group (CON). Post-thaw in 0.25 mL straws semen quality analysis of cryopreserved semen was performed by CASA and flow cytometry. Analysis of variance (PROC GLM) was carried out and the averages were compared using the SNK test. Pearson's correlation test was also performed. No effect was noted in the addition of juices to the semen extender prior to cryopreservation. Post-thawed, although, statistically similar to the control group, the total motility of the B10 group reached acceptable standards of total motility. In addition, B10 group showed the highest values (p<0.05) of progressive motility than control group or other treatments. The addition of 10% beet juice to the ram semen extender can improve the cryopreservation of sperm motility.

**Keywords:** antioxidant; freezing; sperm; semen extender.

Recebido: 3 de Agosto de 2022. Aceito: 10 de novembro de 2022. Publicado: 19 de dezembro de 2022



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

## 1. Introdução

O sêmen congelado na inseminação artificial permite a otimização dos reprodutores nas propriedades e melhor seleção genética do rebanho. Além disso, o uso desta biotécnica diminui os gastos com transporte e aquisição de reprodutores. No entanto, os processos de congelamento e descongelamento são prejudiciais às células espermáticas e afetam diretamente sua capacidade de fertilizar. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a criopreservação devido a mudanças de temperatura causa danos às membranas das células espermáticas<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>. Os espermatozoides de mamíferos são propensos a danos por EROs devido à maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana citoplasmática<sup>(5)</sup>. Além dessa predisposição estrutural, a falta de enzimas citoplasmáticas com função antioxidante em quantidade necessária para a neutralização do excesso de EROs, piora a resistência espermática e pode induzir à diminuição da motilidade espermática e até a morte<sup>(5)</sup>. Em quantidades fisiológicas, as EROs atuam na aquisição da capacitação espermática, atuando na motilidade e hiperativação espermática, reação acrossomal e fusão com o óocito<sup>(6)</sup>.

Atualmente, extratos de substâncias antioxidantes naturais de plantas, como compostos fenólicos que incluem flavonóides, ácidos fenólicos e tocoferóis, estão sendo utilizados no processamento de alimentos e na medicina terapêutica preventiva<sup>(7)</sup>. Estudos têm demonstrado um efeito significativo na melhoria da preservação espermática com a adição de extratos naturais de plantas no diluente de sêmen de várias espécies animais<sup>(8)</sup>. Frutas e beterrabas também são ricas em açúcares usados para a respiração celular e podem fornecer equilíbrio osmótico e crioproteção aos espermatozoides<sup>(9)</sup>. Sucos de frutas como laranja, toranja, maçã, abacaxi e sucos de vegetais possuem altos teores de vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos que estão fortemente correlacionados com efeitos antioxidantes<sup>(10; 11)</sup>. De acordo com Vinson et al. (1998)<sup>(12)</sup> a beterraba apresentou maior concentração de compostos fenólicos em 23 vegetais comumente consumidos nos Estados Unidos. Em estudos com polpa de beterraba, Mohdaly et al. (2010)<sup>(13)</sup> encontraram altas concentrações de compostos fenólicos nas análises realizadas e a beterraba mostrou ser uma boa fonte natural de antioxidantes, sendo um excelente estabilizante principalmente para a indústria alimentícia.

O objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos da adição de diferentes concentrações e combinações de sucos de laranja, abacaxi e beterraba, em diluidor de sêmen ovino, na cinética espermática e nas características de membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial após criopreservação.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Local e animais

O estudo foi realizado no Instituto de Zootecnia (IZ/APTA/SAA) na cidade de Nova Odessa, São Paulo, Brasil. A cidade está localizada a 22°42' de latitude sul e 47°18' de longitude oeste. O clima é seco no inverno e quente e chuvoso no verão, com precipitação média anual em torno de 1.270 mm. O experimento foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Zootecnia, sendo aprovado e recebendo o parecer CEUA/IZ – no. 187.

Foram utilizados cinco carneiros machos adultos (entre 2 e 4 anos) de diferentes raças, sendo quatro Santa Inês e um Friesian Oriental. Os animais permaneceram em baias e consumiram dieta à base de silagem de milho mais concentrado de nutrientes diariamente, seguindo as recomendações do NRC, duas vezes ao dia, com água de boa qualidade disponível durante o período experimental<sup>(14)</sup>.

### 2.2. Preparação dos sucos de frutas e beterraba

Os sucos de frutas e beterraba foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por Adeyemo et al. (2007)<sup>(15)</sup> e Daramola et al. (2016)<sup>(16)</sup> utilizando abacaxi (*Ananas comosus* L. var. Pearl), laranja doce (*Citrus sinensis* L.) e beterraba (*Beta vulgaris* L.). Os sucos foram utilizados individualmente e em diferentes combinações.

As laranjas, abacaxis e beterrabas foram previamente lavados em água destilada e depois descascados. As sementes das laranjas foram removidas. Todos foram cortados separadamente em cubos com 1 cm de lado e homogeneizados por cinco minutos, a fim de facilitar a extração do suco. As peças homogeneizadas foram transferidas para um filtro de malha de nylon e depois espremidas manualmente e acondicionadas em tubo plástico graduado.

