

**Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANIBA CANELILLA,
BLUEBERRY E POLIFENOL DE CHÁ VERDE
SOBRE A VIABILIDADE *IN VITRO* DE
ESPERMATOZOIDES DE BÚFALO (*BUBALUS BUBALIS*)
RESFRIADOS A 5°C**

Verónica Alexandra Becerra Becerra

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2017**

Verónica Alexandra Becerra Becerra

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANIBA CANELILLA, BLUEBERRY
E POLIFENOL DE CHÁ VERDE SOBRE A VIABILIDADE *IN VITRO*
DE ESPERMATOZOIDES DE BÚFALO (*BUBALUS BUBALIS*)
RESFRIADOS A 5°C**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Marc Roger Jean Marie Henry

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2017**

B389e Becerra, Verónica Alexandra Becerra, 1983-
Efeito da adição de Aniba Canelilla, Blueberry e Polifenol de Chá Verde sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides de búfalo (*Bubalus bubalis*) resfriados a 5°C.
/ Verónica Alexandra Becerra Becerra. – 2017.
68 p. : il.

Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Búfalo– Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Criopreservação – Teses.
3. Espécies reativas de oxigênio – Teses. 4. Estresse oxidativo – Teses.
5. Antioxidantes – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

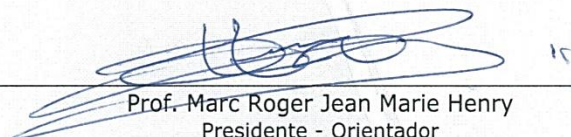
CDD – 636.293 089 26

FOLHA DE APROVAÇÃO

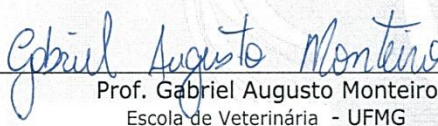
VERONICA ALEXANDRA BECERRA BECERRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovada em 10 de Abril de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
Presidente - Orientador


Prof.ª Mariana Machado Neves
Universidade Federal de Viçosa - UFV


Prof. Gabriel Augusto Monteiro
Escola de Veterinária - UFMG

*Dedico este trabalho a minha imensa família, que sempre esteve ao meu lado me dando suporte e as forças necessárias para continuar me superando.
Em especial a minha mãe Adriana e minha vó Delita.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe pelo exemplo que tem sido durante toda minha vida, a minha avó pelo seu amor e sabedoria que ainda continua presente. A meus tios, Susi, Moni, Amparito, Pachu, Glori, Ceci, Aidita, Vini, Galo, Arman, Ernes e Marce sou sempre grata pelos conselhos e carinho de vocês. A minha família toda (pães, irmãos, tios e primos) por tudo o apoio recebido ao longo deste tempo, mesmo eu estando longe sempre estiveram perto de mim.

Ao Gerardo quem com amor esteve durante todo este tempo ao meu lado, sendo meu sustento incondicional.

Agradeço a meu orientador o Professor Marc Henry pela oportunidade, amizade, paciência, transparência, ensinamentos e os momentos compartilhados durante todo este tempo. A professora Joana pela amizade e a contribuição estatística deste trabalho. Aos professores da UFMG pelo conhecimento compartilhado no mestrado.

À equipe de trabalho Mayara, Beatriz, Patricia e Jaci pela ajuda durante todo este tempo.

Ao Marcelino pelo sorriso dos dias todos.

Aos amigos de aulas da pós-graduação Reprodução Animal: Philipe, Luciano, Adolfo, Gustavo, Poliana, Isabela, Silvio e Lucas pelas risadas, cumplicidade e torcida durante nosso crescimento profissional.

Ao Gui por ser meu melhor amigo, o anjo brasileiro que achei no caminho. Obrigada de coração pela amizade.

Aos meus bons amigos e nova família: Mirela, Katia, Mariana, Erika e Lana; muitíssimo obrigada pelo carinho, pela torcida nos bons e maus momentos, por me fazer sentir como em casa.

Aos búfalos por seu amor bubalino, por prover a felicidade e alegria de trabalhar com eles.

Ao Giancarlo Nappi e Luis Heneine dos Laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias por prover os extratos de polifenol de chá verde e blueberry.

À professora Joyce Kelly do R. da Silva, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará; por prover o óleo essencial de *Aniba canelilla*.

Ao LANAGRO-MG por fazer possível a extração das lipoproteínas de baixa densidade

À Escola de Veterinária da UFMG e ao Programa Estudantes - Convênio de Pós-Graduação - PEC - PG, da CAPES/CNPq - Brasil pela oportunidade de realização do mestrado e concessão da bolsa.

A todos os que fizeram parte do meu caminho e aos que contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

Science never solves a problem without creating ten more.
George Bernard Shaw.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN.....	15
3.2. ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO	16
3.3. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	18
3.4. ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	20
3.4.1. Aniba canelilla	21
3.4.2. Blueberry	22
3.4.3. Polifenol de chá verde.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO	25
4.2. ELABORAÇÃO DE MEIOS DILUIDORES	26
4.2.1. Extração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) a partir da gema de ovo de galinha.....	26
4.2.2. Elaboração do meio à base tris 10% LDL	26
4.2.3. Determinação de antioxidantes não enzimáticos e suas concentrações no meio à base tris 10% LDL	26
4.2.3.1 Aniba canelilla	27
4.2.3.2 Blueberry	28
4.2.3.3 Polifenol de chá verde.....	28
4.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	29
4.4. AVALIAÇÃO E PROCESSAMENTO SEMINAL	29
4.5. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO SEMINAL	30
4.5.1. Morfologia espermática	30
4.5.2. Motilidade espermática.....	31
4.5.3. Integridade funcional da membrana plasmática.....	31
4.5.4. Integridade do acrossoma	32
4.5.5. Citometria de fluxo	32
4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5. RESULTADOS	34
5.1. FASE 1 - TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES	34
5.1.1. Aniba canelilla	34
5.1.2. Blueberry	37
5.1.3. Polifenol de chá verde.....	39

5.2.	FASE 2 – COMPARAÇÃO ENTRE ANTIOXIDANTES	41
6.	DISCUSSÃO	44
7.	CONCLUSÕES	49
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
9.	ANEXOS	62
	ANEXO 1.....	62
	ANEXO 2.....	63
	ANEXO 3.....	64
	ANEXO 4.....	65
	ANEXO 5.....	66
	ANEXO 6.....	67
	ANEXO 7.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média (\pm DP) de parâmetros seminais e valores de enzimas antioxidantes intracelulares de espermatozoide de búfalos em sêmen resfriado e sêmen após descongelamento.....	19
Tabela 2.	Antioxidantes não enzimáticos e concentrações adicionadas ao meio à base tris 10% LDL.....	27
Tabela 3.	Composição química do óleo essencial das cascas de <i>Aniba canelilla</i> , empregado na elaboração dos meios diluidores Tris 10% LDL + <i>Aniba canelilla</i> 0,5, 5 e 50 μ g/ml.....	27
Tabela 4.	Características de ejaculados de búfalos coletados por vagina artificial.....	30
Tabela 5.	Defeitos maiores e menores.....	31
Tabela 6.	Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5, 5 e 50 μ g de <i>A. canelilla</i> /ml.....	35
Tabela 7.	Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5; 5 e 50 μ g/ml de <i>Aniba canelilla</i>	35
Tabela 8.	Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μ g de blueberry/ml.....	37
Tabela 9.	Médias (\pm DP de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μ g de blueberry/ml....	37
Tabela 10.	Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05, 5 e 50 μ g/ml de polifenol de chá verde.....	39

Tabela 11.	Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05; 5 e 50 μ g/ml de polifenol de chá verde.....	39
Tabela 12.	Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C.....	41
Tabela 13.	Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C.....	43
Tabela 14.	Médias (\pm DP) da integridade acrossomal de espermatozoides de búfalos diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C, avaliados pelo teste de coloração Giemsa 6%.	43
Tabela 15.	Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos positivos ao teste de integridade estrutural da membrana plasmática avaliado mediante citometria de fluxo (sonda PI/SBYR) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C.....	43
Tabela 16.	Médias (\pm DP) do índice de fragmentação de cromatina de espermatozoides de búfalos, diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C, avaliados mediante citometria de fluxo (sonda AO) às 24 e 72 horas de incubação.....	44
Tabela 17.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5; 5 e 50 μ g/ml <i>Aniba canelilla</i> , resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	62
Tabela 18.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μ g de blueberry/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	63
Tabela 19.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05; 5 e 50 μ g/ml de Polifenol de chá, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	64
Tabela 20.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. <i>canelilla</i> 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organograma de fatores envolvidos na geração do estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	18
Figura 2.	Mecanismo de ação do sistema antioxidante.....	19

Figura 3.	Estrutura química dos principais componentes de <i>Aniba canelilla</i>	21
Figura 4.	Estrutura química dos principais componentes blueberry.....	22
Figura 5.	Estrutura química dos principais componentes do polifenol de chá verde.....	24
Figura 6.	Organograma dos testes realizados e meios diluidores empregados em sêmen refrigerado de búfalos.....	29
Figura 7.	Organograma da avaliação e processamento seminal, e análises espermáticas realizadas.....	33
Figura 8.	Organograma da caracterização do número amostral.....	34
Figura 9.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5; 5 e 50 μ g/ml de <i>Aniba canelilla</i> , resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	36
Figura 10.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μ g de blueberry/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	38
Figura 11.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05; 5 e 50 μ g/ml de Polifenol de chá verde, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	40
Figura 12.	Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.....	42
Figura 13.	Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos (n=9) reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática avaliados pelo teste hiposmótico (HO).....	65
Figura 14.	Médias (\pm DP) da integridade funcional da membrana plasmática e integridade acrossomal de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml, blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml, resfriados a 5°C.	67
Figura 15.	Médias (\pm DP) da integridade estrutural da membrana plasmática e índice de fragmentação da cromática de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml.	68

RESUMO

O aumento das espécies reativas ao oxigênio (ERO) gera o estresse oxidativo e causa efeitos deletérios aos espermatozoides no sêmen refrigerado, congelado e descongelado. O uso de antioxidantes não enzimáticos no meio diluidor, pode preservar os espermatozoides da ação negativa das ERO durante o processo de criopreservação. O objetivo deste trabalho foi determinar concentrações apropriadas dos antioxidantes não enzimáticos *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol e chá verde no meio à base tris 10% LDL e testar sua eficiência sobre a longevidade e viabilidade espermática de sêmen de búfalo preservado a 5°C. Este trabalho foi dividido em duas fases. Ejaculados de 9 machos bubalinos foram usados com cada antioxidante. As amostras da fase 1 e 2 foram analisadas pelo CASA antes do resfriamento e a cada 24 horas após resfriamento até a motilidade espermática total decrescer até 10%. A integridade funcional da membrana plasmática foi analisada mediante teste hiposmótico em sêmen fresco e às 24 e 48 horas na fase 1; e às 24 e 72 horas na fase 2. Adicionalmente, as amostras da fase 2 foram submetidas ao teste de integridade acrossomal realizado em sêmen fresco e às 24 e 72 horas; mediante citometria de fluxo avaliou-se a integridade estrutural da membrana e a integridade da cromatina às 24 e 72 horas de resfriamento. O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso, os dados foram avaliados pelo método dos quadrados mínimos, utilizando o pacote PROC MIXED do programa SAS – versão 6.12. Para as variáveis que após transformação de dados ainda não atendiam a homocedasticidade de variâncias, utilizou-se o teste não paramétrico de Friedman com o programa InfoStat (2014). A significância estatística foi considerada quando $P \leq 0,05$. Na **fase 1** determinou-se na incubação de sêmen de búfalos a 5°C, a concentração mais adequada de *Aniba canelilla* (0,5, 5 e 50 µg/ml), blueberry (10, 50 e 100 µg/ml) e polifenol de chá verde (0,05; 5 e 50 µg/ml) adicionados ao meio à base tris 10% LDL. As concentrações elegidas foram *Aniba canelilla* 50µg/ml, blueberry 50 µg/ml e polifenol de chá verde 0,05µg/ml por apresentar melhores respostas ($P \leq 0,05$) na cinética espermática e/ou por mostrar inocuidade aos espermatozoides de búfalos. A adição de 50µg/ml de polifenol de chá verde ao meio diluidor Tris 10% LDL, teve consequências negativas na motilidade, funcionalidade da membrana plasmática e sobrevivência dos espermatozoides de búfalos. Na **fase 2** foi comparada a eficiência da melhor concentração dos antioxidantes testados na primeira fase. O meio diluidor *Aniba canelilla* 50µg/ml tris 10% LDL promoveu a melhora da cinética espermática ($P \leq 0,05$) nos parâmetros motilidade total (MT), MP, Rápidos, VCL, VSL, VAP e BCF. Além de prolongar a longevidade espermática ao ter maior número de amostras com MT às 120 horas de refrigeração a 5°C. Em relação aos parâmetros avaliados, integridade funcional e estrutural da membrana plasmática, integridade do acrossoma, integridade da cromatina não houveram diferenças significativas entre tratamentos. Conclui-se que *Aniba canelilla* poderá ser de considerável ajuda se ajustadas as concentrações nos meios diluidores, tanto para sêmen bubalino como para outras espécies. Há necessidade de serem realizadas mais avaliações de cada substância a fim de obter um ganho na preservação de espermatozoides e protege-los do estresse oxidativo sem afetar a fertilidade.

