

## AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO ESPERMÁTICA DE SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO EM DILUIDOR TRIS-GEMA ACRESCIDO DE EXTRATO DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*)

Data de submissão: 26/12/2024

Data de aceite: 02/01/2025

### **Nayonara Silva de Almeida**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Nágylla Silva de Almeida**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Anailson de Oliveira Maciel**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Nívia Maria Rocha Brandão**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Raquel Mesquita Lima**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Thiago Santos Santos**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Jardson Guimarães Teixeira**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Jamilly Alves Loiola**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Tavilla Gabryele Chaves Almeida**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Isabelly Linhares Vieira**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

### **Francisco Cardoso Figueiredo**

Colégio Técnico de Teresina – CTT, Teresina - PI

### **Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco**

Curso de Zootecnia. Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA

**RESUMO:** O uso do extrato de jambolão nos diluidores de sêmen pode não apenas atenuar o estresse oxidativo, mas também garantir a integridade e a funcionalidade do material genético. Desta forma, objetivou-se avaliar a peroxidação celular em sêmen bovino criopreservado em diluidor TRIS-gema suplementado com extrato de jambolão (*Syzygium cumini*). Foram utilizados 24 ejaculados de quatro bovinos, obtidos a partir de eletroejaculação, os quais foram diluídos em Tris-Gema, pré-estabelecendo cinco diferentes concentrações: Controle

(0  $\mu$ M) e extrato de jambolão (1mM, 5mM, 10mM e 20mM), adicionadas ao diluidor Tris-Gema. Posteriormente foram congeladas em sistema automatizado, na curva de congelamento (-0,25°C/min, de 25°C a 5°C e -20°C/min, de 5°C a -120°C), e, após atingirem -120°C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Após descongelação a 37°C as amostras foram analisadas quanto a peroxidação espermática, pelo teste do ácido tiobarbitúrico. Foi utilizado um delineamento experimental em blocos aleatórios com cinco tratamentos: controle, 1, 5, 10 e 20 mMol de extrato de jambolão (*Syzygium cumini*), em seis coletas. As variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste paramétrico Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas usando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2013). Os resultados indicam uma redução significativa na absorvância e na concentração de malondialdeído em todos os tratamentos em comparação ao controle, sugerindo um efeito potencialmente benéfico dos tratamentos sobre a extensão da peroxidação lipídica celular. Os diluidores suplementados com extrato de jambolão (*S. cumini*) em 1, 5, 10 e 20 mMol/mL foram eficazes em reduzir os níveis de estresse oxidativo espermático, conforme evidenciado pela diminuição da absorvância e dos níveis de malondialdeído.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes, malondialdeído, estresse oxidativo

## INTRODUÇÃO

A inclusão de antioxidantes naturais, como o extrato de jambolão (*Syzygium cumini*), pode ser uma alternativa viável aos compostos sintéticos atualmente utilizados. O jambolão é uma planta nativa da Índia, adaptada ao Brasil, cujos compostos, como antocianinas e flavonoides, possuem reconhecidas propriedades antioxidantes. Estes compostos são capazes de neutralizar radicais livres e proteger as células germinativas contra danos oxidativos, potencialmente aumentando a viabilidade dos espermatozoides após a criopreservação. Assim, o uso do extrato de jambolão nos diluidores de sêmen pode não apenas atenuar o estresse oxidativo, mas também garantir a integridade e a funcionalidade do material genético (Silva et al., 2012; Swami et al., 2012; Duarte et al., 2024).

Apesar do conhecimento acerca das propriedades benéficas do jambolão, há um hiato de informações sobre seu efeito específico na criopreservação de sêmen bovino, especialmente no que tange à formação de ROS e à proteção das células espermáticas. A realização de estudos que avaliem a adição do extrato de jambolão ao diluidor de sêmen pode fornecer insights valiosos sobre sua eficácia como antioxidante natural e sua capacidade de melhorar a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides pós-criopreservação (Tonetti 2017; Baldi et al., 2020).