Em seguida, 5 mL de cada suco, puro e suas combinações (laranja e abacaxi, laranja e beterraba, abacaxi e beterraba; e laranja, abacaxi e beterraba), foram centrifugados separadamente a 3000xg por 20 minutos. O pH do sobrenadante de cada suco foi medido, encontrando-se valores de 4,54, 4,1, 6,25, 4,2, 4,8, 4,8 e 4,6 para laranja, abacaxi, beterraba, laranja e abacaxi, laranja e beterraba, abacaxi e beterraba, e laranja, abacaxi e beterraba, respectivamente. Neste experimento o pH dos sucos não foi neutralizado antes da adição no diluente de sêmen para avaliar seu potencial natural como aditivo.

### 2.3. Coleta de sêmen e adição dos sucos

Cinco ejaculados foram coletados de cinco carneiros em dias alternados por 10 dias usando uma vagina artificial a uma temperatura de aproximadamente 38°C. Para estimular a ejaculação, foi utilizado um

manequir de ovelha sincronizado em estro dentro de um tronco de contenção.

No dia da coleta de sêmen, um ejaculado de cada carneiro ( $n = 5$ ) foi avaliado quanto à motilidade total, motilidade progressiva e motilidade de massa imediatamente após a coleta. Em seguida, o sêmen foi diluído em duas partes do diluente BotuBov® para cada parte do ejaculado (1:2) e armazenado em tubo graduado em banho-maria a 37°C, até que todos os carneiros fossem submetidos ao mesmo procedimento.

Os carneiros foram selecionados aleatoriamente em cada dia de coleta (lote), e para minimizar as diferenças entre os carneiros, raças e horários de coleta, foi formado um pool dos cinco ejaculados em um único tubo graduado, onde a concentração foi corrigida para  $800 \times 10^6$  spz/mL com a adição de mais extensor BotuBov®.

Em seguida, o pool foi separado em 15 alíquotas de 1 mL cada e armazenada em tubos de ensaio previamente preenchidos com 1 mL de diluente BotuBov® a 37°C, resultando em 2 mL por tubo de ensaio (tratamento) e concentração final de  $400 \times 10^6$  spz/mL.

As amostras foram separadas em 15 tratamentos de acordo com os sucos e concentrações utilizadas: laranja a 10% (O10) e 15% (O15); abacaxi a 10% (P10) e 15% (P15); beterraba a 10% (B10) e 15% (B15); abacaxi + laranja a 10% (PO10) e 15% (PO15); abacaxi + beterraba a 10% (PB10) e 15% (PB15); beterraba + laranja a 10% (BO10) e 15% (BO15); abacaxi + beterraba + laranja a 10% (PBO10) e 15% (PBO15); e o grupo controle (CON). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e avaliadas quanto à motilidade total e progressiva, e vigor espermático antes da criopreservação.

## 2.4. Criopreservação de sêmen

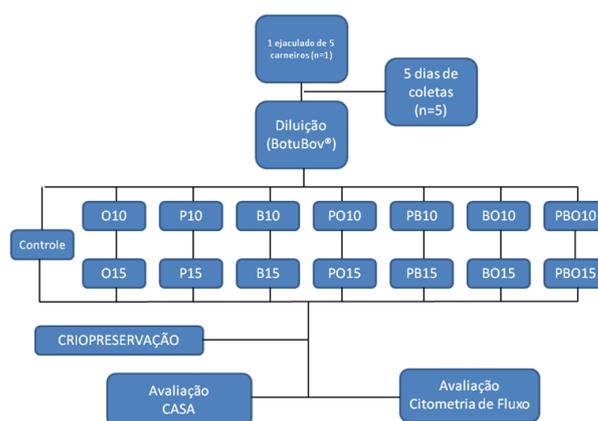
Após as amostras serem diluídas em solução de BotuBov® e os sucos, e em seguida avaliadas para cada um dos respectivos tratamentos, foram acondicionadas em palhetas de 0,25 mL e submetidas à criopreservação. Oito palhetas de cada tratamento foram resfriadas de 32°C a 5°C a uma taxa de resfriamento de 0,25°C/min e estabilizadas por 25 minutos. Posteriormente, as palhetas foram submetidas ao congelamento em vapor de nitrogênio por 20 minutos até -120°C e foram submersas em nitrogênio líquido a -196°C seguido de armazenamento em cilindros.

## 2.5. Análises pós criopreservação

Duas palhetas de cada tratamento e de mesma partida foram descongeladas (37°C/30 segundos), homogeneizadas em microtubo e avaliadas quanto à motilidade espermática, membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial, peroxidação lipídica e estresse oxidativo.

Para avaliar a motilidade espermática foi utilizada uma análise de esperma assistida por computador (CASA). Esta análise foi realizada utilizando o software analisador de classes de espermatozoides (SCA - Microoptics Barcelona, Espanha), com ajuste prévio de setup para sêmen ovino. A amostra de sêmen diluído foi depositada em uma câmara Makler™, e a imagem foi obtida por meio de uma câmera acoplada ao microscópio equipada com contraste de fase (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i). As seguintes características foram analisadas: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de percurso (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência cruzada de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Para avaliar a integridade da membrana plasmática e do potencial acrossômico e de membrana mitocondrial, as sondas fluorescentes utilizadas foram: iodeto de propídio (PI), aglutinina *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e 5,5',6,6'-tetracloro-1,1, iodeto de 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), respectivamente (adaptado Pavaneli et al., 2020)<sup>(17)</sup>. Para a análise da peroxidação lipídica foram utilizados 4,4-Difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno ácido-3-undecanoico (C11-BODIPY581 / 591)<sup>(18)</sup> e dihidroetídio (DHE)<sup>(19)</sup>. Essas análises foram realizadas usando uma citometria de fluxo (BD Accuri™ C6). O esquema experimental do estudo é mostrado na Figura 1.