Palavras chave: antioxidante, espécies reativas ao oxigênio, estresse oxidativo, resfriamento de sêmen, sêmen de búfalo.

ABSTRACT

The increase of reactive oxygen species (ROS) generates oxidative stress, which causes harmful effects to spermatozoa in cooled, frozen and post thaw procedures. The use of non-enzymatic antioxidants in extenders, could preserve the spermatozoa from negative action of ROS during the cryopreservation process. The aim of this study was to determine appropriate concentrations of non-enzymatic antioxidants *Aniba canelilla*, blueberry and green tea polyphenol in the extender Tris with 10% LDL, and test their efficiency on spermatozoa viability and longevity in buffalo semen preserved at 5°C. This work was divided into two phases. Ejaculates of nine buffalo bulls were used to test each antioxidant. Samples of phase 1 and 2 were analyzed by CASA before refrigeration and every 24 hours after refrigeration until total sperm motility decreased to 10%. The functional plasma membrane integrity was analyzed by hypoosmotic swelling test in fresh semen, 24 and 48 hours in phase 1; 24 and 72 hours in phase 2. Additionally, samples of phase 2 were analyzed by acrosome integrity on fresh semen, 24 and 72 hours; and by flow cytometry to evaluated structural plasma membrane integrity and sperm chromatin integrity at 24 and 72 hours after cooling. The experimental design used was a randomized block, the data were analyzed by the least squares method using the PROC MIXED of program SAS - version 6.12. For variables that after transformation of data did not satisfy the homoscedasticity of variances, it was used the non-parametric Friedman test with the program InfoStat (2014). Differences were considered to be statistically significant when $P \leq 0.05$. In **phase one** it was determined the best concentration of *Aniba canelilla* (0,5; 5 or 50 µg/ml), blueberry (10, 50 e 100 µg/ml) and green tea polyphenol (0,05; 5 or 50 µg/ml) added to the extender Tris 10% LDL. The elected concentrations were for *Aniba canelilla* 50µg/ml, blueberry 50 µg/ml and green tea polyphenol 0,05µg/ml based on results of spermatoc kinetics ($P \leq 0.05$) and/or based on their innocuous results for buffalo spermatozoa. The addition of 50 ug/ml of green tea polyphenol to the extender Tris 10% LDL exerted negative consequences on motility, plasma membrane integrity and survival of sperm buffalo. In **phase two** the efficiency of the best concentrations of the antioxidants tested in phase one was compared. In phase 2 the extender Tris 10% LDL supplemented with *Aniba canelilla* 50 µg/ml lead to the improvement of spermatoc kinetic parameters ($P \leq 0.05$) such as total motility (TM), PM, Rapid, VCL, VSL, VAP and BCF; besides preserving spermatoc longevity in buffalo semen cooled at 5°C for a long period. Functional and structural plasma membrane integrity, acrosome integrity, chromatin integrity did not significantly differ between treatments. It is concluded that *Aniba canelilla* may be of considerable help for buffalo semen and for other species if the concentrations are adjusted to the extenders. More assessments of each substance are needed in order to obtain a gain in sperm preservation and protect them from oxidative stress without affecting fertility.

Keywords: antioxidant, reactive oxygen species, oxidative stress, cooling semen, buffalo semen.

1. INTRODUÇÃO

O búfalo de água pertence à família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, espécie *Bubalus bubalis* que se subdivide em duas subespécies: de rio e de pântano (FAO, 2016). Segundo a FAO (2016), a população mundial de búfalos consta de cerca de 168 milhões de cabeças, sendo que a Ásia possui 95% da população bubalina e os cinco por cento restante está distribuído nos outros continentes. Segundo a Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal (2015), o Brasil possui um rebanho de aproximadamente 1.183.103 cabeças. Não obstante, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) reporta um rebanho de três milhões de animais.

A importância dos búfalos está na possibilidade desta espécie ser uma alternativa para alavancar a economia em regiões onde outras espécies domésticas de interesse zootécnico não se adaptam. Em climas tropicais, o búfalo é usado para incrementar a produção do leite e carne, tendo relevante impacto social (FAO, 2016). A bubalinocultura é uma atividade crescente no Brasil e altamente rentável na agroindústria (Vieira *et al.*, 2009) em função do temperamento dócil dos animais que facilitam o manejo e criação do rebanho, assim como a crescente demanda do mercado alimentício, estimulado pelos valores nutricionais e características organolépticas do leite e carne (Bernardes, 2007; Da Silva e De Nardi Junior, 2014).

Os búfalos possuem alta rusticidade, adaptabilidade ao meio ambiente, ampla longevidade produtiva e reprodutiva. No entanto enfrentam uma puberdade tardia e baixa expressão do estro (Madan *et al.*, 1996; Drost, 2007; Malhado *et al.*, 2008), esses desafios podem ser facilmente superados com melhorias no ambiente, manejo, nutrição, saúde e bem-estar animal (Baruselli e Carvalho, 2005; Presicce, 2007; Perera, 2008). No campo da biotecnologia da reprodução, os búfalos apresentam taxas variáveis de Inseminação Artificial (IA), baixa eficiência de superovulação e transferência embrionária quando comparados com os bovinos (Gasparrini, 2002; Baruselli e Carvalho, 2005; Perera, 2008; Suresh *et al.*, 2009). Na bubalinocultura existe a necessidade de aumentar a eficiência reprodutiva e incrementar o melhoramento genético (Malhado *et al.*, 2008). O desenvolvimento e uso da IA, tecnologia que visa o melhoramento genético mais rápido, depende fundamentalmente da detecção do cio e da preservação do sêmen (Visintin *et al.*, 1997).

Na espécie bubalina há um número limitado de informações sobre as características seminais e a viabilidade espermática frente à preservação *in vitro*. Portanto, é necessário o desenvolvimento de pesquisas adicionais para impulsionar o uso da biotecnologia de preservação de sêmen (Sansone *et al.*, 2000). A conservação e armazenamento do sêmen dependem de vários fatores para atingir seu sucesso, onde o alvo principal é manter a capacidade fertilizante. Para isso, é necessário minimizar os efeitos deletérios e mudanças na estrutura dos espermatozoides, com a consequente redução de motilidade durante a diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen (Weitze e Petzoldt, 1992). Mediante o uso do resfriamento, é possível diminuir o metabolismo dos espermatozoides. No caso do congelamento, há parada absoluta do metabolismo espermático, com a finalidade de aumentar sua longevidade e uso posterior na IA (Holt, 1997).

Os espermatozoides possuem um limitado volume e restrição do espaço citoplasmático, dependem do meio ambiente para obter nutrientes, eliminar produtos do metabolismo celular e ter a proteção antioxidante necessária (Vishwanath e Shannon, 2000; Aitken *et al.*, 2015). O que os torna extremamente sensíveis a danos celulares originados pelas espécies reativas ao oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), que são produtos do metabolismo espermático e morte celular.

Mudanças no protocolo e na metodologia de criopreservação, na formulação dos meios diluidores, no tipo de manipulação do sêmen, entre outras variáveis, podem influenciar a viabilidade dos espermatozoides criopreservados. Uma das possibilidades de aumentar a viabilidade espermática do sêmen criopreservado é ajustar a efetividade do sistema antioxidante, que é essencial para combater o estresse oxidativo (Memon *et al.*, 2011).

A disponibilidade crescente de informações que permitem a maior compreensão das alterações fisiopatológicas provocadas pelas ERO associada à existência de inumeráveis fontes de antioxidantes não enzimáticas, são estímulos para trabalhar na melhoria da viabilidade espermática nos processos de criopreservação. Com foco na diminuição dos efeitos deletérios das ERO e ERN. Não obstante, há poucas informações disponíveis sobre os antioxidantes e os efeitos que estes exercem quando usados em sêmen resfriado de búfalos. Não foram encontrados relatos do uso dos antioxidantes *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde em meios diluidores de sêmen de búfalos, tanto para preservação em estado líquido como congelado. Adicionalmente, *Aniba canelilla* é um composto novo que não tem sido empregado ainda na área reprodutiva, não foram encontrados relatos do seu uso em processos reprodutivos. Portanto, o estudo e a pesquisa do efeito de novos antioxidantes não enzimáticos, a determinação das concentrações ótimas para seu uso nos meios diluidores poderão melhorar a viabilidade espermática e fertilidade de sêmen resfriado. Facilitando o desenvolvimento e aprimoramento dos protocolos de IA, particularmente para a espécie bubalina.

Com intuito de melhorar a preservação dos espermatozoides em sêmen refrigerado de búfalo, no presente trabalho foram adicionados antioxidantes não enzimáticos *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol do chá verde em meio à base tris 10% LDL.

2. OBJETIVO

- Determinar concentrações apropriadas dos antioxidantes *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde no meio diluidor Tris 10% LDL para ser usado em sêmen resfriado de búfalo a 5°C.
- Preservar os espermatozoides da ação das espécies reativas ao oxigênio durante o processo de resfriamento.
- Manter a longevidade e viabilidade de espermatozoides bubalinos resfriados a 5°C, através da adição de antioxidantes de origem vegetal aos meios diluidores.
- Testar a eficiência de *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde no meio diluidor sobre a viabilidade espermática de sêmen de búfalo preservado a através das avaliações: motilidade e cinética espermática mediante o sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) System Sperm Class Analyzer®, integridade funcional e estrutural da membrana, integridade da cromatina, integridade acrossomal e da morfologia espermática.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

A vantagem de usar sêmen resfriado ou congelado tornam os programas de inseminação artificial ferramentas de alto impacto para o desenvolvimento do melhoramento genético em búfalos (Sansone *et al.*, 2000; Sukhato *et al.*, 2001). Durante o processo de criopreservação ocorrem mudanças nas estruturas dos espermatozoides, particularmente nas membranas, que podem sofrer alterações do seu funcionamento e influenciar a sobrevivência ou morte espermática assim como interferir na fertilidade (Holt, 2000).

A membrana plasmática dos espermatozoides é composta por 65-70% de fosfolípidios dispostos em bicamadas lipídicas, além de proteínas, colesterol, glicolípidios e glicoproteínas que conferem fluidez e estabilidade à membrana, que pode ser afetada pela variação de temperatura causando alterações como a segregação dos componentes estruturais da membrana. (Parks e Graham, 1992; Watson, 1995; Holt, 2000). Proteínas e lipídeos mudam sua posição e se concentram em regiões específicas, os lipídeos passam da fase líquida e cristalina para a fase gelificada e iniciam sua agregação, o que gera perda de fluidez da membrana. Esta mudança pode formar micelas e canais hidrofílicos que permitem a passagem de íons e moléculas pequenas, alterando o estado de equilíbrio (Holt e North, 1984; Parks e Graham, 1992). Durante o descongelamento, estes distúrbios ocorridos em baixas temperaturas impedem o normal rearranjo da bicamada lipídica, acarretando danos na estrutura e funcionalidade da membrana plasmática (Parks e Graham, 1992).

Na preservação do sêmen em estado líquido, o maior efeito do estresse térmico é a redução do número de espermatozoides móveis e perda da integridade da membrana plasmática devido a mudanças na sua composição (Weitze e Petzoldt, 1992). O processo de criopreservação afeta claramente a atividade enzimática, que diminui na faixa de temperatura de 20°C a -196°C, comprometendo a distribuição das enzimas antioxidantes na superfície dos espermatozoides (Watson, 1995; Sansone *et al.*, 2000; Marti *et al.*, 2008).

A principal vantagem de usar sêmen resfriado ao congelado é a prevenção de crioinjúrias associadas ao congelamento. A técnica de resfriamento de sêmen a 5°C, por aumentar a viabilidade espermática a curto prazo, pode aumentar as taxas de gestação a baixo custo (Crespilho *et al.*, 2014), fato demonstrado em búfalas submetidas a IA onde as taxas de concepção foram maiores com sêmen refrigerado versus sêmen congelado (Anzar *et al.*, 2003). Dentro de todas as etapas envolvidas no processo de criopreservação, as que mais danos causam aos espermatozoides é o congelamento e descongelamento (Parks e Graham, 1992; Watson, 1995; Rasul *et al.*, 2001). A cromatina pode ser modificada pelo processo de criopreservação (Watson, 1995; Thomson *et al.*, 2009; Gurler *et al.*, 2016), a integridade do DNA espermático pode sofrer alterações e danos irreversíveis no sêmen congelado de búfalo em níveis mais elevados quando comparado ao sêmen resfriado (Garg *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011). Em contraste, foi observado que o congelamento não danifica significativamente o DNA de espermatozoides de búfalo e que o sêmen resfriado só mostra danos no DNA após 48 e 72 horas de armazenamento a 5°C (Kadirvel *et al.*, 2009; Rastegarnia *et al.*, 2013).

No intuito de minimizar os efeitos prejudiciais que o processo de resfriamento e congelamento acarretam às células espermáticas, pesquisas têm desenvolvido meios diluidores para minimizar os danos causados durante o processo de criopreservação (Watson, 1995; Bergeron e Manjunath,

2006; Büyükleblebici *et al.*, 2014; Crespilho *et al.*, 2014). Um meio diluidor deve ter uma osmolaridade e pH adequados, controlar o metabolismo celular, promover a ocorrência da capacitação espermática no momento adequado, conservar a funcionalidade e integridade da membrana plasmática, controlar a contaminação bacteriana e, o mais importante, não prejudicar o potencial de fertilização dos espermatozoides (Watson, 1995; Holt, 2000; Liu *et al.*, 2016).

