

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA TERMORRESISTENCIA 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, Chapadina – MA

Nágylla Silva de Almeida

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

Nívia Maria Rocha Brandão

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

Anailson de Oliveira Maciel

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

Samira Santos Araújo

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

Thiago Santos Santos

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

Jardson Guimarães Teixeira

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

Alana Samira da Silva Sousa

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

Vanda Ferreira Ribeiro

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

Francisco Cardoso Figueiredo

Colégio Técnico de Teresina – CTT,
Teresina - PI

Isolda Márcia Rocha do Nascimento

Colégio Técnico de Teresina – CTT,
Teresina - PI

Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco

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

RESUMO: A suplementação do extrato de jambolão (*Syzygium cumini*) ao meio diluidor para criopreservação do sêmen em ruminantes tem demonstrado aumento na viabilidade, e cinética espermática. Desta forma, objetivou-se avaliar cinética espermática, pelo teste de termorresistência lento, 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 µM) e extrato de jambolão (1mM, 5mM, 10mM e 20mM), adicionadas ao diluidor Tris-Gema. Posteriormente foram congeladas em sistema automatizado, na curva de congelação (-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 avaliação de motilidade e vigor em função do tempo (0 – 180 minutos), pelo teste de termorresistência lento. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o comando PROC GLM (do programa estatístico SAS 9.1®) e os dados foram submetidos à análise de regressão, adotando-se o nível de significância de 5%. Contrastes polinomiais foram utilizados para se determinar o efeito linear e quadrático dos tratamentos. Após 3 horas de incubação, foram encontradas diferenças no TTRL (P<0,05), para as variáveis motilidade e vigor espermático (Tabela 1). Assim como esperado, os parâmetros observados variaram ao longo do tempo. Entre os tratamentos verificou-se variação para motilidade e vigor espermático no tempo de 180 min (P<0,05), onde estes parâmetros obtiveram maiores resultados nos diluidores suplementados com 5, 10 e 20 mMol/mL de extrato de jambolão (*S. cumini*). Em conclusão, as concentrações de 10 mMol/mL e 20 mMol/mL do extrato de jambolão (*S. cumini*), foram eficazes em preservar a motilidade e o vigor espermático em períodos mais longos (180 minutos) após o descongelamento de sêmen bovino.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes, espermatozoides, motilidade seminal.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é essencial para o melhoramento genético e a eficiência da produção pecuária. Contudo, as taxas de fertilização reduzem significativamente devido à baixa viabilidade espermática após o descongelamento. A inclusão de antioxidantes naturais, como o extrato de jambolão, pode reduzir perdas financeiras relacionadas a inseminações mal-sucedidas, aumentando o retorno sobre os investimentos em biotecnologias reprodutivas. Além disso, o uso de um recurso vegetal acessível e amplamente disponível em regiões tropicais pode reduzir os custos associados a aditivos sintéticos, beneficiando economicamente os produtores (Sharafi et al., 2022).

No contexto social, a exploração sustentável de recursos naturais, como o jambolão, promove a valorização da biodiversidade regional e incentiva práticas agrícolas sustentáveis. Além disso, a melhoria na eficiência dos programas reprodutivos contribui para o aumento da produção de carne e leite, reforçando a segurança alimentar. Adicionalmente, a capacitação de profissionais para a aplicação de tecnologias inovadoras em criopreservação pode gerar impactos positivos no mercado de trabalho, fortalecendo o setor agropecuário em comunidades locais (Thongkham et al., 2023; Berean et al., 2024)

Avaliar a atividade do extrato de jambolão na suplementação ao diluidor de sêmen bovino é uma iniciativa alinhada a demandas científicas, econômicas e sociais, oferecendo uma abordagem sustentável e eficiente para a melhoria dos protocolos reprodutivos.

OBJETIVO

Avaliar cinética espermática, pelo teste de termorresistência lento, 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, despolidos 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 ≥ 80 %; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e patologias espermáticas ≤ 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 160×10^6 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 de termorresistência lento.

Para a avaliar a termoresistência espermática, foi utilizado a avaliação lenta (TTRL). Realizou-se a incubação em banho-maria de acordo com o teste TTRL (37 °C/180 min), para a avaliação ao longo do tempo, quanto à motilidade total (MT - %) e o vigor (1-5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos (Vianna et al., 2009).

Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o comando PROC GLM (do programa estatístico SAS 9.1®) e os dados foram submetidos à análise de regressão, adotando-se o nível de significância de 5%. Contrastes polinomiais foram utilizados para se determinar o efeito linear e quadrático dos tratamentos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Após 3 horas de incubação, foram encontradas diferenças no TTRL ($P < 0,05$), para as variáveis motilidade e vigor espermático (Tabela 1). Assim como esperado, os parâmetros observados variaram ao longo do tempo. Entre os tratamentos verificou-se variação para motilidade e vigor espermático no tempo de 180 min ($P < 0,05$), onde estes parâmetros obtiveram maiores resultados nos diluidores suplementados com 5, 10 e 20 mMol/mL de extrato de jambolão (*S. cumini*).