**Figura 1.** Desenho experimental do estudo. No qual: O10 = 10% laranja; O15 = 15% laranja; P10 = 10% abacaxi; P15 = 15% abacaxi; B10 = 10% beterraba; B15 = 15% beterraba; PO10 = 10% abacaxi + laranja; PO15 = 15% abacaxi + laranja; PB10 = 10% abacaxi + beterraba; PB15 = 15% abacaxi + beterraba; BO10 = 10% beterraba + laranja; BO15 = 15% beterraba + laranja e PBO10 = 10% abacaxi + beterraba + laranja; PBO15 = 15% abacaxi + beterraba + laranja.

## 2.6. Análise estatística

Durante o experimento, todos os dados foram registrados e tabulados para posterior análise estatística usando o software Statistical Analysis System (SAS 9.4). Foi realizada análise de variância (PROC GLM) dos tratamentos e seu respectivo lote, bem como dos parâmetros do respectivo lote. As médias foram comparadas pelo teste SNK a 5% de probabilidade. O teste de correlação de Pearson também foi realizado entre os parâmetros observados durante o experimento. Interações simples entre efeitos foram testadas, mas não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) e foram excluídas do modelo final de análise dos dados.

## 3. Resultados

A análise cinética subjetiva pré-congelamento do sêmen já dividido nos respectivos tratamentos foi semelhante ( $p > 0,05$ ) devido aos parâmetros observados (tabela 1). Não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os parâmetros avaliados e os diferentes lotes realizados.

**Tabela 1.** Médias e desvio padrão de motilidade total (MT%) e progressiva (MP%) e turbilhonamento (MM, 1-5) do pool de sêmen de carneiro (n=5) antes da criopreservação.

Tratamentos	MT	MP	MM
Controle	80,0 ± 0,0	66,0 ± 5,5	3,8 ± 0,4
O10%	72,0 ± 4,5	60,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
O15%	78,0 ± 4,5	64,0 ± 5,5	4,0 ± 0,0
P10%	76,0 ± 5,5	64,0 ± 8,9	4,0 ± 0,0
P15%	76,0 ± 5,5	66,0 ± 5,5	4,0 ± 0,0
B10%	78,0 ± 4,5	68,0 ± 4,5	4,0 ± 0,0
B15%	78,0 ± 4,5	66,0 ± 5,5	4,0 ± 0,0
PO10%	78,0 ± 4,5	68,0 ± 4,5	4,0 ± 0,0
PO15%	76,0 ± 5,5	62,0 ± 4,5	4,0 ± 0,0
PB10%	78,0 ± 4,5	66,0 ± 5,5	4,0 ± 0,0
PB15%	80,0 ± 0,0	68,0 ± 4,5	4,0 ± 0,0
BO10%	78,0 ± 4,5	64,0 ± 8,9	4,0 ± 0,0
BO15%	74,0 ± 8,9	60,0 ± 7,1	4,0 ± 0,0
PBO10%	78,0 ± 4,5	66,0 ± 5,5	4,0 ± 0,0
PBO15%	76,0 ± 5,5	62,0 ± 4,5	4,0 ± 0,0

No qual: O10 = 10% laranja; O15 = 15% laranja; P10 = 10% abacaxi; P15 = 15% abacaxi; B10 = 10% beterraba; B15 = 15% beterraba; PO10 = 10% abacaxi + laranja; PO15 = 15% abacaxi + laranja; PB10 = 10% abacaxi + beterraba; PB15 = 15% abacaxi + beterraba; BO10 = 10% beterraba + laranja; BO15 = 15% beterraba + laranja and PBO10 = 10% abacaxi + beterraba + laranja; PBO15 = 15% abacaxi + beterraba + laranja.

Foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e motilidade

total e progressiva na análise da criopreservação do sêmen. O tratamento B - 10% apresentou maior porcentagem de motilidade progressiva, diferindo dos demais tratamentos e do grupo controle, mas foi semelhante ao grupo controle, B - 15% e B + O - 10% para motilidade total (tabela 2). Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre a motilidade média geral e as coletas de sêmen.

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão da motilidade total (MT%) e progressiva (MP%) após a criopreservação avaliados pelo CASA.