Uma das variáveis que afetam os espermatozoides quando submetidos à diluição é a osmolaridade. Variâncias hiperosmóticas ou hiposmóticas levam ao estresse osmótico, causando danos na membrana plasmática e alterando sua permeabilidade (Watson, 1995; Ball, 2008). A osmolaridade do sêmen de búfalo é de $268,8 \pm 1,17$ mOsm/l e do plasma $256 \pm 1,53$ mOsm/l; variações a baixo de 250 mOsm/l são desfavoráveis para esta espécie (Khan e Ijaz, 2008).

Uma ampla gama de compostos pode ser utilizada na hora de elaborar um meio diluidor, a fim de formar uma solução que preserve adequadamente os espermatozoides. Os crioprotetores têm sido usados para prevenir danos que ocorrem durante o processo de congelamento. Crioprotetores permeáveis atuam ao ingressar na célula modulando a taxa de desidratação, sendo principalmente usado o glicerol. Os crioprotetores não permeáveis são moléculas ativas que regulam a osmolaridade do meio (dissacarídeos) e moléculas inativas como polissacarídeos, proteínas e lipídios (Sieme *et al.*, 2016). Os fosfolipídios da gema de ovo interagem com a superfície de membrana plasmática dos espermatozoides, conferindo ação protetora durante o processo de criopreservação quando usados no meio diluidor (Watson e Martin, 1975; Bergeron e Manjunath, 2006). As lipoproteínas de baixa densidade extraídas da gema de ovo atuam mediante vários mecanismos. Acredita-se que atuam estabilizando a membrana plasmática do espermatozoide ao repor os fosfolipídios e ao capturar as proteínas do plasma seminal bovino (BSP), melhoram a congelabilidade e fertilidade de sêmen de búfalos (Moussa *et al.*, 2002; Akhter *et al.*, 2011; El-Sharawy *et al.*, 2012). A adição de antioxidantes aos meios diluidores mantém a qualidade do sêmen (Bast *et al.*, 1991; Martínez-Páramo *et al.*, 2012), preservando a atividade metabólica e viabilidade celular (Beconi *et al.*, 1993), sendo primordiais para manter a funcionalidade, estabilidade e sobrevivência espermática (Bast *et al.*, 1991; Marti *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008; Martínez-Páramo *et al.*, 2012; Kadirvel *et al.*, 2014).

3.2. ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO

Os espermatozoides dependem do meio ambiente para suprir as necessidades de nutrientes e eliminação de produtos do metabolismo celular, tornando-se extremamente sensível a danos celulares quando inadequadamente protegido (Vishwanath e Shannon, 1997). Devido ao limitado conteúdo citoplasmático com baixo conteúdo de enzimas antioxidantes intrínsecas para proteger toda a extensão da membrana plasmática do espermatozoide (Aitken e Koppers, 2011)

Os danos celulares durante a criopreservação têm várias origens e, entre outras, podem ser causados pela presença de radicais livres (O_2^- , $H_2O_2^-$, HO^- , NO^- , $ONOO^-$, $HOCl^-$, R^-) que são classificados como espécies reativas ao oxigênio (ERO) e espécies reativas ao nitrogênio (ERN). As ERO e ERN podem tomar três caminhos: redução de um átomo de hidrogênio, redução de um elétron ou adição de oxigênio. ERO e ERN são produzidas mediante reações endógenas, quando o oxigênio e o nitrogênio se unem a complexos orgânicos como resultado do metabolismo celular (Lykkesfeldt e Svendsen, 2007).

As ERO e ERN também agem no organismo de maneira benéfica e permitem que uma série de funções fisiológicas sejam possíveis ao atuar como desencadeadores de múltiplos processos. Por exemplo, ERO têm funções fisiológicas em vários processos dos espermatozoides como capacitação, hiperativação, reação acrossomal, união com a zona pelúcida e fecundação (Marti *et al.*, 2008; Roy e Atreja, 2008; Angelopoulou *et al.*, 2009; Amrit Kaur e Bilaspuri, 2011; Kadirvel *et al.*, 2014).

Inúmeras causas desencadeiam um aumento nas ERO e ERN. Quando estas ultrapassam o equilíbrio, surge o estresse oxidativo (Mandelker, 2011). O processo de criopreservação aumenta o estresse oxidativo, que está associado à fragmentação do DNA, posterior ativação de caspases e conseqüentemente apoptose (Thomson *et al.*, 2009; Gurler *et al.*, 2016). O desequilíbrio na quantidade de ERO e ERN é considerado um dos principais desencadeantes de dano celular antes, durante e após o resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen. Acredita-se que isto ocorra devido à redução da disponibilidade de antioxidantes naturais presentes no plasma seminal quando o espermatozoide é diluído nos meios diluidores e durante seu processamento subsequente (Marti *et al.*, 2008). Assim como deficiências no trato reprodutivo do macho para exercer proteção antioxidante, ou infiltração leucocitária no sêmen a causa de processos inflamatórios no trato reprodutivo do macho (Aitken e Koppers, 2011; Aitken e Baker, 2013).

Os alvos principais da oxidação são os lipídios, proteínas e DNA. Os espermatozoides são vulneráveis à peroxidação lipídica devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática, as ERO extraem o átomo de hidrogênio que ao reagir com uma molécula de oxigênio, da origem ao radical peroxil. O que gera uma reação em cadeia com o comprometimento da integridade da membrana plasmática, dano mitocondrial e do DNA. Estes danos dão origem à cascata intrínseca da apoptose no espermatozoide. Por conseguinte, perda da motilidade e viabilidade espermática (Aitken *et al.*, 2006; Lykkesfeldt e Svendsen, 2007; Koppers *et al.*, 2008; Aitken e Koppers, 2011; Aitken *et al.*, 2012), figura 1.

Os espermatozoides de bubalinos são mais sensíveis à peroxidação lipídica que os espermatozoides de bovinos, devido ao reduzido teor de fosfolipídios na membrana plasmática, o que os torna mais sensíveis a danos por peroxidação lipídica e estresse de congelamento (Sansone *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2006; Andrabi, 2009; Garg *et al.*, 2009).

Uma excessiva produção de ERO causa estresse oxidativo, o que resulta numa baixa qualidade seminal. A depleção de ATP, peroxidação lipídica, dano mitocondrial e do DNA dão origem a várias patologias espermáticas: queda de motilidade e atividade metabólica, ruptura das membranas, danos ao axonema, aumento de alterações morfológicas na peça intermediária, efeitos deletérios na capacitação espermática e reação acrossomal, diminuição de longevidade e viabilidade espermática, queda da fertilidade, baixas taxas de concepção e infertilidade (Ball *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2008; Amrit Kaur e Bilaspuri, 2011; Zhong e Zhou, 2013; Crespilho *et al.*, 2014; El-Taieb *et al.*, 2015) .

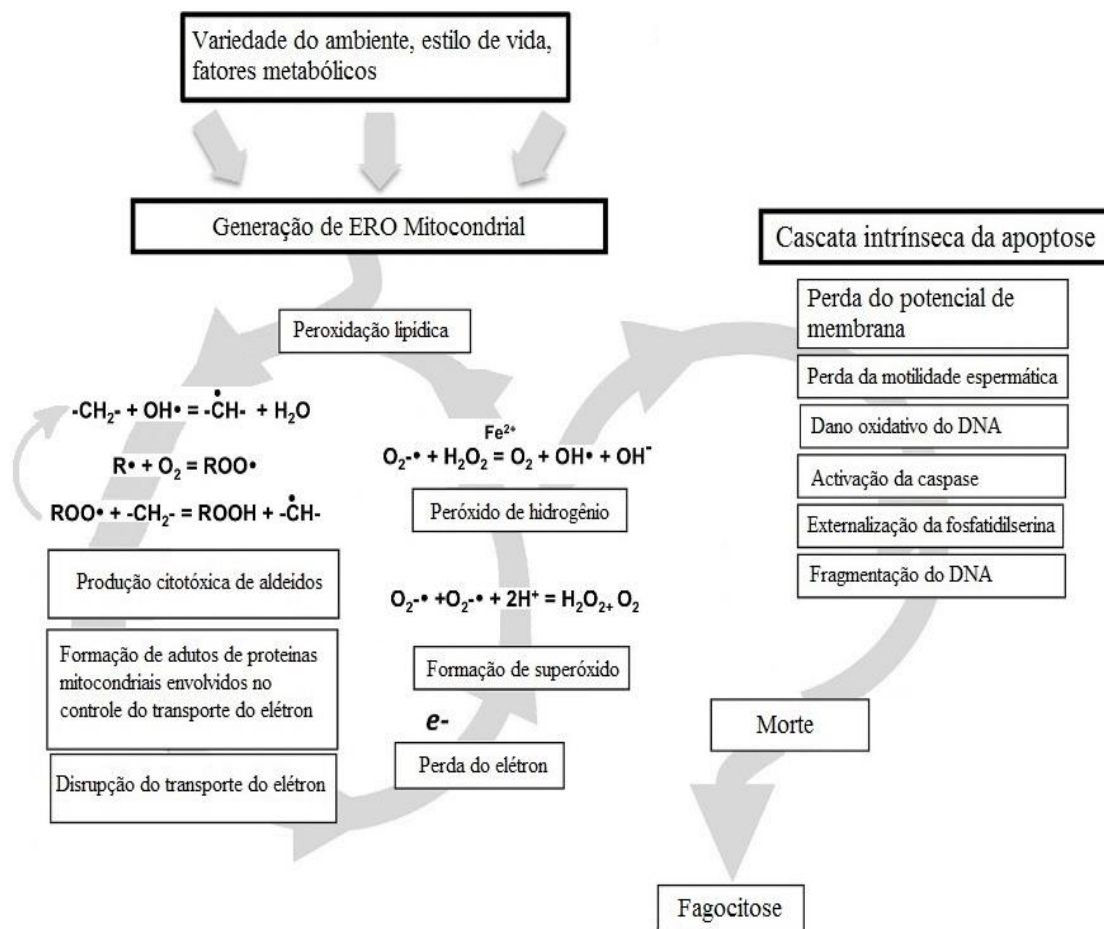


Figura 1. Organograma de fatores envolvidos na geração do estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Fonte: (Aitken *et al.*, 2012).

3.3. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes são compostos capazes de doar elétrons, possibilitando neutralizar, prender, eliminar ou inibir as ERO e seus efeitos deletérios. Uma vez realizada sua função, os antioxidantes são reciclados mediante vários processos celulares para seu estado normal, impedindo que mais danos celulares aconteçam (Lykkesfeldt e Svendsen, 2007; Amrit Kaur e Bilaspuri, 2011).

O organismo possui um sistema antioxidante que é formado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GSHPx ou GPx), glutaciona redutase (GR) (Amrit Kaur e Bilaspuri, 2011; Mandelker, 2011). Estas enzimas antioxidantes estão presentes em mínima quantidade nos espermatozoides e maiormente no plasma seminal. São ativadas pelas ERO, possibilitando a defesa dos efeitos deletérios que estes exercem sobre os espermatozoides (Aitken e Curry, 2011; Kadirvel *et al.*, 2014). Seu mecanismo de ação pode-se observar na figura 2. A SOD catalisa a conversão do radical superóxido O_2^- para produzir peróxido de hidrogênio, enquanto a catalase e glutaciona transformam o H_2O_2 em água (Bast *et al.*, 1991).

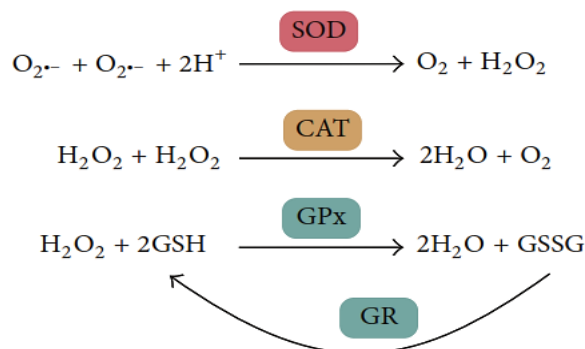


Figura 2. Mecanismo de ação do sistema antioxidante. SOD superóxido dismutase; CAT catalase; GPx glutatona peroxidase; GR glutatona redutase; GSH glutatona reduzida; GSSG glutatona oxidada. Fonte: (Peng *et al.*, 2014).

Ao ser estimulado, o sistema antioxidante aumenta a regulação da transcrição e adesão a proteínas redox para unir-se ao mARN com um conseqüente aumento das enzimas antioxidantes assim como sua atividade, permitindo a adaptação e incentivo da reparação celular (Mandelker, 2011). Quando comparado com bovinos, a atividade das enzimas antioxidantes de búfalos é menor quando o sêmen é submetido ao resfriamento. Com o passar do tempo de armazenamento do sêmen bubalino, a atividade enzimática diminui levando a um aumento do estresse oxidativo e maior peroxidação lipídica (Nair *et al.*, 2006). Do mesmo modo, Kardivel *et al.*, (2014) observou uma redução da atividade enzimática antioxidante quando o sêmen de búfalo foi sometido ao congelamento (Tabela 1).

Tabela 1. Média (\pm DP) de parâmetros seminais e valores de enzimas antioxidantes intracelulares de espermatozoide de búfalos.