## OBJETIVO

Avaliar a peroxidação celular em sêmen bovino criopreservado em diluidor TRIS-gema suplementado com extrato de jambolão (*Syzygium cumini*).

## MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento descrito no presente artigo encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, sob Processo n. 23115.005617/2022-43.

O jambolão foi colhido em outubro de 2022, no campus da Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências de Chapadinha, localizada no município de Chapadinha, Maranhão (3°44'26"S, 43°21'33"W), considerando-se maduros aqueles que apresentavam coloração completamente roxa escura e textura macia. Após a colheita, na usina escola governador Alberto Silva da Universidade Federal do Piauí, os frutos do jambolão foram lavados em água corrente, despulpados manualmente com o auxílio de uma espátula e adicionado etanol PA, agitou-se a mistura por 30 minutos, em seguida filtrou e foi colocado num rotaevaporador numa temperatura de 55 °C, até a evaporação completa do solvente.

O diluente Tris-gema de ovo composto por 3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido cítrico, 1.488 g de frutose, 25 mg de gentamicina, 50.000 UI de penicilina, 100 mL de água destilada, 20 % de gema de ovo e 5 % de glicerol, com osmolalidade ~350 mOsm e pH 6,8, foi preparado no Laboratório de biotecnologia da Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí, e utilizado para diluir e congelar o sêmen. Foram preparados cinco diluentes experimentais diferentes: (0; 1; 5; 10 e 20 mMol de extrato de jambolão adicionado ao diluente Tris-gema.

Foram utilizados quatro touros da Nelore provenientes da Fazenda Nova (3°44'39.3"S; 43°28'54.3"W), localizada na cidade de Chapadinha, Maranhão, Brasil, com idade média de 5 anos, peso entre 510 e 750 kg e escore de condição corporal de 3 a 4 (escala de 1 a 5). Os touros tinham histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto à saúde geral, integridade dos órgãos reprodutivos e qualidade do sêmen. Durante o experimento, os touros foram mantidos em sistema extensivo, com livre acesso a piquetes de *Panicum maximum*, água e sal mineral.

Amostras de sêmen foram coletadas uma vez por semana durante seis semanas, totalizando 24 ejaculados, via eletroejaculação (Biocon®, Uberaba, Minas Gerais, Brasil) utilizando-se tubo de ensaio graduado estéril de 15 mL, devidamente protegido com folha de papel alumínio para evitar a exposição do sêmen à luz. Os ejaculados foram transportados em caixa isolada a 37 °C, avaliados e processados até congelamento em espaço laboratorial presente na própria fazenda.

As amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho-maria a 37 °C e avaliadas separadamente quanto à cor, aparência, volume, motilidade total e vigor, sob microscópio ótica (Olympus. Ltd., Tóquio, Japão), seguindo recomendações descritas no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de

Reprodução Animal (2013). A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer na diluição 1:200 em solução de citrato de sódio em formaldeído a 4 %. O método de câmara úmida foi utilizado para analisar a morfologia espermática seguindo recomendações descritas no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). Somente ejaculados com motilidade total  $\geq 80$  %; vigor  $\geq 3$ ; concentração espermática  $\geq 3,5 \times 10^9$  espermatozoides/mL e patologias espermáticas  $\leq 20$  % foram utilizadas no estudo. Quando aprovadas, amostras dos seis ejaculados foram misturadas para formar um *pool* para aumentar o volume de sêmen e eliminar a variabilidade entre as amostras estudadas. Logo após a formação do *pool*, este foi dividido em cinco alíquotas, mantidas a 37 °C em banho-maria antes da diluição nos diluentes experimentais.