Tratamentos	MT	MP
Controle	23,2 ± 6,1 <sup>ab</sup>	7,6 ± 3,6 <sup>b</sup>
O10%	13,4 ± 4,8 <sup>bc</sup>	3,2 ± 1,2 <sup>b</sup>
O15%	10,3 ± 1,8 <sup>c</sup>	1,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
P10%	10,3 ± 3,2 <sup>c</sup>	3,1 ± 2,3 <sup>b</sup>
P15%	6,8 ± 3,2 <sup>c</sup>	1,6 ± 1,1 <sup>b</sup>
B10%	31,5 ± 11,4 <sup>a</sup>	12,7 ± 8,1 <sup>a</sup>
B15%	22,4 ± 9,5 <sup>ab</sup>	8,6 ± 5,6 <sup>b</sup>
PO10%	13,4 ± 5,3 <sup>bc</sup>	2,7 ± 1,4 <sup>b</sup>
PO15%	8,4 ± 2,8 <sup>c</sup>	1,8 ± 1,0 <sup>b</sup>
PB10%	13,8 ± 5,1 <sup>bc</sup>	3,2 ± 1,4 <sup>b</sup>
PB15%	12,2 ± 3,7 <sup>bc</sup>	4,1 ± 1,9 <sup>b</sup>
BO10%	22,2 ± 8,1 <sup>ab</sup>	6,6 ± 3,3 <sup>b</sup>
BO15%	13,4 ± 4,6 <sup>bc</sup>	3,7 ± 1,9 <sup>b</sup>
PBO10%	18,0 ± 6,3 <sup>bc</sup>	7,1 ± 3,1 <sup>b</sup>
PBO15%	17,7 ± 4,7 <sup>bc</sup>	5,9 ± 3,2 <sup>b</sup>

No qual: O10 = 10% laranja; O15 = 15% laranja; P10 = 10% abacaxi; P15 = 15% abacaxi; B10 = 10% beterraba; B15 = 15% beterraba; PO10 = 10% abacaxi + laranja; PO15 = 15% abacaxi + laranja; PB10 = 10% abacaxi + beterraba; PB15 = 15% abacaxi + beterraba; BO10 = 10% beterraba + laranja; BO15 = 15% beterraba + laranja and PBO10 = 10% abacaxi + beterraba + laranja; PBO15 = 15% abacaxi + beterraba + laranja.

Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) nas análises realizadas pelo CASA para velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média de percurso (VAP), linearidade (LIN), retidão (STR), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) entre os tratamentos, bem como entre as médias gerais e colheitas de sêmen.

Nas análises de citometria de fluxo não houve diferença entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) para a peroxidação lipídica medida com a sonda C11-BODIPY581/591, bem como para o estresse oxidativo a partir da detecção de ânions superóxido medido pela sonda DHE (tabela 3).

Não houve diferença entre os tratamentos para baixo e alto potencial de membrana mitocondrial medido pela sonda JC-1 (tabela 4).

**Tabela 3.** Médias e desvio padrão da peroxidação lipídica da membrana plasmática (MDHE) e do estresse oxidativo através da mensuração do ânion superóxido (MBP) avaliados por citometria de fluxo.

Tratamentos	MBP	MDHE
Controle	1406,6 ± 505,3 <sup>b</sup>	2691,6 ± 752,9
O10%	2030,4 ± 448,3 <sup>ab</sup>	2365,0 ± 821,2
O15%	3239,2 ± 2882,6 <sup>ab</sup>	2240,4 ± 554,6
P10%	2663,4 ± 1429,0 <sup>ab</sup>	2916,4 ± 883,4
P15%	2980,1 ± 1429,5 <sup>ab</sup>	3390,8 ± 1027,6
B10%	3065,8 ± 469,7 <sup>ab</sup>	3723,0 ± 1943,3
B15%	3457,1 ± 459,2 <sup>ab</sup>	2786,9 ± 1401,9
PO10%	2414,9 ± 643,7 <sup>ab</sup>	3230,0 ± 752,8
PO15%	3919,3 ± 2618,6 <sup>a</sup>	2821,3 ± 1385,6
PB10%	3000,5 ± 1139,0 <sup>ab</sup>	2853,8 ± 683,3
PB15%	3491,4 ± 1631,9 <sup>ab</sup>	2064,3 ± 1432,4
BO10%	2579,3 ± 388,3 <sup>ab</sup>	2443,10 ± 874,9
BO15%	2694,0 ± 481,4 <sup>ab</sup>	3099,1 ± 2099,4
PBO10%	3591,4 ± 877,5 <sup>ab</sup>	2870,8 ± 1420,9
PBO15%	3901,4 ± 1535,4 <sup>a</sup>	2500,4 ± 1170,7

No qual: O10 = 10% laranja; O15 = 15% laranja; P10 = 10% abacaxi; P15 = 15% abacaxi; B10 = 10% beterraba; B15 = 15% beterraba; PO10 = 10% abacaxi + laranja; PO15 = 15% abacaxi + laranja; PB10 = 10% abacaxi + beterraba; PB15 = 15% abacaxi + beterraba; BO10 = 10% beterraba + laranja; BO15 = 15% beterraba + laranja and PBO10 = 10% abacaxi + beterraba + laranja; PBO15 = 15% abacaxi + beterraba + laranja.

**Tabela 4.** Médias e desvio padrão do baixo potencial de membrana mitocondrial (LP%) e alto potencial de membrana mitocondrial (HP%) avaliados pela sonda JC-1 em citometria de fluxo.