Parâmetro	Valores sêmen fresco	Valores após descongelamento
Motilidade (%)	81,4 \pm 2,4	56,7 \pm 4,8
Espermatozoides vivos (%)	88,4 \pm 0,7	59,6 \pm 4,2
LPO (nmol MDA/10 ⁹ espermatozoides)	278,7 \pm 18,3	364,6 \pm 22,4
SOD (U/10 ⁹ espermatozoides)	23,3 \pm 0,7	11,7 \pm 0,8
CAT (U/10 ⁹ espermatozoides)	0,8 \pm 0,01	0
GPx (U/10 ⁹ espermatozoides)	9477,3 \pm 24,8	5276,4 \pm 18,3
GSH (nmole MDA/10 ⁹ espermatozoides)	23,4 \pm 0,9	15,3 \pm 0,4

LPO peroxidação lipídica; MDA malonaldeído; SOD superóxido dismutase; CAT catalase; GPx glutatona peroxidase; GSH glutatona reduzida; Fonte: (Kadirvel *et al.*, 2014).

Nas células somáticas existe um gene capaz de regular as enzimas antioxidantes para controlar e diminuir o estresse oxidativo chamado fator 2 relacionado ao fator nuclear E2 (Nrf2 ou NFE2L2). Este gene é um fator de transcrição que se liga a elementos de resposta de antioxidantes (ARE), induzindo transcrição de diversas proteínas antioxidantes como a NADPH quinona oxidoreductase 1 e proteínas que regulam a síntese de Glutaciona (Vomhof-Dekrey e Picklo, 2012). A expressão ou produção de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, quemoquinas, células de adesão molecular, metaloproteínas, ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintetase) pode ser inibida pelo Nrf2, junto com os ARE (Kim *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2017).

Nos espermatozoides, tem se comprovado a presença de NADPH oxidase: NOX5 e NOX2 (Shukla *et al.*, 2005; Sabeur e Ball, 2007) assim como o gene indutor de interleucina (IL4I1) e L aminoácido oxidase que são formadoras de ERO, suas respostas podem ser inibidas pela enzima catalase (Houston *et al.*, 2015). Ainda cabe saber si o Nrf2 teria presença e atuação no espermatozoide.

3.4. ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes não enzimáticos são aqueles antioxidantes sintéticos ou suplementos alimentares que tem influência sobre o sistema antioxidante: SOD, CAT, GPx e GR, melhorando o processo de criopreservação ao beneficiar a proteção espermática contra os efeitos das ERO (Amrit Kaur e Bilaspuri, 2011; Kadirvel *et al.*, 2014) e o estresse oxidativo (Shahidi, 2015).

Antioxidantes não enzimáticos como o ácido úrico, espermina, taurina, triptofano, vitamina C, albumina também se encontram presentes no plasma seminal e são gerados no trato reprodutivo (Rhemrev *et al.*, 2000; Amrit Kaur e Bilaspuri, 2011).

Os antioxidantes não enzimáticos de origem vegetal pertencem à classe de compostos fenóis e polifenóis (Shahidi, 2015). Dentro dos polifenóis encontram-se os flavonoides que incluem as flavonas, flavonóis, flavanonas, catequinas, antocianinas, antocianidinas e isoflavonas (Mueen Ahmed e Baral, 2011). Um composto fenólico possui atividade antioxidante quando em baixas concentrações impede, retarda e previne a auto-oxidação ou oxidação mediada pelas ERO e ERN, além de possuir estabilidade na sua molécula após feita a reação (Rice-Evans *et al.*, 1996). Sua atividade antioxidante depende das características das moléculas estruturais que tem a habilidade de doar um íon hidrogênio aos radicais peróxidos gerados como resultado da peroxidação lipídica (Shahidi, 2015). A inibição da oxidação lipídica por parte dos polifenóis se dá mediante vários mecanismos: quelação dos íons de cobre, quebra das cadeias mediante a doação de hidrogênio, captura dos radicais peroxil e alcoxil, e regeneração do α -tocoferol mediante a redução do radical tocoperoxil (Rice-Evans *et al.*, 1996)

Os antioxidantes de origem vegetal podem atuar de maneira positiva (antioxidante) ou negativa (pró-oxidante) sendo que: a) as suas respostas são dose-dependentes, b) os compostos isolados perdem a ação sinérgica de outras substâncias, c) a eficiência farmacológica depende das características vegetais e dos animais testados e d) a ação depende da presença de diferentes estruturas químicas (Zhong e Zhou, 2013).

Os antioxidantes de origem vegetal podem interferir na espermatogênese, funções espermáticas, ciclos estrais, funções ováricas, ovulação, desenvolvimento embrionário e gestação (Zhong e Zhou, 2013). Vários estudos têm demonstrado a atividade benéfica sobre a qualidade espermática quando antioxidantes não enzimáticos são adicionados ao meio diluidor de sêmen bovino (O'flaherty *et al.*, 1997), equino (Almeida e Ball, 2005), canino (Michael *et al.*, 2007), caprino (Bucak *et al.*, 2010), suíno (Luño *et al.*, 2014; Allai *et al.*, 2015), ovino (Baghshahi *et al.*, 2014); e quando suplementados na dieta de suíno (Liu *et al.*, 2015), coelho (Castellini *et al.*, 2000), humano (Ross *et al.*, 2010) e equino (Kheradmand Garmsir *et al.*, 2014). No entanto, ainda não há estudos sobre as concentrações e possíveis efeitos que as substâncias com poder antioxidante como a *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde podem ter quando adicionados a meios diluidores de sêmen na espécie bubalina.

3.4.1. *Aniba canelilla*

A família *Laureaceae* compreende a subdivisão taxonômica do gênero *Aniba*, com 41 espécies reconhecidas, onde se encontra *Aniba canelilla* (Gottlieb e Kubitzki, 1981), árvore endêmica da Amazônia que é localmente conhecida como casca preciosa (Da Silva *et al.*, 2007).

A característica química do gênero *Aniba* se baseia na exclusiva e mútua presença de neoglicanos, benzofenonas, pironas, flavonoides e alilfenol (Gottlieb, 1972; Gottlieb e Kubitzki, 1981). Perfis cromatográficos da espécie, exibem presença de alcaloides, saponinas, esteroides, taninos, triterpenos, açúcares, proteínas e vários aminoácidos. Estudos mostram que o óleo essencial de folhas e galhos de *A. canelilla* contém 1-nitro-2-feniletano, metileugenol e eugenol, como principais compostos da espécie (Figura 3). A proporção de cada uma destas substâncias na composição final de *Aniba canelilla* varia em função da sazão, sendo que pode atingir valores próximos a 95% de 1-nitro-2-feniletano e 18% de metileugenol durante a época chuvosa, enquanto que os valores chegam a 39% e 45% na época seca, respectivamente (Taveira *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2009).

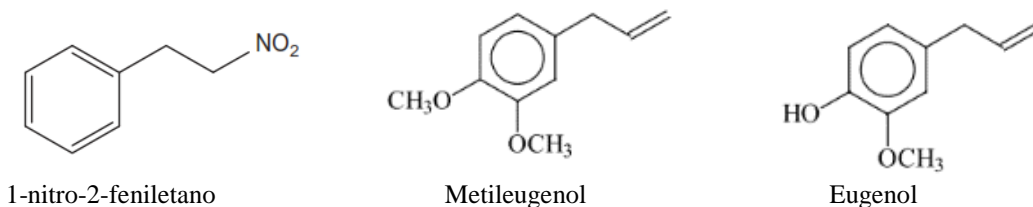


Figura 3. Estrutura química dos principais componentes de *Aniba canelilla*. Fonte: (Silva, 2012).

A capacidade e eficiência antioxidante de *Aniba canelilla* é atribuída à presença dos alcaloides benziltetrahydroisoquinolina e tetrahydroprotoberberina, assim como os grupos N-H e hidroxil fenóis (Oger *et al.*, 1993; Da Silva *et al.*, 2007). Os alcaloides com presença de grupos OH possuem uma alta atividade antiradical e alta lipofilicidade ao atuar como doadores de hidrogênio, função similar à dos antioxidantes fenólicos (Rackova *et al.*, 2004). Os alcaloides produzem inibição da peroxidação lipídica microsomal, também são potentes inibidores do nitroazul de tetrazólio (NBT), um composto formador de superóxido e indicador da reação redox (Ubeda *et al.*, 1993). Vários estudos de avaliações fitoquímicas demonstraram a atividade antioxidante dos extratos de folhas e madeira de *A. canelilla*, avaliando a capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), concentração efetiva (CE50) que é a concentração de amostra necessária para o sequestro de 50% dos radicais livres, e a quantificação de fenóis totais (TP). Os resultados achados destes testes indicaram que *Aniba canelilla* tem uma alta atividade antioxidante (Da Silva *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Silva, 2012). Também foi demonstrado que o extrato de *A. canelilla* é muito estável à oxidação devido a dois fatores, o primeiro, a sua capacidade de doar radicais hidrogênios para a redução de DPPH e o segundo, por deslocalizar o radical DPPH para sua estrutura (Silva, 2012). Mediante o estudo da estrutura conformacional da molécula 1-nitro-2-feniletano, foi observado que este componente pode adotar diferentes conformações variando o ângulo diedro entre os grupos nitro e fenil unidos aos átomos de carbono C₁-C₂. Conferindo maior estabilidade ao composto, e que está relacionado com as atividades biológicas de 1-nitro-2-feniletano (Vale *et al.*, 2013). O 1-nitro-2-feniletano também é capaz de inibir nas células somáticas a síntese e liberação de desencadeantes de respostas antiinflamatórias como bradiquidinas, substância P, prostaglandinas, citoquinas, histamina e serotonina (De Lima *et al.*, 2009; Vale *et al.*, 2013).

Além do poder antioxidante, *Aniba canelilla* possui atividades biológicas de alto valor farmacêutico e terapêutico, que inclui: efeito antiviral, antibacteriano, fungicida, antiespasmódico, antipirético, antitumoral, citotóxico, estimulante do sistema nervoso central, anticonvulsivante, antinociceptivo, antiinflamatório, antiedematogênico, efeitos cardiovasculares como hipotensão, bradicardia e vasorelaxante (Oger *et al.*, 1994; Da Silva *et al.*, 2007; De Lima *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Vale *et al.*, 2013; Arruda-Barbosa *et al.*, 2014; Oliveira-Filho *et al.*, 2015). No entanto, *A. canelilla* não tem sido testada como aditivo a meios diluidores de sêmen, procurando explorar sua ação antioxidante, entre outras.

3.4.2. Blueberry

Arbustos com frutos silvestres ou frutos vermelhos comestíveis abrangem a espécie blueberry com nome científico *Vaccinium sp.*, que pertence ao gênero *Cyanococcus*, família *Ericaceae*; o blueberry possui principalmente três variedades agrupadas pelo tamanho do arbusto lowbush, highbush e rabbiteye (Rowland e Hammerschlag, 2005).

Blueberry tem vários compostos com propriedades antioxidantes. As análises do perfil fitoquímico relatam a presença de compostos fenólicos (Figura 4), onde se encontram flavonoides, flavonóis (kaempferol, quercetina, miricetina), antocianinas (cianidina, malvidina, peonidina, petunidina, delphinidina), ácidos fenólicos abrangendo os ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico), ácido hidroxibenzoico, ácido elágico e ácido gálico (Törrönen *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2017).

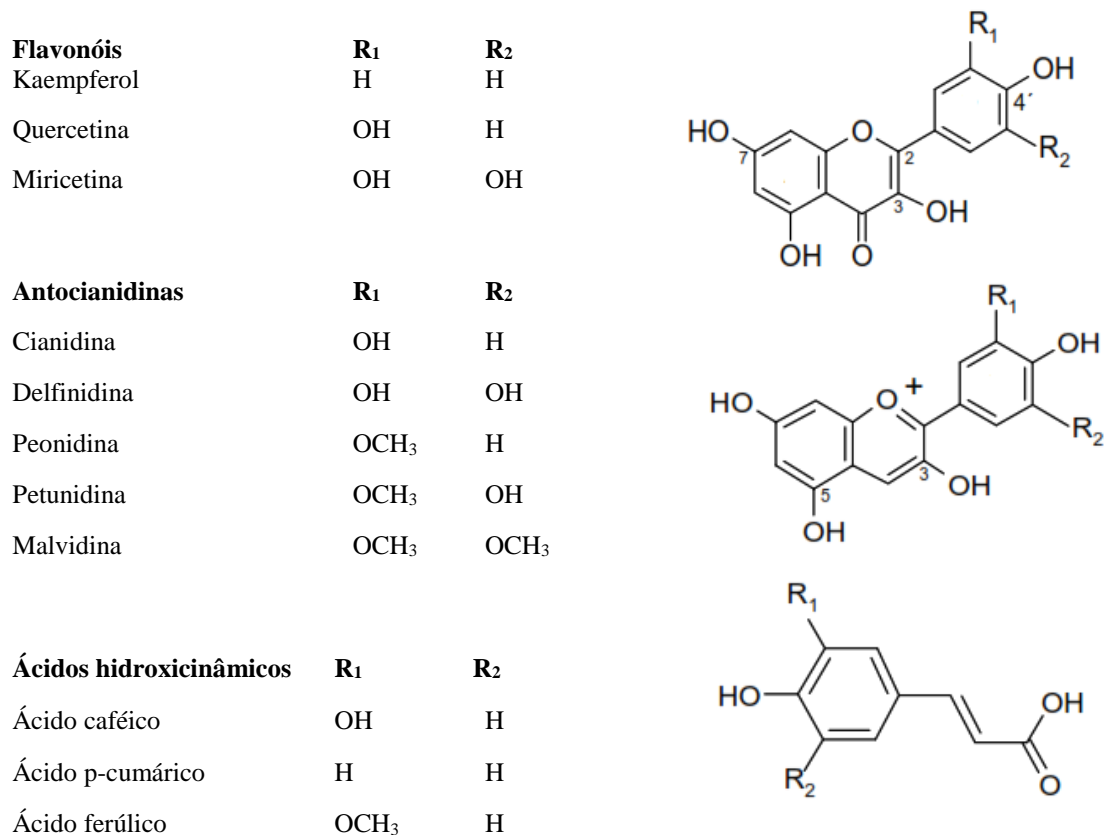


Figura 4. Estrutura química dos principais componentes blueberry. Fonte: (Riihinen *et al.*, 2008).