Cinco alíquotas de sêmen previamente avaliadas e aprovadas foram diluídas em meio de Tris-gema (37 °C) contendo extrato de jambolão (1; 5; 10 e 20 mMol), enquanto uma alíquota sem qualquer suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi colocado em palhetas de 0,25 mL, com concentração final de  $160 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e congelado em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, MG, Brasil). A curva foi programada para realizar a refrigeração do sêmen a 0,25 °C/min até 5 °C, temperatura na qual as palhetas foram mantidas por 4 h. Para o congelamento, foi utilizada curva com velocidade -20 °C/min até chegar à temperatura de -120 °C. Imediatamente após, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, organizadas em racks e armazenadas em cilindro criogênico a -196 °C até descongelamento. As análises pós-criopreservação foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e de Reprodução Animal (CCCh/UFMA), onde as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e avaliadas quanto ao teste do ácido tiobarbitúrico.

A quantificação de malondialdeído (MDA) foi estimada pela medida do nível de MDA, utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no método descrito por Maia (2006). A quantificação de malondialdeído foi medida após a suplementação de 500  $\mu$ L de sêmen pós-criopreservado, mais Tampão Tris-ácido cítrico, pH 7,4, adicionado a 1 mL do reagente TBA (15 % de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico e 0,375 % de ácido tiobarbitúrico) e 1 % (v/v) de BHT 50 mM. A mistura foi tratada em água fervente (100 °C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e centrifugadas 1.200 g por 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25). A concentração de MDA foi determinada pela curva de calibração feita diariamente com malondialdeído como padrão, nas concentrações de 1 a 20  $\mu$ Mol. O MDA produzido foi expresso em nmol de TBARS/mL de diluidor.

Foi utilizado um delineamento experimental em blocos aleatórios com cinco tratamentos: controle, 1, 5, 10 e 20 mMol de extrato de jambolão (*Syzygium cumini*), em seis coletas. As variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste paramétrico Tukey a 5% de probabilidade. As análises

foram realizadas usando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2013).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados de absorvância e de quantificação de malondialdeído (MDA) nos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 1. A absorvância medida variou entre os grupos experimentais, com o grupo controle apresentando a maior absorvância ( $0,198 \pm 0,070$ ), enquanto os grupos tratados apresentaram valores significativamente inferiores (Tabela 1).

A quantificação de MDA também foi analisada, com o controle apresentando a maior concentração média de MDA ( $0,006 \pm 0,003 \mu\text{Mol/mL}$ ). Os grupos tratados mostraram menores quantificação de MDA ( $P < 0,05$ ), variando de  $0,001 \pm 0,001$  a  $0,003 \pm 0,001 \mu\text{Mol/mL}$ .

Os resultados indicam uma redução significativa na absorvância e na concentração de MDA em todos os tratamentos em comparação ao controle, sugerindo um efeito potencialmente benéfico dos tratamentos sobre a extensão da peroxidação lipídica celular.

Tratamentos mMol/mL	Absorvância	MDA ( $\mu\text{Mol/mL}$ )
Controle	$0,198 \pm 0,070^A$	$0,006 \pm 0,003^A$
1	$0,116 \pm 0,038^B$	$0,002 \pm 0,001^B$
5	$0,131 \pm 0,020^B$	$0,003 \pm 0,001^B$
10	$0,090 \pm 0,005^B$	$0,001 \pm 0,001^B$
20	$0,117 \pm 0,007^B$	$0,002 \pm 0,001^B$

T1: Tris-gema acrescido de  $1\mu\text{Mol}$  de jambolão. T2: Tris-gema acrescido de  $5\mu\text{Mol}$  de jambolão. T3: Tris-gema acrescido de  $10\mu\text{Mol}$  de jambolão. T4: Tris-gema acrescido de  $15\mu\text{Mol}$  de jambolão. Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (ANOVA e teste TUKEY,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Média e desvio padrão da absorvância e quantificação de malondialdeído em sêmen bovino criopreservado em diferentes concentrações (0; 1; 5; 10 e 20 mMol/mL) de extrato de jambolão (*S. cumini*).

Nosso estudo demonstrou que os tratamentos com o extrato etanólico da polpa da *S. cumini* reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de malondialdeído, um marcador do dano oxidativo, e a absorvância no sêmen bovino criopreservado.