Tratamentos	LP	HP
Controle	27,31 ± 19,36	9,23 ± 1,34 <sup>bc</sup>
O10%	31,72 ± 29,23	9,81 ± 2,89 <sup>bc</sup>
O15%	24,83 ± 20,90	6,77 ± 0,93 <sup>c</sup>
P10%	21,62 ± 10,55	14,73 ± 6,19 <sup>abc</sup>
P15%	28,69 ± 21,68	10,73 ± 6,80 <sup>bc</sup>
B10%	43,43 ± 21,68	7,38 ± 2,24 <sup>c</sup>
B15%	34,95 ± 21,67	6,96 ± 2,21 <sup>c</sup>
PO10%	31,34 ± 24,37	14,74 ± 4,56 <sup>abc</sup>
PO15%	27,28 ± 25,01	11,39 ± 4,29 <sup>bc</sup>
PB10%	19,73 ± 5,05	17,94 ± 9,32 <sup>ab</sup>
PB15%	21,99 ± 14,36	11,48 ± 4,57 <sup>bc</sup>
BO10%	33,67 ± 23,94	9,06 ± 2,29 <sup>bc</sup>
BO15%	33,19 ± 23,88	9,49 ± 2,95 <sup>bc</sup>
PBO10%	21,78 ± 7,25	21,15 ± 9,89 <sup>a</sup>
PBO15%	40,85 ± 23,91	13,82 ± 7,78 <sup>abc</sup>

No qual: O10 = 10% laranja; O15 = 15% laranja; P10 = 10% abacaxi; P15 = 15% abacaxi; B10 = 10% beterraba; B15 = 15% beterraba; PO10 = 10% abacaxi + laranja; PO15 = 15% abacaxi + laranja; PB10 = 10% abacaxi + beterraba; PB15 = 15% abacaxi + beterraba; BO10 = 10% beterraba + laranja; BO15 = 15% beterraba + laranja and PBO10 = 10% abacaxi + beterraba + laranja; PBO15 = 15% abacaxi + beterraba + laranja.

O tratamento com O15 foi inferior ao tratamento com B15 para integridade de membrana e P15 foi inferior a todos os outros tratamentos para integridade de membrana plasmática e acrossomal, medida pelo FITC-PSA (tabela 5).

**Tabela 5.** Médias e desvio padrão da integridade de membrana acrossomal (AI%) e integridade de membrana plasmática (MI%) dos espermatozoides após criopreservação, avaliadas pela sonda FITC-PSA em citometria de fluxo.

Tratamentos	AI	MI
Controle	90,83 ± 4,80	26,82 ± 8,58 <sup>ab</sup>
O10%	90,96 ± 6,80	20,64 ± 7,76 <sup>ab</sup>
O15%	93,07 ± 3,49	12,94 ± 5,64 <sup>b</sup>
P10%	84,16 ± 6,69	24,21 ± 13,14 <sup>ab</sup>
P15%	71,38 ± 8,48 <sup>b</sup>	24,20 ± 13,90 <sup>ab</sup>
B10%	90,70 ± 5,66	33,99 ± 5,56 <sup>ab</sup>
B15%	91,24 ± 5,76	41,30 ± 21,30 <sup>a</sup>
PO10%	88,82 ± 5,60	34,24 ± 18,71 <sup>ab</sup>
PO15%	86,44 ± 5,57	27,34 ± 8,41 <sup>ab</sup>
PB10%	87,47 ± 5,82	30,81 ± 9,40 <sup>ab</sup>
PB15%	89,30 ± 3,65	25,46 ± 14,31 <sup>ab</sup>
BO10%	87,47 ± 9,73	31,01 ± 4,98 <sup>ab</sup>
BO15%	88,98 ± 10,28	26,68 ± 6,58 <sup>ab</sup>
PBO10%	90,43 ± 4,88	36,92 ± 7,40 <sup>ab</sup>
PBO15%	90,97 ± 5,26	28,43 ± 10,24 <sup>ab</sup>

No qual: O10 = 10% laranja; O15 = 15% laranja; P10 = 10% abacaxi; P15 = 15% abacaxi; B10 = 10% beterraba; B15 = 15% beterraba; PO10 = 10% abacaxi + laranja; PO15 = 15% abacaxi + laranja; PB10 = 10% abacaxi + beterraba; PB15 = 15% abacaxi + beterraba; BO10 = 10% beterraba + laranja; BO15 = 15% beterraba + laranja and PBO10 = 10% abacaxi + beterraba + laranja; PBO15 = 15% abacaxi + beterraba + laranja.

#### 4. Discussão

Os meios crioprotetores para armazenamento de esperma têm sido continuamente revisados em seus compostos básicos e aditivos<sup>(20)</sup>. Plantas, frutas e vegetais são conhecidos por terem atividades antioxidantes, androgênicas e anti-infertilidade que podem apresentar efeitos benéficos na reprodução animal<sup>(8)</sup>.

As análises realizadas antes do processo de congelamento mostraram que os sucos adicionados ao sêmen conseguiram manter padrões aceitáveis de parâmetros cinéticos<sup>(21)</sup>, sem causar efeitos tóxicos aos espermatozoides a princípio.

A análise da motilidade total e progressiva após o descongelamento (Tabela II) mostrou uma queda acentuada desses valores após o processo de criopreservação. Segundo Maxwell e Salamon (1993)<sup>(22)</sup>, é esperado um declínio de aproximadamente 20% na porcentagem de espermatozoides férteis em relação ao

sêmen normal. Durante o processo de criopreservação, o sêmen é exposto ao choque frio, ar atmosférico e diferenças osmóticas, causando maior ocorrência de peroxidação lipídica devido à ação das EROs e danos mecânicos às membranas por alterações na osmolaridade e temperatura<sup>(1, 2, 4)</sup>. Assim, após o descongelamento, os espermatozoides tendem a ter menor motilidade e potencial de fertilização como resultado de alterações na integridade da membrana e função celular causadas pela criopreservação<sup>(2, 23, 24)</sup>. Bartoov et al. (1980)<sup>(25)</sup>, relataram que o pH entre 6,0 e 6,5 manteve boas características de motilidade no sêmen ovino. No presente estudo, o suco de beterraba foi o único tratamento que manteve o pH próximo aos resultados obtidos por esses autores, com valores de 6,25, o que pode ser um indicativo de que o pH dos demais tratamentos influenciou negativamente a viabilidade espermática.