As quantidades destes compostos são influenciadas pela maturidade da fruta, sendo que no amadurecimento ocorre o aumento do nível de antocianinas e diminuem os conteúdos de flavonoides e compostos fenólicos (Kalt *et al.*, 2003; Castrejón *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2014; Eichholz *et al.*, 2015). Antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos também se encontram em diferentes percentagens nas folhas, galhos e rizomas da planta de blueberry (Riihinen *et al.*, 2008). Os valores totais das antocianinas e compostos fenólicos também variam segundo a genética da planta, ambiente, época e número de colheitas (Castrejón *et al.*, 2008; Pertuzatti *et al.*, 2014). As antocianinas apresentam menos potencial antioxidante que outros compostos fenólicos como os flavonóis ou ácidos hidroxicinâmicos, que diminuem à medida que amadurecem os frutos de blueberry (Castrejón *et al.*, 2008). Ainda assim os principais componentes do blueberry são as antocianinas, que são estáveis a temperaturas menores a 60 °C e em pH ácido. As antocianinas se encontram em forma glicosilada, esta forma confere maior solubilidade e protegem as antocianinas da degradação oxidativa (Reque *et al.*, 2014; Siddiq e Dolan, 2017; Wang *et al.*, 2017). Vinte e duas espécies de antocianinas com considerável atividade antioxidante têm sido reportadas em extratos de blueberry (Borges *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017).

Análises feitas com extratos de blueberry exibiram resultados elevados na atividade celular antioxidante, capacidade sequestradora de radicais livres, capacidade redutora e capacidade para absorver o radical oxigênio, apontando que o blueberry possui uma atividade antioxidante elevada (Wolfe *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2014; Pertuzatti *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). Segundo estudos *in vitro*, os principais componentes que contribuem na atividade antioxidante são o ácido ferúlico e as antocianinas (Wang *et al.*, 2017). Os compostos do blueberry desempenham sua ação antioxidante mediante diversos mecanismos. Se base que nas células somáticas o gene Nrf2 é regulado positivamente quando ativado pelo blueberry (Pomari *et al.*, 2014). Compostos fenólicos inibem a transcrição de fatores redox-sensitivos como o fator κ B (NF κ B), fator ativador da proteína 1 (AP-1); inibição de enzimas pró-oxidantes, como as enzimas oxido nítrico sintetase, lipogenases, ciclooxigenases e xantina oxidase, e também podem atuar junto com as enzimas do sistema antioxidante (Zepeda *et al.*, 2012; Pomari *et al.*, 2014; Nardi *et al.*, 2016). Borges *et al.* (2010) atribuíram 84% da atividade antioxidante às antocianinas enquanto os flavonóis atingiram 14%. O alto conteúdo de compostos fenólicos achados no blueberry atuam como antioxidantes nas células somáticas, e diminuem a produção dos radicais oxigênio e peróxido. Devido aos baixos níveis de ERO por efeito do blueberry, as enzimas antioxidantes catalase, SOD e GSH diminuíram significativamente sua atividade (Kim *et al.*, 2013; Nardi *et al.*, 2016), similares respostas têm sido obtidas por outros autores (Zepeda *et al.*, 2012; Azab *et al.*, 2014). Cabe ainda saber qual seria o mecanismo de ação nos espermatozoides.

Blueberry possui amplas perspectivas de uso terapêutico, que incluem tratamentos cardiovasculares, oculares, antiinflamatórios, degenerativos, antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, prevenção do câncer, melhoramento cognitivo e neuronal nas funções cerebrais e proteção da integridade do DNA (Smith *et al.*, 2000; Zafra-Stone *et al.*, 2007; Pervin *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014; Nardi *et al.*, 2016). Segundo pesquisas realizadas, ao usar uma mistura de várias espécies de frutos vermelhos, entre elas blueberry, cranberry, amora e morango o efeito mostrou ser mais seguro e eficaz. Isto foi devido ao sinergismo e potencialização dos efeitos antioxidantes e terapêuticos assim como a sua biodisponibilidade quando comparado ao uso de extratos de uma espécie só (Bagchi *et al.*, 2004; Bagchi *et al.*, 2006; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Estudos realizados com extratos de blueberry, uva e morango adicionados na dieta basal de camundongos conseguiram reverter os efeitos genotóxicos produzidos pela acrilamida, enquanto aos parâmetros espermáticos conseguiu-se recuperar os parâmetros normais da concentração espermática, atividade e motilidade espermática, e morfologia (Zhao *et al.*, 2015).

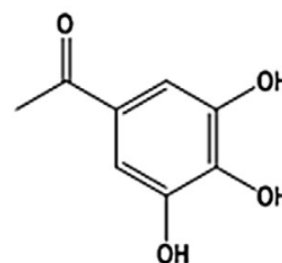
Do mesmo modo extratos de blueberry administrados de forma oral protegeram tecidos ovarianos e a viabilidade dos folículos ao impedir o aumento de ERO após a administração de cádmio em camundongos (Izaguirry *et al.*, 2015). A inclusão de 1% blueberry na dieta basal do salvelino ártico (*Salvelinus alpinus*) diminuiu a taxa de peroxidação lipídica no sêmen e incrementou as enzimas catalase no plasma seminal, fato observado quando também foi adicionado 0,2% de α -tocoferol na dieta dos peixes (Mansour *et al.*, 2006). Na revisão de literatura não foi achado o uso do blueberry para conservação de sêmen bubalino e outras espécies domésticas a exceção de um trabalho com sêmen refrigerado de suíno (Desroches *et al.*, 2005) e sêmen congelado de canino (Deppe *et al.*, 2016).

3.4.3. Polifenol de chá verde

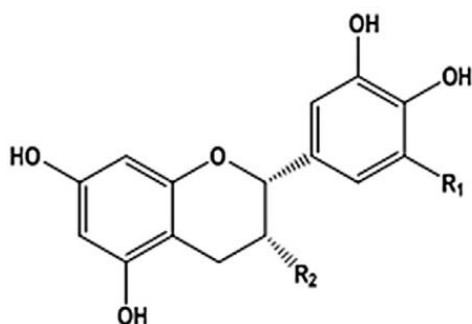
Camellia sinensis é comumente chamada planta de chá, dá origem a variedades de chá que variam nas características químicas e organolépticas, que dependem da época da colheita das folhas e do modo de processamento. O processamento do chá verde inicia com a coleta de folhas frescas, desidratação, cocção ao vapor ou na frigideira, enrolamento e secado de folhas. Este procedimento impede a oxidação dos polifenóis existentes e que compõem um terço da matéria seca das folhas (Frei e Higdon, 2003; Landau *et al.*, 2006; Bruno *et al.*, 2014).

Os componentes do polifenol de chá verde se caracterizam por ter vários grupos hidroxilo no anel aromático (Landau *et al.*, 2006). Seus principais compostos são as catequinas (Figura 5), que abrangem as epicatequina (EC), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina (EGC), epigalocatequina galato (EGCG), catequina (C), catequina galato (CG), galocatequina (GC) e galocatequina galato (GCG) (Mueen Ahmed e Baral, 2011). Destes a EGCG é o composto com 50% do conteúdo total das catequinas, sendo o mais eficaz nas propriedades antioxidantes (Salah *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2011; Bruno *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014)

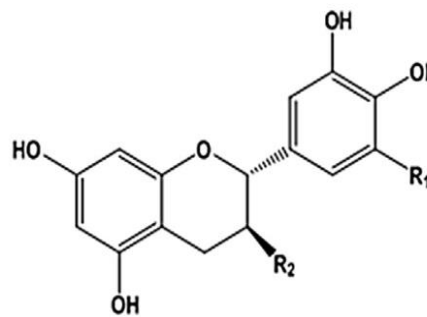
	R ₁	R ₂
Epicatequina (EC)	H	H
Epicatequina galato (ECG)	H	galato
Epigalocatequina (EGC)	OH	H
Epigalocatequina galato (EGCG)	OH	galato
Catequina (C)	H	H
Catequina galato (CG)	H	galato
Galocatequina (GC)	OH	H
Galocatequina galato (GCG)	OH	galato



Galato



Epicatequinas



Catequinas

Figura 5. Estrutura química dos principais componentes do polifenol de chá verde. Fonte: (Bruno *et al.*, 2014).

O polifenol de chá verde é composto por várias catequinas, que podem conferir uma atividade antioxidante similar ao α -tocoferol. Estas catequinas exercem sua função antioxidante mediante a quelação e redução de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio (Chen *et al.*, 2003; Bruno *et al.*, 2014). Os polifenóis do chá verde desempenham sua ação antioxidante mediante diversos mecanismos, entre outros, atuam positivamente ativando o Nrf2 nas células somáticas (Shen *et al.*, 2005; Pomari *et al.*, 2014). Os mecanismos de indução ou supressão dependentes do gene Nrf2 pelas catequinas não é unicamente dependente dos efeitos diretos do Nrf2, pois também dependem de reguladores de expressão gênica, como os fatores de transcrição, coativadores ou correpressores do complexo de ativação transcricional Nrf2 (Shen *et al.*, 2005).

As EGCG e outras catequinas que formam parte do polifenol de chá verde inibem a transcrição de fatores redox-sensíveis como o NF κ B e AP-1, mediante inibição das MAP quinase (Frei e Higdon, 2003; Landau *et al.*, 2006; Pomari *et al.*, 2014). Outra via é através da inibição de enzimas pró-oxidantes, como oxido nítrico sintetase, lipogêneses, ciclooxigenases e xantina oxidase. Além disso o polifenol de chá verde pode atuar induzindo as enzimas antioxidantes glutatona S transferase, superóxido dismutase (Frei e Higdon, 2003; Pomari *et al.*, 2014). As catequinas do chá verde possuem elevada ação contra as ERO, diminuem a peroxidação lipídica, incrementam a viabilidade celular e melhoram o potencial da membrana mitocondrial (Chen *et al.*, 2003).

Devido a suas propriedades o polifenol de chá verde tem vastos usos terapêuticos que incluem tratamentos antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatórios, cardiovasculares, lipídicos e diabetes (Singh *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014). O polifenol de chá verde tem sido testado especificamente na área de reprodução em diversos trabalhos como na produção *in vitro* de embriões bovinos durante a fase de maturação *in vitro* de oócitos (Wang *et al.*, 2007). Efeito protetor dos parâmetros espermáticos e mudanças histopatológicas no testículo em ratos tratados com metotrexato (Daham e Al-Hilfi, 2010). Existem relatos de sua adição ao sêmen com resultados contraditórios (Gale *et al.*, 2015; Aitken *et al.*, 2016). O polifenol de chá verde tem sido testado em sêmen resfriado de cães a 5°C durante 4 semanas, mostrando que a adição de 0,75mg/ml de polifenol de chá verde junto com vitamina C (0,5 mM) ao meio diluidor Tris-leite desnatado trouxe benefícios na motilidade e viabilidade espermática, mas sem melhoras na integridade da membrana plasmática e integridade acrossomal (Wittayarat *et al.*, 2012). O sêmen congelado de touros Sahiwal indica que a motilidade, viabilidade e integridade da membrana plasmática foi significativamente superior quando 0,25% e 0,5% (0,05 e 0,1 μ g/ml respectivamente) de extrato de chá verde foi adicionado ao meio diluidor tris-ácido cítrico-gema de ovo (Ali *et al.*, 2014). Em sêmen congelado de carneiro a adição de 10 μ g/ml de extrato de *Camellia sinensis* no meio tris - ácido cítrico – lecitina de soja gerou melhoria na qualidade do sêmen descongelado. A motilidade progressiva, atividade mitocondrial, viabilidade espermática e integridade de membrana foram superiores aos outros tratamentos testados (controle, 5 e 15 μ g/ml de extrato *C. sinensis*). A capacidade total antioxidante após descongelamento também se mostrou superior (Mehdipour *et al.*, 2016). Não obstante, não foram encontrados na revisão de literatura relatos do uso de polifenol de chá verde na criopreservação de sêmen de búfalos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O Experimento foi aprovado no conselho de ética sob protocolo de número CEUA-UFGM n°357/2015. Foi realizado nas dependências da Escola de Veterinária da Universidade Federal de

Minas Gerais (EV/UFMG) no Núcleo de Biotecnologia em Bubalinocultura – Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo e na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Belo Horizonte, MG, Brasil, no laboratório de citometria de fluxo.