A composição química de *S. cumini* inclui diversos compostos fitoquímicos, entre os quais se destacam os polifenóis, que apresentam potencial antioxidante e propriedades benéficas para a saúde (Ayyanar et al. 2012; Moreira (2014). Além disso, são hidrossolúveis, produzidos pelo metabolismo secundário da planta, e sua organização química se estabelece por apresentar hidroxilas ligadas a seus anéis aromáticos, que a partir destes lhe é conferido ação antioxidante (Sureda e et al., 2014).

A quantidade de hidroxilas influencia no potencial antioxidante, e quanto maior a presença de hidroxilas, maior será a capacidade antioxidativa dos compostos fenólicos,

uma vez que sua atuação para a redução do radical livre se dá pela doação de um elétron, presente na hidroxila, para o radical livre (Markovic e t al., 2012).

Nesta pesquisa a medição da capacidade antioxidante do extrato da *S. cumini* ocorreu pela quantificação de malondialdeído no meio diluidor de criopreservação espermático. Na reação de TBARS, o MDA presente na amostra reagiu com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido e sob aquecimento, formando um complexo de coloração rosa. Este complexo é um cromóforo, substância que absorve luz visível, o que em determinadas condições, estabelece relação diretamente proporcional com a absorbância. Nos tratamentos com *S. cumini* a doação de um elétron, presente na hidroxila, para o radical livre, acarretou menor dano oxidativo, e menor produção de MDA (Ruan et al., 2008; Santos et al., 2020).

## CONCLUSÃO

Os diluidores suplementados com extrato de jambolão (*S. cumini*) em 1, 5, 10 e 20 mMol/mL foram eficazes em reduzir os níveis de estresse oxidativo espermático, conforme evidenciado pela diminuição da absorbância e dos níveis de malondialdeído.

## REFERÊNCIAS

Ayyanar, M.; badu-subash, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Topical Biomedicine**. Vol. 2. 2012. p. 240-246.

Baldi E, Tamburrino L, Muratori M, Degl'Innocenti S, Marchiani S. Adverse effects of in vitro manipulation of spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. 2020; 220:106314. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106314>

Duarte LSF, Fernandes VB, Vieira IGP, Santos CF, Nascimento NRF. antocianinas a partir do “jamelão” - *Syzygium cumini* (L.)Skeels. **Revista de nutrição e vigilância em saúde**. 2024. v.11:e12547.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal/Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3,ed, - Belo Horizonte: **CBRA** 2013.Disponível em: [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

Markovic, J. M. D.; Markovic, Z. S.; Pasti, I. A.; Brdaric, T. P.; Popovic-Bijelie, A.; Mojovic, M. A joint application of spectroscopic, electrochemical and theoretical approaches in evaluation of the radical scavenging activity of 3-OH flavones and their iron complexes towards different radical species. **Dalton Transactions**. Vol. 41. 2012. p. 7295-7303.

Moreira, L. N. Perfil químico e atividades biológicas dos extratos e frações das folhas e das entrecascas de *Syzygium cumini* (L) Skeels. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais**. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. 2014.

Ruan, Z. P.; Zhang, L. L.; Lin, Y. M. Evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaves. **Molecules**. Vol. 13. 2008. p. 2545-2556. <https://doi.org/10.3390/molecules13102545>

Sureda, A.; Tejada, S.; Bibiloni, M. D. M.; Tur, J. A.; Pons, A. Polyphenols: Well Beyond the Antioxidant Capacity: Polyphenol Supplementation and Exercise-Induced Oxidative Stress and Inflammation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. Vol. 15. p. 373- 379. 2014Santos et al., 2020.

Tonetti, CR. Obtenção do extrato bruto do fruto jambolão (*Syzygium cumini*): identificação dos compostos bioativos, avaliação da capacidade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. Dissertação (**Mestrado em Química**) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.