Azevedo et al. (2000)<sup>(26)</sup>, estudando diferentes concentrações espermáticas (50, 100 e 200 milhões) em diferentes palhetas (0,25 e 0,50 ml), não encontraram diferenças estatísticas entre motilidade progressiva e concentração espermática. No entanto, houve diminuição da motilidade progressiva quando o enchimento foi realizado em palhetas de 0,25 mL em relação às de 0,50 mL, talvez devido ao menor diâmetro da palheta de 0,25 mL, permitindo maior dano do choque térmico às células durante o processo de criopreservação.

O tratamento B - 10% foi superior aos demais para motilidade progressiva ( $12,7\% \pm 8,1$ ), mostrando que o suco de beterraba foi eficiente em manter os espermatozoides em movimento progressivo em níveis superiores ao grupo controle após a criopreservação. O mesmo tratamento também manteve o percentual de motilidade total acima de 30%, em linha com as características desejáveis para carneiros quanto à dose de sêmen congelado segundo o CBRA (2013)<sup>(21)</sup>. Os açúcares podem promover melhorias no equilíbrio osmótico e na crioproteção das células espermáticas, além de serem utilizados na ocorrência de fosforilação oxidativa<sup>(9, 16)</sup>. Wruss et al. (2015)<sup>(27)</sup>, ao analisarem o suco de sete diferentes variedades de beterraba, encontraram valores entre 60% de betacianinas e 40% de betaxantinas, que representaram de 70 a 100% do total de compostos fenólicos. Além disso, a composição de açúcar encontrada foi semelhante em todas as variedades, com média de 7,7%, sendo 95% sacarose, seguida de glicose e frutose. O estudo realizado por Fukuhara e Nishikawa (1973)<sup>(28)</sup> mostrou um efeito significativo do aumento da energia para manter a motilidade do esperma caprino quando uma variedade de açúcares foi adicionada, mas não houve diferença significativa causada pela sacarose, ao contrário da glicose e frutose, que promoveu melhorias.

Daramola et al. (2016)<sup>(16)</sup>, estudando sucos de pepino, abacaxi e laranja adicionados ao diluente de

sêmen ovino criopreservado, encontraram maiores valores de motilidade progressiva, principalmente quando se utilizaram concentrações de 7,5 e 10%. No presente estudo, os sucos de abacaxi e laranja não obtiveram resultados semelhantes, diferentemente do suco de beterraba, que foi estatisticamente melhor em motilidade progressiva que os demais. Sabe-se que as partes das plantas, como frutos, folhas e raízes, podem variar em seus componentes fitoquímicos<sup>(29)</sup>, mas como afirmam Melo et al. (2008)<sup>(30)</sup>, a concentração também varia de acordo com a cultivar, variedade, estágio de maturação, clima e condições edáficas, sendo improvável que uma planta da mesma espécie tenha composição fitoquímica idêntica a outra planta. Melhorias na motilidade espermática foram observadas em sêmen criopreservado usando extrato de erva-doce em sêmen suíno<sup>(31)</sup>; utilizando extrato de alecrim em sêmen bovino e ovino, respectivamente<sup>(23, 32, 33)</sup>; com a adição de extrato de cravo no sêmen de carneiro<sup>(34)</sup>; uso de água de coco no sêmen suíno<sup>(35)</sup>; uso de suco de romã no sêmen bovino<sup>(36, 37)</sup>; com suco de morango em sêmen bovino e bubalino<sup>(38)</sup>; e com seiva de rãfia, suco de mamão e tomate e água de coco em sêmen bovino refrigerado<sup>(39)</sup>.

Tais achados mostram os possíveis benefícios dos milhares de componentes presentes nas plantas, principalmente no caso de compostos fenólicos que possuem alta capacidade antioxidante devido à capacidade de atuar como doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete, além de alguns atuarem como quelantes metálicos<sup>(8, 40, 41, 42)</sup>.

A sonda C11-BODIPY581/591 consiste em um análogo de ácido graxo sensível à oxidação, que muda sua luminosidade de vermelho para verde em resposta à presença de várias espécies reativas e peroxinitrito<sup>(43)</sup>. A oxidação da sonda de DHE reage especificamente com os ânions superóxido, emitindo fluorescência, mas a detecção de produtos específicos da reação de DHE com ânions superóxido pode ser difícil de medir devido à formação de outros produtos inespecíficos da reação oxidativa com outras moléculas<sup>(44)</sup>. Kasai et al. (2002)<sup>(45)</sup>, utilizando a sonda JC-1 em espermatozoides com diferentes potenciais de membrana mitocondrial, encontraram uma relação significativa entre os parâmetros de motilidade e velocidade com a atividade mitocondrial. Os espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial apresentaram valores mais baixos para os parâmetros de velocidade e motilidade em comparação ao grupo com alto potencial de membrana. Além do estresse osmótico que ocorre durante o processo de criopreservação, a exposição dos espermatozoides a baixas temperaturas altera as características físico-químicas da membrana plasmática, alterando a distribuição de lipídios, a comunicação entre lipídios e proteínas e, conseqüentemente, aumentando a fluidez da membrana plasmática<sup>(45)</sup>. Com

estruturas comprometidas, a membrana perde sua capacidade semipermeável e compromete todo o funcionamento celular, favorecendo a formação e liberação de EROs<sup>(46)</sup>.