4.2. ELABORAÇÃO DE MEIOS DILUIDORES

4.2.1. Extração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) a partir da gema de ovo de galinha

A lipoproteína de baixa densidade, constituinte do meio diluidor base, foi extraída e produzida conforme os procedimentos previamente descritos e padronizados (Moussa *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2014). Foram utilizados unicamente ovos de galinha frescos com menos de 24 horas após a postura. Uma vez higienizados, os ovos foram quebrados manualmente separando o albúmen. A gema foi colocada em um papel filtro para remoção da chalaza e o restante do albúmen. A gema foi recuperada com uma seringa perfurando-se a membrana vitelina. O processo foi repetido até obter o volume desejado o qual foi imediatamente diluído em uma relação 1:2 em solução salina (0,17M NaCl). A solução ficou sob agitação e refrigeração a 4°C durante uma hora. Na sequência, a solução foi centrifugada a 11.400g, por 75 min a 4°C. O precipitado foi descartado e o plasma da gema foi centrifugado novamente nas condições anteriormente citadas.

O pH do plasma obtido na segunda centrifugação foi ajustado para 8,7 mediante a adição de 0,1N NaOH. Posteriormente foi adicionado sulfato de amônio (Sigma Aldrich®) até formar uma solução saturada a 40%. O sulfato de amônio foi adicionado gradativamente, evitando a formação de partículas brancas no fundo do recipiente, ficando sob agitação por 1h, a 4°C. Na sequência a solução foi novamente centrifugada a 11.400g por 75min. O precipitado de sulfato de amônio conjugado às livetinas foi descartado. O plasma sobrenadante foi envasado em membranas de diálise (Spectrum Laboratories®), ficando sob diálise em água destilada a 4°C sob agitação constante durante dois dias. A água destilada foi substituída três vezes ao dia. No final do processo a solução foi levada a centrifugação a 11.400g por 75min a 4°C. O sobrenadante correspondendo a LDL foi retirado evitando-se a contaminação com a porção líquida. A LDL foi envasada e congelada até ser utilizada na elaboração dos meios diluidores (Snoeck *et al.*, 2017).

4.2.2. Elaboração do meio à base tris 10% LDL

Usou-se como meio base Tris - 10% LDL (Brito, 2014) modificado que contém: tris (2,42 g), ácido cítrico (1,36 g), frutose (1g), equex (0,4%), lipoproteína de baixa densidade (10%), amicacina (83,4µg/ml) e Água Milli-Q® (q.s.p. 100 ml). Todos os reagentes usados foram da marca Sigma-Aldrich®.

4.2.3. Determinação de antioxidantes não enzimáticos e suas concentrações no meio à base tris 10% LDL

A escolha de *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde com suas respectivas concentrações no meio à base tris 10% LDL, foram baseadas em testes prévios realizados em carneiros, tabela 2. Quatorze antioxidantes em três concentrações foram pré-testados em ejaculados de carneiros para avaliar os efeitos dos antioxidantes não enzimáticos sobre uma possível toxicidade espermática. Também foi avaliada a motilidade e cinética espermática mediante o sistema computadorizado de análise de sêmen CASA. Os antioxidantes com suas diferentes concentrações foram adicionados ao meio à base tris 10% LDL, sendo este último o

controle. O sêmen após diluição foi incubado durante 36 horas a 37°C e as avaliações foram realizadas a cada 6 horas.

Tabela 2. Antioxidantes não enzimáticos e concentrações adicionadas ao meio à base tris 10% LDL.

Antioxidante não enzimático	Concentração	
Acetilcarnitina	1 - 10 - 100	mM/ml
Acetilcisteína	0,5 - 50 - 500	µM/ml
Ácido gálico	240 - 2400 - 4800	µg/ml
Aniba canelilla	0,5 - 5 - 50	µg/ml
Astaxantina	2 - 200 - 2000	µM/ml
Blueberry	10 - 50 - 100	µg/ml
Carvacrol	1,5 - 15 - 150	µg/ml
Curcumina	2,5 - 250 - 2500	µM/ml
Lippia organoides	100 - 1000 - 1200	µg/ml
Lipoato	10 -100 -1000	µM/ml
Metformida	5 - 500 - 5000	µM/ml
Palmitato de ascorbila	2 - 200 - 2000	µM/ml
Polifenol de chá verde	0,05 - 5 - 50	µg/ml
Timol	1,5 - 15 - 150	µM/ml

4.2.3.1 Aniba canelilla

Não foi encontrado na revisão de literatura qualquer referência do uso da *Aniba canelilla* como antioxidante em meios diluidores para sêmen em nenhuma espécie animal, sendo este o primeiro trabalho realizado no processamento de sêmen resfriado, particularmente na espécie bubalina.

Devido à falta de literatura específica, a definição das concentrações de *A. canelilla* no meio diluidor de sêmen se basearam a partir de pesquisas realizadas para determinar sua citotoxicidade frente à *Artemia salina*, que é um micro crustáceo marinho comumente utilizado em bioensaios. A concentração letal 50 (LC50) do óleo essencial foi de 21,60±1,21 µg/ml sugerindo uma alta toxicidade (Da Silva *et al.*, 2007). As concentrações a serem usadas foram 0,5; 5 e 50 µg/ml do óleo essencial de *Aniba canelilla* no meio à base tris 10% LDL. A composição do óleo essencial usado nos experimentos está apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Composição química do óleo essencial das cascas de *Aniba canelilla*, empregado na elaboração dos meios diluidores Tris 10% LDL + *Aniba canelilla* 0,5, 5 e 50 µg/ml

Componente	IR	Concentração (%)
Mirceno	989	0,1
(E)-β-Ocimeno	1050	1,2
<i>trans-p</i> -ment-en-1-ol	1141	0,3
1-nitro-feniletano	1327	90,3
Eugenol	1358	1,7
Metileugenol	1403	2,0
Selin-11-en-4-α-ol	1660	3,5

IR: índice de retenção. Obtido mediante cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas cromatografia gasosa. Fonte: Joyce Kelly do R. da Silva, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará.

A) Pré-teste: meios diluidores controle para a *Aniba canelilla*

Para a comparação das diferentes concentrações de *Aniba canelilla* usou-se dois meios diluidores controles, devido a necessidade de dissolver o óleo essencial de *Aniba canelilla* em DMSO. Para testar o efeito do DMSO puro sobre a qualidade espermática, realizou-se previamente, um teste acrescentando-se DMSO em três concentrações: 0,1, 0,5 e 5% ao meio diluidor tris 10% LDL (controle) em sêmen de búfalo resfriado a 5°C durante 72 horas.

Foi observado que a adição de DMSO 0,1% e 5% ao diluidor Tris 10% LDL modificou os parâmetros linearidade e frequência de batimento flagelar cruzado, enquanto a progressividade foi superior em todas as concentrações de DMSO quando comparado com o meio controle em sêmen resfriado de búfalo a 5°C até às 48 horas de resfriamento. (Becerra *et al.*, 2017). A quantidade de DMSO utilizada neste trabalho foi de 0,5% equivalente à maior concentração usada de *Aniba canelilla* no meio diluidor.

4.2.3.2 Blueberry

Segundo a revisão de literatura, este é o primeiro trabalho realizado testando blueberry no processamento de sêmen de búfalo. O uso de blueberry foi descrito como antioxidante em sêmen refrigerado de suíno e sêmen congelado de caninos (Desroches *et al.*, 2005; Deppe *et al.*, 2016). Em outro trabalho, foi adicionado 0,1% de blueberry na dieta do peixe salvelino ártico para diminuir a peroxidação lipídica no sêmen (Mansour *et al.*, 2006).

As concentrações de 10, 50 e 100 µg de blueberry/ml em meio à base tris 10% LDL no experimento foram definidas segundo o estudo feito com sêmen resfriado de suíno a 5 e 16 °C em meio BTS ou X-Cell, a suplementação de extratos da fruta e folhas de blueberry na proporção de 8% e de quercetina na concentração de 0,1mM permitiram atrasar a capacitação espermática durante uma semana e o extrato de blueberry 8% atrasou a capacitação durante 5 dias. A capacitação espermática ocorreu quando os espermatozoides foram desafiados à incubação *in vitro* a 39°C durante 10 minutos (Desroches *et al.*, 2005). No entanto, esse estudo não relata os efeitos que os antioxidantes adicionados tiveram sobre a motilidade espermática ou a membrana plasmática dos espermatozoides.

4.2.3.3 Polifenol de chá verde

O uso de Polifenol de chá verde nas concentrações de 0,05; 5 e 50 µg/ml adicionados ao meio à base tris 10% LDL foram baseadas em dois artigos achados na literatura com uso específico para criopreservação de sêmen. O primeiro usou 0,75mg/ml de polifenol de chá verde mais 0,5 ou 1 mM de vitamina C em meio diluidor tris leite desnatado para preservar sêmen de cão refrigerado a 4°C durante quatro semanas (Wittayarat *et al.*, 2012). O segundo experimento reportou a adição de extratos de chá verde em concentrações de 0,25 e 0,5% no meio tris ácido cítrico no congelamento de sêmen de touros Sahiwal (Ali *et al.*, 2014). Sendo assim este o primeiro experimento realizado em sêmen de búfalo.

Uma vez elegidos os antioxidantes de origem vegetal, o presente trabalho foi dividido em duas fases (Figura 6). Fase 1 – Teste de concentração de cada antioxidante. Avaliou-se três antioxidantes, cada um com três concentrações mais o meio diluidor controle (Tris 10% LDL). Fase 2 – Comparação entre antioxidantes. Usou-se a melhor concentração de cada antioxidante

mio diluidor, obtida na primeira fase, baseando-se em resultados de integridade funcional da membrana plasmática, motilidade e cinética espermática.

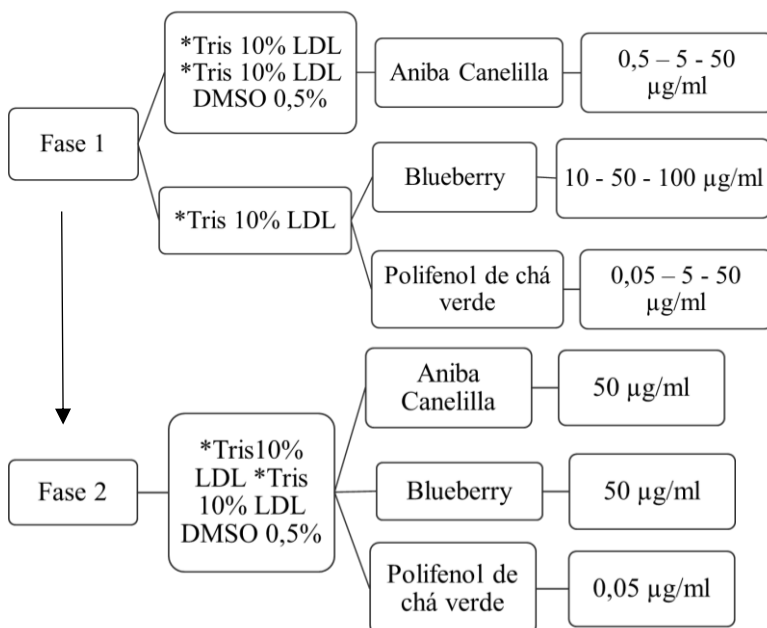


Figura 6. Organograma de meios diluidores empregados em sêmen refrigerado de búfalos. *Meio diluidor controle.

O óleo essencial de *Aniba canelilla* foi fornecido pelo Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará pela Professora Joyce Kelly. Os extratos blueberry e polifenol de chá verde foram fornecidos por Giancarlo Nappi e Luis Heneine dos Laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias.

4.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram usados nove búfalos mestiços Murrah (*Bubalus bubalis*) localizados no Núcleo de Biotecnologia em Bubalinocultura – EV/UFMG, Pedro Leopoldo, MG. Os animais usados tinham atingido a maturidade sexual e a idade variou entre três a seis anos. Estes foram selecionados com base nos exames andrológico, clínico e mensuração da circunferência escrotal (Cbra, 2013; Henry *et al.*, 2013). Os animais foram mantidos sob iguais regimes de manejo e alimentação. As amostras de sêmen foram coletadas pelo método de vagina artificial convencional, com temperatura de 40 - 45°C utilizando como manequim uma fêmea bubalina não gestante para estimular a cópula. As coletas de sêmen foram precedidas da ocorrência de uma falsa monta (permissão de monta com desvio de pênis) antes de realizar a coleta de sêmen propriamente dita. As colheitas foram realizadas em todos os machos reprodutores uma vez por semana, por um período de quatro meses.

4.4. AVALIAÇÃO E PROCESSAMENTO SEMINAL

Após cada coleta, as amostras de sêmen foram avaliadas macroscopicamente quanto ao volume (ml), aspecto (aquoso, soroso, leitoso e cremoso), odor e cor (branco, amarelo). Análises microscópicas: turbilhonamento (0-5), motilidade individual progressiva (%), vigor (0-5) e

concentração espermática. Foram processados apenas ejaculados que apresentaram no mínimo 70% de motilidade total e no mínimo 600×10^6 espermatozoides/ml. A concentração espermática foi realizada usando o fator de diluição 1:200 (5 μ l de sêmen em 995 μ l de solução formol salina tamponada) seguida da contagem na câmara de Neubauer em microscópio óptico 400X (Cbra, 2013). A eficiência de cada antioxidante foi comparada usando-se o mesmo ejaculado de cada animal para eliminar o efeito ejaculado. As características do sêmen fresco de cada animal estão descritas na tabela 4. Observa-se que os ejaculados bubalinos foram adequados para ser processados e empregados nos testes do presente trabalho (Vale, 1994; Cbra, 2013).