Parâmetros	Tratamentos mMol/mL					EPM ¹	Significância	
	Controle	1	5	10	20		Lin ²	Quad ³
Motilidade (%)								
0 min	31,66	25,83	31,00	40,00	25,83	8,019	0,922	0,672
60 min	21,50	29,50	25,00	26,33	18,50	5,966	0,631	0,258
120 min	13,16	19,00	15,00	14,83	14,33	2,143	0,789	0,281
180 min	1,66 ^B	8,00 ^{AB}	9,5 ^A	10,33 ^A	10,33 ^A	1,850	0,002	0,065
Vigor								
0 min	2,66	2,83	2,66	3,33	2,83	0,226	0,254	0,559
60 min	2,33	2,66	2,66	2,50	2,33	0,213	0,807	0,1565
120 min	1,83	2,50	2,00	1,50	2,00	0,281	0,459	0,7537
180 min	0,33 ^B	1,33 ^{AB}	1,33 ^{AB}	1,50 ^A	1,50 ^A	0,245	0,003	0,056

¹Erro Padrão da Média (%), ²Significância para efeito linear, ³Significância para efeito quadrático.

*Os dados foram avaliados por meio de regressão a 5% de probabilidade.

Medias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Tabela 1. Motilidade total (%) e Vigor espermático pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservado em em diferentes concentrações (0, 1, 5, 10 e 20 mMol/mL) de extrato de jambolão (*Syzygium cumini*) avaliados pelo teste de termo resistência

O comportamento durante o teste de termorresistência (TTRL) foi semelhante para ambos os parâmetros. As medidas apresentaram valores elevados nas primeiras horas do teste, seguidos por uma redução nas horas seguintes, culminando em uma estabilização em níveis baixos nas fases finais do experimento.

O extrato de jambolão (*S. cumini*) apresenta polifenóis que são um dos principais constituintes presente nas plantas e suas frutas, atuam diminuindo o excesso do estresse oxidativo associado ao envelhecimento e dano oxidativo celular, prevenindo assim a progressão de alterações patológicas (Meot et al., 2020).

Neste estudo observou-se que para todos os diluidores houve um decréscimo no metabolismo celular, observado pelo desgaste no perfil de motilidade e vigor espermático. No entanto, a diminuição verificada foi gradativa para os diluidores com extrato de jambolão (*S. cumini*), diferente do observado para o controle que teve redução abrupta. No tempo

de 180 min as concentrações de 5, 10 e 20 mMol/mL de extrato de jambolão (*S. cumini*) diferiram ($p < 0,05$) do controle, onde apresentaram médias mais elevadas.

A resposta para a atividade do extrato de jambolão (*S. cumini*), se deve a presença de compostos bioativos que atuam na modulação de vias metabólicas relacionadas ao controle de glicose e lipídios. Estudos mostram seu potencial sobre o perfil de glicose, melhorando a sensibilidade à insulina, esses efeitos ajudam a estabilizar o metabolismo energético celular e sistêmico (Chagas et al., 2015; Qamar et al., 2022).

CONCLUSÃO

Em conclusão, as concentrações de 10 mMol/mL e 20 mMol/mL do extrato de jambolão (*S. cumini*), foram eficazes em preservar a motilidade e o vigor espermático em períodos mais longos (180 minutos) após o descongelamento de sêmen bovino.

REFERÊNCIAS

Berean, D.I.; Bogdan, L.M.; Cimpean, R. Advancements in Understanding and Enhancing Antioxidant-Mediated Sperm Cryopreservation in Small Ruminants: Challenges and Perspectives. **Antioxidants**, 2024, 13(6), 624. <https://doi.org/10.3390/antiox13060624>

Chagas, V.T.; França, L.M.; Malik, S.; Paes, A.M.A. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in Pharmacology**, 2015, 6 (259).

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

Qamar, M.; Akhtar, S.; Ismail, T.; Wahid, M.; Abbas, M.W.; Mubarak, M.S.; Yuan, Y.; Barnard, R.T.; Ziora, Z.M.; Esatbeyoglu, T. Phytochemical Profile, Biological Properties, and Food Applications of the Medicinal Plant *Syzygium cumini*. **Foods** 2022, 11(3), 378; <https://doi.org/10.3390/foods11030378>

Sharafi, M.; Borghei-Rad, S.M.; Hezavehei, M.; Shahverdi, A.; Benson, J.D. Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. **Animals**. 2022, 12(23), 3271. <https://doi.org/10.3390/ani12233271>

Thongkham, M, Saenjaiban, A, Jantanasakulwong, K, Pattanawong, W, Arjin, C, Hongsibsong, S, et al. New insights from poly-lactic acid and ionomer films coupled with recombinant antibodies for processing sexed-sorting bovine sperm. **Int J Biol Macromol.** (2023) 256:128425. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128425

Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua Jr. JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Anim Reprod Sci**, v.113, p.279-282, 2009.