## 5. Conclusão

Os tratamentos não influenciaram a quantidade de ânions superóxido, peroxidação lipídica, potencial de membrana mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides. O aumento significativo da motilidade progressiva com o tratamento B10 mostrou que o suco de beterraba promoveu melhorias na motilidade progressiva dos espermatozoides de carneiros submetidos à criopreservação, sem prejudicar outras características espermáticas. Pode-se dizer, assim, que o suco de beterraba adicionado ao diluente BotuBov® promoveu efeito benéfico no sêmen ovino criopreservado, melhorando a motilidade espermática.

### Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses

### Contribuições do autor

*Conceitualização:* A.R.Bozzi, C.H.C.Viana e R.L.D.Costa. *Análise formal:* C.R.Quirino. *Financiamento:* R.L.D.Costa. *Investigação:* L.H.Particelli, A.F.C.Andrade, F.V.Freitas e M.S.Passarelli. *Administração do projeto e Supervisão:* R.L.D.Costa. *Validação:* C.H.C.Viana e E.C.C.Celeghini. *Visualização:* A.R.Bozzi. *Redação (esboço original):* A.R.Bozzi e R.L.D.Costa. *Redação (revisão e edição):* H.J.N.Bedoya; A.J.Chay-Canul e E.C.C.Celeghini.

### Agradecimentos

Este estudo foi financiado, em parte, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

### Referências

- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000; 53:47-58. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Bucak MN, Atessahin A, Yuce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*. 2008. 75:128-134. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.09.002>
- Castelo TS, Frota TR, Silva AR. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasílica*. 2008. 2:67-75. Disponível em: <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.3.885>
- Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 2011.

76:341-350. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.013>

5 Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*. 2004. 16:581-588. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD03089>

6 Savi PAP, Zavarez LB, Kipper BH, Feliciano MAR, Vicente WRR, Oliveira MEF. Uso de antioxidantes em meios diluidores para sêmen ovino: revisão de literatura. *Ars Veterinaria*, 2015. 31(1):12-18. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2015v31n1p12-18>

7 Anwar F, Ali M, Hussain AI, Shahid M. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* MILL.) seeds from Pakistan. *Flavour Fragrance Journal*, 2009. 24:170-176. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ffj.1929>

8 Zhong R, Zhou D. Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. *Journal of Integrative Agriculture*, 2013. 12:1826-1838. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60412-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60412-8)

9 Aboagla EME, Terada T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 2004. 62:1160-1172. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.013>

10 Gardner PT, White TAC, Mcphai DB, Duthie GG. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 2000. 68:471-474. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00225-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00225-3)

11 Cutler GJ, Nettleton JA, Ross JA. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: The Iowa Women's Health Study. *International Journal of Cancer*, 2008. 123:664-671. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.23564>

12 Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1998. 46:3630-3634. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf980295o>

13 Mohdaly AA, Sarhan MA, Smetanska I, Mahmoud A. Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010. 90:218-226. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3796>

14 National Research Council, NRC. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. The National Academies Press, Washington DC, 2007. The Nat. Acad. Press. 2007

15 Adeyemo OK, Adeyemo OA, Oyeyemi MO, Agbede AS. Effect of semen extenders on the motility and viability of stored African Catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa. *Journal of Applied Science and Environmental Management*, 2007. 11:13-16. Disponível em: <https://doi.org/10.4314/jasem.v11i1.46827>

16 Daramola JO, Adekunle EO, Onagbesan OO, Oke OE, Ladokun, AO, Abiona JA, Abioja MO, Oyewusi IK, Oyewusi JA, Isah OA, Sogunle OM., Adeleke MA. Protective effects of fruit-juices on sperm viability of west African dwarf goat bucks during cryopreservation. *Animal Reproduction*, 2016. 13:7-13. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/1984-3143-AR726>

17 Pavaneli APP, Recuero S, Chaves BR, Garcia-Bonavila E, Llavenera M, Pinart E, Bonet S, Andrade AFC, Yest M. The presence of seminal plasma during liquid storage of pig spermatozoa at 17°C modulates ability to elicit in vitro capacitation and trigger acrosomal exocytosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21:4520. Disponível em: <https://doi.org/>

[10.3390/ijms21124520](https://doi.org/10.3390/ijms21124520)

18 Batissaco L, Arruda RP, Alves MBR, Andrade MT, Lemes KM, Prado-Filho RR, Almeida TG, Andrade AFC, Celeghini ECC. Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability. *Reproductive Biology*, 2020. 20:14-24. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.002>

19 Vašíček J, Svoradová A, Baláži A, Jurčík A, Macháč M, Chrenek P. Ram semen quality can be assessed by flow cytometry several hours after post-fixation. *Zygote*, 2021. 29:130-137. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199420000581>

20 Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction*, 2012. 9:809-815. Disponível em: <https://www.animalreproduction.org/article/5b5a6053f7783717068b46cc/pdf/animreprod-9-4-809.pdf>

21 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3, 104.