Tabela 4. Características de ejaculados de búfalos coletados por vagina artificial.

Animal	Volume (ml)	Concentração (x106)	Turbilhão (1-5)	Motilidade subjetiva (%)	Vigor (1-5)	Normais (%)	Membrana funcional (%)	Acrossoma íntegro (%)
1	1,6	825	1	89	4	88	82	91
2	1,7	1488,8	3	87	4	84	84	82
3	2,1	787,5	2	76	2	82	80	97
4	1,8	1114,3	2	88	3	86	93	90
5	3,3	803,8	2	84	3	85	83	87
6	3,1	2270	4	81	3	87	87	74
7	1,2	1572,8	2	79	3	82	88	84
8	1,5	961,3	2	85	3	80	80	79
9	2,2	946,7	2	87	3	81	86	88
10	2	675	2	80	4	88	97	86
11	2	1490	1	75	3	82	90	76
Média (±)DP	2±0,6	1175,9±481,3	2,2±0,8	82,8±4,9	3,2±0,6	84±2,8	86±5,4	85±6,8

Normais: espermatozoides sem anormalidades morfológicas.

Os ejaculados de cada animal foram diluídos nos meios diluidores até uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Cada amostra de sêmen diluído foi acondicionada e envasada em nove palhetas de 0,25ml. Durante o processo de resfriamento, usou-se uma curva de resfriamento de - 0,25°C/min até 5°C. Após o resfriamento as amostras foram mantidas a temperatura estável de 5°C empregando-se um balcão frigorífico. Posteriormente as amostras foram avaliadas segundo a metodologia de avaliação que se descreve nos itens subsequentes (Figura 7).

4.5. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO SEMINAL.

4.5.1. Morfologia espermática

Foram coletadas amostras de cada ejaculado. Cinquenta microlitros de sêmen foram fixados em 1ml de solução formol salina tamponada. A morfologia espermática foi feita em preparação úmida, colocando 5 μ l da solução entre lâmina e lamínula e foi avaliada por microscopia de contraste de fase 1000X, onde foi aceito como máximo o 30% de anormalidades espermáticas, contando-se 200 espermatozoides (Cbra, 2013). As anormalidades foram categorizadas em dois grupos, defeitos maiores e menores (Blom, 1973), tabela 5.

Tabela 5. Defeitos maiores e menores.

Defeitos maiores	Defeitos menores
Subdesenvolvido	Cabeça delgada, pequena normal; curta; larga; isolada normal.
Formas duplas	Perdas da membrana acrossômica
Defeitos no acrossoma knobbed*, defeito de diadema*	Implantação abaxial
Cabeça delgada na base; cabeça pequena anormal; cabeça isolada anormal; piriforme	Gota citoplasmática distal
Contorno anormal,	Cauda dobrada ou enrolada na parte distal
Gota citoplasmática proximal; pseudogota	
Defeitos na peça intermediária	
Cauda fortemente enrolada ou dobrada	

*Anormalidades de origem genético. Fonte: (Blom, 1973).

4.5.2. Motilidade espermática.

Cada amostra de sêmen foi analisada através do sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) - modelo Sperm Class Analyzer SCA[®]. Antes da avaliação as palhetas foram submersas em banho-maria durante 30 segundos a 37°C. Para padronização das leituras, o conteúdo das palhetas foi acondicionado em tubos eppendorf sendo incubadas a 37°C durante 5 minutos antes de sua leitura. As leituras das características de motilidade espermática foram realizadas usando-se uma alíquota de 5 µl colocadas em uma lâmina coberta com uma lamínula ambas pré-aquecidas a 37°C. Avaliou-se com objetiva de 10X, mantendo a lâmina a temperatura constante de 37°C. Cinco campos foram selecionados ao acaso, contendo cada um deles pelo menos 200 espermatozoides.

A motilidade total (MT %), motilidade progressiva (MP %), rápidos (RAP %), velocidade curvilínea (VCL µm/s), velocidade linear progressiva (VSL µm/s), linearidade (LIN %), velocidade média da trajetória (VAP µm/s), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF Hz) foram registrados pelo CASA. A escolha dos parâmetros espermáticos para análise baseou-se em estudos que apontaram uma maior correlação da fertilidade com as variáveis da cinética medida através do sistema CASA (Farrell *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2016a; Ahmed *et al.*, 2016b). As leituras pelo CASA foram realizadas na hora zero antes do resfriamento e a cada 24 horas após o resfriamento até a motilidade espermática total decrescer até 10%. O Setup do Sperm Class Analyzer SCA[®] v.4.0, utilizado para análise do sêmen de búfalos foi o seguinte:

- Área da partícula: 20 a 70 microns².
- VCL: 10 < SLOW < 25; >25 MEDIUM < 50; 50 < RAPID.
- Progressividade: > 70% STR.
- Circular: < 50% LIN.
- Pontos para o VAP: 5.
- Conectividade: 12

4.5.3. Integridade funcional da membrana plasmática

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada mediante teste hiposmótico (HO). Cinquenta microlitros de sêmen foram adicionados em 500 µl de solução frutose e citrato de sódio 100 mOsm/L (2,702g de frutose + 1,324g de citrato de sódio) incubado durante 30 minutos em banho-maria a 37°C e posteriormente fixado em 200µL de formol salina tamponada (Khan e Ijaz,

2008; Loaiza-Echeverri *et al.*, 2015). Foram analisados 200 espermatozoides pela microscopia de contraste de fase – X1000. Os espermatozoides reativos (com a presença de cauda enrolada) foram considerados como intactos e com membrana funcional. Os espermatozoides com cauda enrolada/dobrada achados na morfologia espermática realizada previamente em cada ejaculado, foram subtraídos da percentagem total do HO. As leituras foram realizadas às 0, 48 e 72 horas de resfriamento na primeira fase do experimento e às 0, 24 e 72 horas na segunda fase.

4.5.4. Integridade do acrossoma

Para estimar a integridade acrossomal, foi utilizado o teste de coloração pelo Giemsa 6% (Watson, 1975). O esfregaço foi feito em uma lâmina previamente aquecida a 37°C, empregando-se 5 µl de cada amostra de sêmen. Após a secagem da lâmina mantida em placa aquecedora a temperatura constante de 37°C, a mesma foi submersa durante 15 minutos em formol salina tamponada, seguido de repouso durante 15 minutos em água destilada. Posteriormente a lâmina foi corada usando solução Giemsa a 6% durante 45 minutos seguida de enxague com água destilada. Após a secagem no meio ambiente, os esfregaços foram avaliados em microscópio óptico, 1000X. Foram avaliados unicamente espermatozoides que possuíam toda sua estrutura, contabilizando-se 200 espermatozoides classificados nas seguintes categorias: acrossoma intacto, acrossoma lesado, acrossoma destacado. As análises da integridade acrossomal foram feitas às 0, 24 e 72 horas durante a segunda fase experimental.

4.5.5. Citometria de fluxo

As amostras de sêmen da segunda fase após 24 e 72 horas de resfriamento, foram analisadas no laboratório de citometria de fluxo da FIOCRUZ. No experimento, foi utilizado o citômetro de fluxo Becton-Dickinson modelo FACScan e o programa FlowJo versão 7.6.1 para indicar a integridade estrutural da membrana plasmática e o teste de integridade de cromatina para mostrar o índice de fragmentação de DNA.

A) Teste da integridade estrutural da membrana plasmática.

Foram utilizados os fluorocromos SYBR green e iodeto de propídeo PI. A coloração com iodeto de propídeo/PI marca o DNA em vermelho quando a membrana plasmática esta lesada (mortos). O SYBR marca o DNA em verde quando a membrana plasmática está íntegra (vivos) (Garner e Johnson, 1995).

A preparação das amostras seguiu os seguintes procedimentos: No início do processamento a amostra de sêmen foi aquecida em banho maria a 37°C durante 30 segundos. Cada amostra de sêmen foi diluída (1:12) em PBS (100 µl de sêmen; 1,1 ml de PBS) obtendo-se aproximadamente uma concentração de 4×10^6 spz/ml. A solução estoque de iodeto de propídeo tinha a seguinte formulação: 0,5mg de PI; 1 ml NaCl 1,5mM. Em 200 µl de sêmen diluído foi acrescentado 1 ml PBS mais 15 µl de uma solução de PI diluída a 1:50 (10 µl de PI solução estoque; 490 µl água Milli-Q®) e 5 µl de SYBR green 1:10 (5 µl de SYBR green; 45 µl PBS). A mistura foi incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente seguida da leitura no citômetro de fluxo.

B) Teste de integridade de cromatina.

Foi utilizado o fluorocromos acridine Orange (AO). As interpretações são: DNA integro (fita dupla) corado de verde fluorescente e o DNA com defeito (fita simples) corado de vermelho fluorescente (Evenson e Jost, 2000b). Os valores são reportados como Índice de Fragmentação

(IDF). Classificados como IDF baixo, médio e alto. Sendo o IDF total a somatória destes três últimos. O IDF indetectável corresponde ao DNA integro, sem lesão.

Inicialmente a amostra de sêmen foi aquecida em banho maria a 37°C durante 30 segundos. Em seguida foi diluído 8 µl de cada amostra de sêmen em 200 µl de meio 1 (4,380 g NaCl; 0,790 g Tris-HCl; 0,186g EDTA; em água 500 ml deionizada pH7,4) obtendo-se a concentração de 1 a 2 x10⁶ spz/ml. Posteriormente foi adicionado 400 µl do Meio 2 (1 ml de 2N de HCl; 2,19 g NaCl; 0,25 ml Triton X100; em 250 ml água deionizada pH 1,4). Após 30 segundos acrescentou-se 1.2 ml do Meio 3 (3,8869 g ácido cítrico; 8,9429 g NaHPO₄; 0,17 g M EDTA Disodium; 4,3850 g NaCl; água deionizada 500 ml pH 6,0). Imediatamente adicionar 10 µl de AO, concentração 1:100 (5 µl de AO estoque + 495 µl de água). A amostra foi avaliada 3 minutos após a adição do Meio 3.

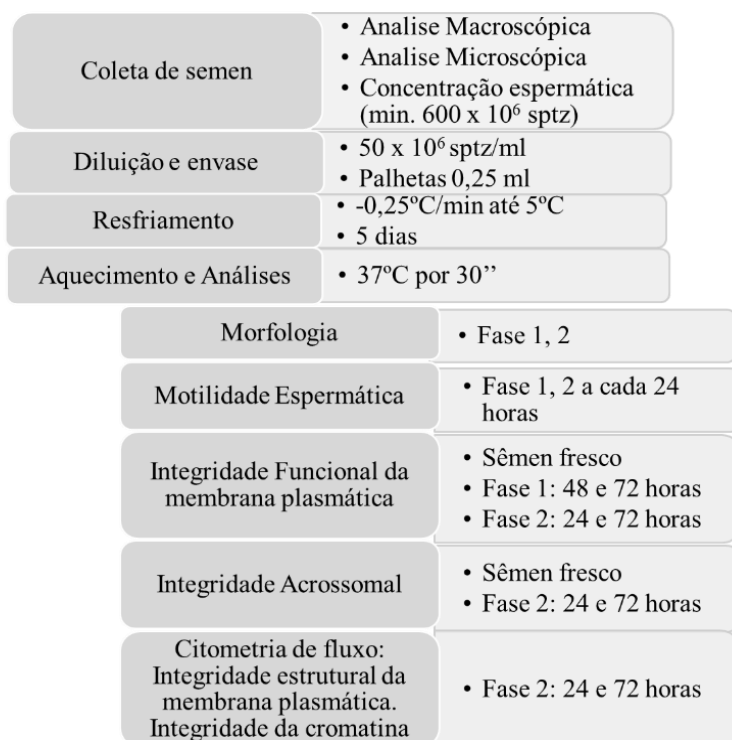


Figura 7. Organograma da avaliação e processamento seminal, e análises espermáticas realizadas.

4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre as médias dos resultados dos diversos parâmetros espermáticos avaliados e testes complementares analisados nortearam a avaliação do sucesso ou não dos tratamentos usados. O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso, considerando os búfalos como blocos (Sampaio, 1998). A caracterização do número amostral está representada na figura 8. Foram realizados os testes de normalidade cabíveis. Os dados foram avaliados pelo método dos quadrados mínimos, utilizando o pacote PROC MIXED do sistema Statistical Analysis System (SAS) - versão 6.12, considerando diluidor como efeito fixo e animal como efeito aleatório. Não foram realizadas comparações no tempo, pois é fato que a motilidade total e os parâmetros da cinética espermática decrescem com o decorrer do tempo. Fixou-se as horas de leitura e foram feitas as comparações entre diluidores da cinética em cada hora. Para as variáveis HO, integridade do acrossoma, integridade estrutural da membrana plasmática e integridade da cromatina também foram comparadas as diferenças entre às horas 24 e 72 para cada diluidor. A homocedasticidade

de variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett e teste de Levene. Quando necessário foi feita transformação dos dados para atender esta premissa. Para as variáveis que após transformação de dados ainda não atendiam a homocedasticidade de variâncias, utilizou-se o teste não paramétrico de Friedman, por meio do programa InfoStat - Statistical Software (2014). A significância estatística foi considerada quando $P \leq 0,05$.