22 Maxwell WMC, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 1993. 5:613-638. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD9930613>

23 Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh, A, Shakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, 2014. 69:217-222. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.007>

24 Aitken RJ. Pathophysiology of human spermatozoa. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 1994. 6:128-135. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/8193251>

25 Bartoov B, Bar-Sagie D, Mayevsky A. The effect of pH on ram sperm collective motility driven by mitochondrial respiration. *International Journal of Andrology*, 1980. 3:602-612. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1980.tb00148.x>

26 Azevedo HC, Machado R, Simplicio AA, Soares AT. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. *Rev. Científica Rural*, 2000. 5:148-157. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/45681>

27 Wruss J, Waldenberger G, Huermer S, Uygun P, Lanzerstorfer P, Muller U, Hoglinger O, Webhuber J. Compositional characteristics of commercial beterrabaroot products and beterrabaroot juice prepared from seven beterrabaroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015. 42:46-55. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.03.005>

28 Fukuhara R, Nishikawa Y. Effects of various substrates on respiration, glycolysis and motility of goat spermatozoa. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 1973. 44:271-274. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/chikusan1924/44/5/44\\_5\\_271/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/chikusan1924/44/5/44_5_271/pdf)

29 Simón BF, Pérez-Ilzarbe J, Hernández T, Gómez-Cordovés C, Estrella I. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1992. 40:1531-1535. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf00021a012>

30 Melo EA, Maciel MIS, Galvão de Lima VLA, Nascimento RJ. Capacidade antioxidante das frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2008. 44:193-200. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000200005>

31 Malo C, Gil R, Cano N, Gonzales V, Luño V. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidante protection for boar semen cryopreservation. *Andrologia*, 2012. 44:710-715. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01254.x>

32 Daghigh-Kia H, Olfati-Karaji R, Hoseinkhani A, Ashrafi I. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. *Spananish Journal of Agriculture Research*, 2014. 12(1):98-105. Disponível em: <https://doi.org/10.5424/sjar/2014121-4486>

33 Gil L, Mascaró F, Mur P, Gale I, Silva A, González N, Malo C, Cano R. Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as freezing extender on post-thaw sperm motility. 10th Int Cong Spanish Association of Animal Reproduction (AERA), Cáceres (Spain), June 2-5. p: 91. 2010.

34 Baghshahi H, Riasi A, Mmahdavi AH, Shirazi A. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, 2014. 69:482-487. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.009>

35 Silva MA, Peixoto GCX, Lima GL, Bezerra JAB, Campos LB, Paiva ALC, Paula VV, Silva AR. Cryopreservation of colored peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using powdered coconut water (ACO-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*, 2012. 78:605-611. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.006>

36 Perumal P, Rajkhowa C. Effect of addition of pomegranate (*Punica granatum*) juice on the liquid storage (5°C) of mithun (*Bos frontalis*) semen. *Indian Journal of Animal Research*, 2014. 49:470-473. Disponível em: <https://doi.org/10.5958/0976-0555.2015.00091.6>

37 El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS, Ali A. Effect of clarified tris egg yolk extender supplemented with strawberry juice (*Fragaria* spp.) on some characteristics of chilled and frozen cattle semen. *International Journal of ChemTech. Research*, 2016. 9(6):203-207. Disponível em: [https://www.sphinxsai.com/2016/ch\\_vol9\\_no6/1/\(203-207\)V9N6CT.pdf](https://www.sphinxsai.com/2016/ch_vol9_no6/1/(203-207)V9N6CT.pdf)

38 El-Sheshtawy RI, El-Sisy GA, El-Nattat WS. Effect of pomegranate juice in Tris-based extender on cattle semen quality after chilling and cryopreservation. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2016. 5:335-339. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.06.001>

39 Bayemi PH, Banla NR, Leinyuy I, Niba AT, Nsongka VM, Mario G, Shamshuddin M. Use of fruits and raffia palm sap (*Raffia hookeri*) in chilled bull semen extenders in Cameroon. *Agricultural and Biological Science Journal*, 2015. 1:142-149. Disponível em: <http://files.aiscience.org/journal/article/html/70040066.html>

40 Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bio-products Process.*, 2011. 89:217-233. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>

41 Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouma D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 2006. 97:654-660. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>

42 Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 2001. 475:89-111. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00073-2)

43 Drummen GPC, Van Liebergen CM, Den Kamp JAF, Post JA. C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, a oxidation-sensitive fluorescent lipid

peroxidation probe: (micro) spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002. 33(4):473-490. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00848-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00848-1)

44 Nazarewicz RR, Bikineyeva A, Dikalov SI. Rapid and specific measurements of superoxide using fluorescence spectroscopy. *SLAS Discovery*, 2013. 18:498-503. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1087057112468765>

45 Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between

sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian Journal of Andrology*, 2002. 4:97-103. Disponível em: <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682x/4/97.htm?mpclwjsbcesrixsb>

46 Grotter LG, Cattaneo L, Marin PE, Kjelland ME, Ferré B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction Domestic Animal*, 2019. 54:655-665. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.13409>