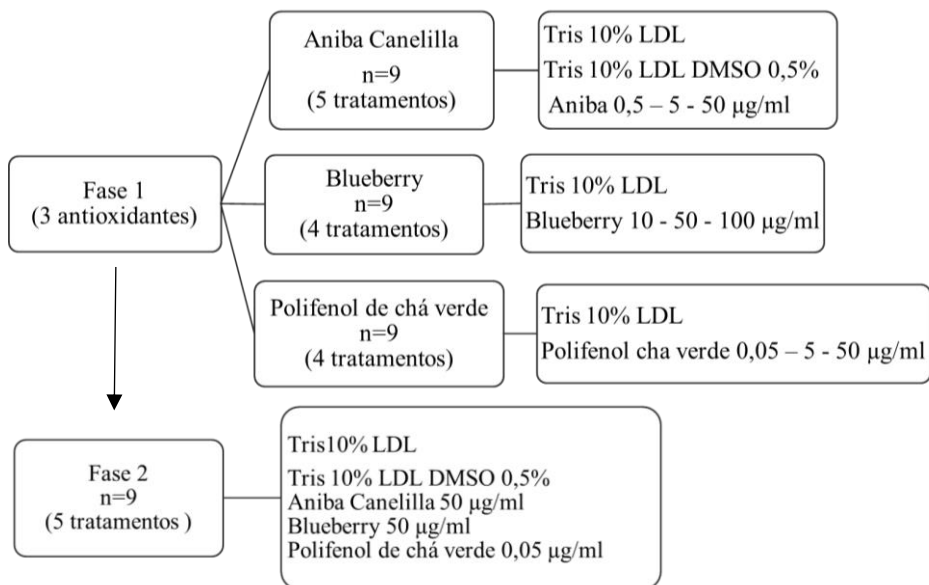


Figura 8. Organograma da caracterização do número amostral.

5. RESULTADOS

5.1. FASE 1 - TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES

5.1.1. Aniba canelilla

Os resultados do teste de três concentrações de *Aniba canelilla* adicionadas ao meio à base tris com 10% de LDL estão apresentados na figura 9 (Anexo 1, Tabela 17).

Os valores dos diferentes parâmetros da cinética dos espermatozoides que foram diluídos no diluidor que tinha *A. canelilla* foram significativamente superiores aos encontrados nos meios diluidores controle. A superioridade se apresentou na concentração de 50 µg/ml *Aniba canelilla* na motilidade total (24, 48, 72, 96 e 120 horas), motilidade progressiva (72 e 120 horas), espermatozoides rápidos (48 e 72 horas) velocidade curvilínea (24 e 72 horas), velocidade linear progressiva (72 horas), velocidade média da trajetória (72 horas), linearidade e batimento flagelar cruzado (0 e 120 horas de incubação).

A medida que a concentração de Aniba canelilla aumentou, pode se notar que os parâmetros cinéticos e a motilidade total a partir de 24 horas tiveram uma menor queda de valores. Havendo melhores valores na concentração de 50 µg/ml de *A. canelilla*. Apesar de não haver diferença significativa entre tratamentos a quantidade de amostras que mantiveram motilidade até às 120 horas de avaliação foi maior na concentração de 50 µg/ml de *A. canelilla*, seis de nove amostras com 17 ± 14 % de motilidade total média versus 4 amostras com ≤ 10 % de motilidade total nos tratamentos 0,5 e 5 µg/ml de *A. canelilla* assim como no controle DMSO. Enquanto o controle

Tris 10% LDL às 120 horas de incubação teve apenas 2 amostras com motilidade total menor que 10% (Tabela 6).

Tabela 6. Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5, 5 e 50 µg de *A. canelilla*/ml.

Amostras às 120 horas	Motilidade Total %	Diluidor	p. valor
6/9	17 %	Tris 10% LDL Aniba 50 µg/ml	0,0767
4/9	≤ 10 %	Tris 10% LDL Aniba 0,5 µg/ml	0,6814
		Tris 10% LDL Aniba 5 µg/ml	0,6814
		Tris 10% LDL DMSO 0,5%	0,3166
2/9	< 10 %	Tris 10% LDL	0,0767

Não houve diferença significativa entre tratamentos ($P > 0,05$). Teste exato de Fisher.

Os resultados da integridade funcional da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico não demonstraram diferenças significativas entre os diluidores utilizados às 48 e 72 horas de refrigeração, tabela 7 (Anexo 4, figura 13).

Tabela 7. Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5; 5 e 50 µg/ml de *Aniba canelilla*.

Tempo	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	Tris 10% LDL Aniba canelilla 0,5 ug/ml	Tris 10% LDL Aniba canelilla 5 ug/ml	Tris 10% LDL Aniba canelilla 50 ug/ml	p. valor
0 h	84,7 \pm 4,1	84,7 \pm 4,1	84,7 \pm 4,1	84,7 \pm 4,1	84,7 \pm 4,1	
48 h	74,7 \pm 4,8	70,4 \pm 5,3	72,8 \pm 3,5	72,9 \pm 4,6	74,2 \pm 3,3	0.1463
72 h	61,8 \pm 7,3	63,0 \pm 6	62,9 \pm 5,4	61,1 \pm 5,2	64,7 \pm 5,4	0.5004

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Horas de avaliação: 0 horas, sêmen fresco. 24 e 72 horas de incubação a 5°C.

Em base aos resultados obtidos nas avaliações da cinética espermática MT, MP, Rápidos, VCL, VSL e VAP foi escolhido o meio tris 10% LDL *Aniba canelilla* 50 µg/ml como a melhor concentração a ser usada na fase 2 do experimento.

Tris 10% LDL
 Tris 10% LDL DMSO 0,5%
 Tris 10% LDL A.canelilla 0,5 µg/ml
 Tris 10% LDL A.canelilla 5 µg/ml
 Tris 10% LDL A.canelilla 50 µg/ml

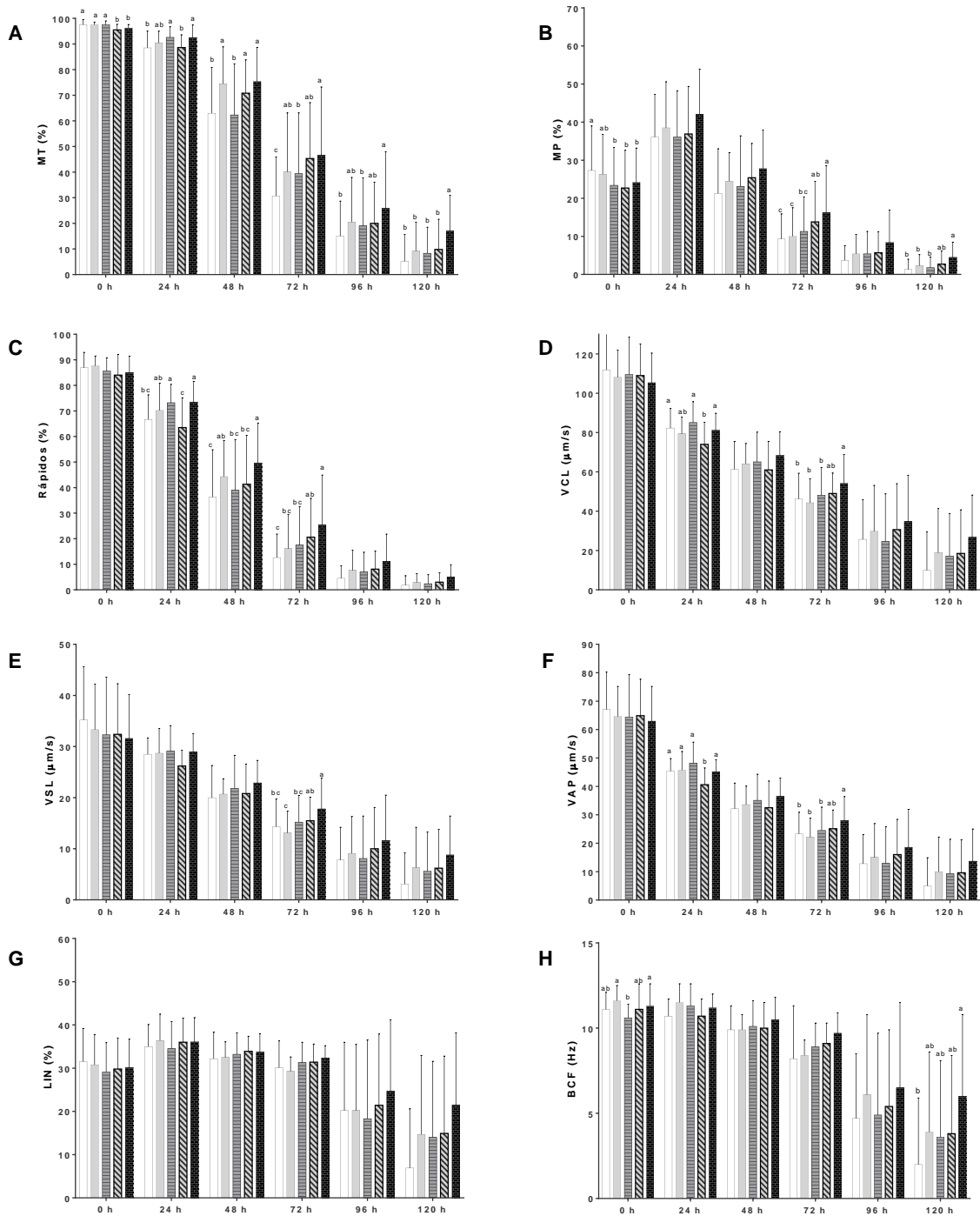


Figura 9. Médias (±DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5; 5 e 50 µg/ml de *Aniba canelilla*, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos (P<0.05). A) Motilidade total. B) Motilidade progressiva. C). Rápidos. D) Velocidade curvilínea. E) Velocidade linear progressiva. F) Velocidade média da trajetória. G) Linearidade. H) Batimento flagelar cruzado.

5.1.2. Blueberry

Os resultados da cinética espermática são apresentados na figura 10 (Anexo 2, tabela 18). A leitura no “CASA” mostra que os parâmetros da cinética espermática não tiveram diferenças significativas entre as concentrações testadas de blueberry na maioria dos tempos de leitura. A superioridade ($P < 0.05$) das concentrações 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de blueberry quando comparadas ao meio diluidor controle foi detectada unicamente às 72 e 96 horas para a motilidade total e espermatozoides rápidos, às 48, 72 e 96 horas na motilidade progressiva, às 96 horas na velocidade curvilínea e na velocidade média da trajetória; às 24 e 96 horas para o parâmetro velocidade linear progressiva; e às 24 e 48 horas no quesito linearidade. Na motilidade progressiva o tratamento Blueberry 100 $\mu\text{g/ml}$ foi melhor às 24 horas de avaliação versus os demais tratamentos ($P < 0,05$). Em relação ao batimento flagelar cruzado houve diferença estatística às 96 horas, sendo o meio tris 10% LDL blueberry 50 $\mu\text{g/ml}$ o meio com menor valor naquele parâmetro.

Levando em conta a porcentagem inicial da motilidade total, esta teve uma menor queda na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ às 24, 48 e 120 horas de incubação. Entretanto, a concentração 50 $\mu\text{g/ml}$ teve menor queda de motilidade às 72 e 96 horas, quando comparadas com o grupo controle e o tratamento na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ de blueberry. Não houve diferença significativa entre tratamentos quanto ao número de amostras com motilidade total superior a 10% às 120 horas de incubação. Neste tempo de incubação os tratamentos de blueberry nas concentrações 10 e 50 $\mu\text{g/ml}$ e o tratamento controle tiveram 4/9 amostras com motilidade total $\geq 10\%$. Na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ houve 3/9 amostras com motilidade total $\geq 10\%$, (Tabela 8). Os resultados da integridade funcional da membrana plasmática avaliadas pelo teste hiposmótico não mostraram diferenças significativas entre as concentrações utilizadas tanto às 48 como às 72 horas de refrigeração, tabela 9 (Anexo 4, figura 13).

Tabela 8. Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μg de blueberry/ml.

Amostras às 120 horas	Motilidade Total %	Diluidor	P. valor
4/9	$\geq 10\%$	Tris 10% LDL Blueberry 10 $\mu\text{g/ml}$	0,6814
		Tris 10% LDL Blueberry 50 $\mu\text{g/ml}$	0,6814
		Tris 10% LDL	0,6814
3/9	$\geq 10\%$	Tris 10% LDL Blueberry 100 $\mu\text{g/ml}$	0,5000

Não houve diferença significativa entre tratamentos ($P > 0,05$). Teste exato de Fisher.

Tabela 9. Médias (\pm DP de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μg de blueberry/ml.

Tempo	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL Blueberry 0,01 mg/ml	Tris 10% LDL Blueberry 0,05 mg/ml	Tris 10% LDL Blueberry 0,1 mg/ml	p. valor
0 h	82,33 \pm 8,53	82,33 \pm 8,53	82,33 \pm 8,53	82,33 \pm 8,53	
48 h	72,11 \pm 4,70	71,89 \pm 5,79	70,67 \pm 8,09	73,78 \pm 6,26	0.5383
72 h	67,11 \pm 3,26	63,66 \pm 5,61	61,56 \pm 6,06	65,67 \pm 5,02	0.1306

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0.05$). Horas de avaliação: 0 horas, sêmen fresco. 24 e 72 horas de incubação a 5°C.

Não havendo diferenças significativas entre as concentrações, foi escolhida a concentração intermediária de blueberry (50 $\mu\text{g/ml}$) para ser usada na segunda fase do experimento.

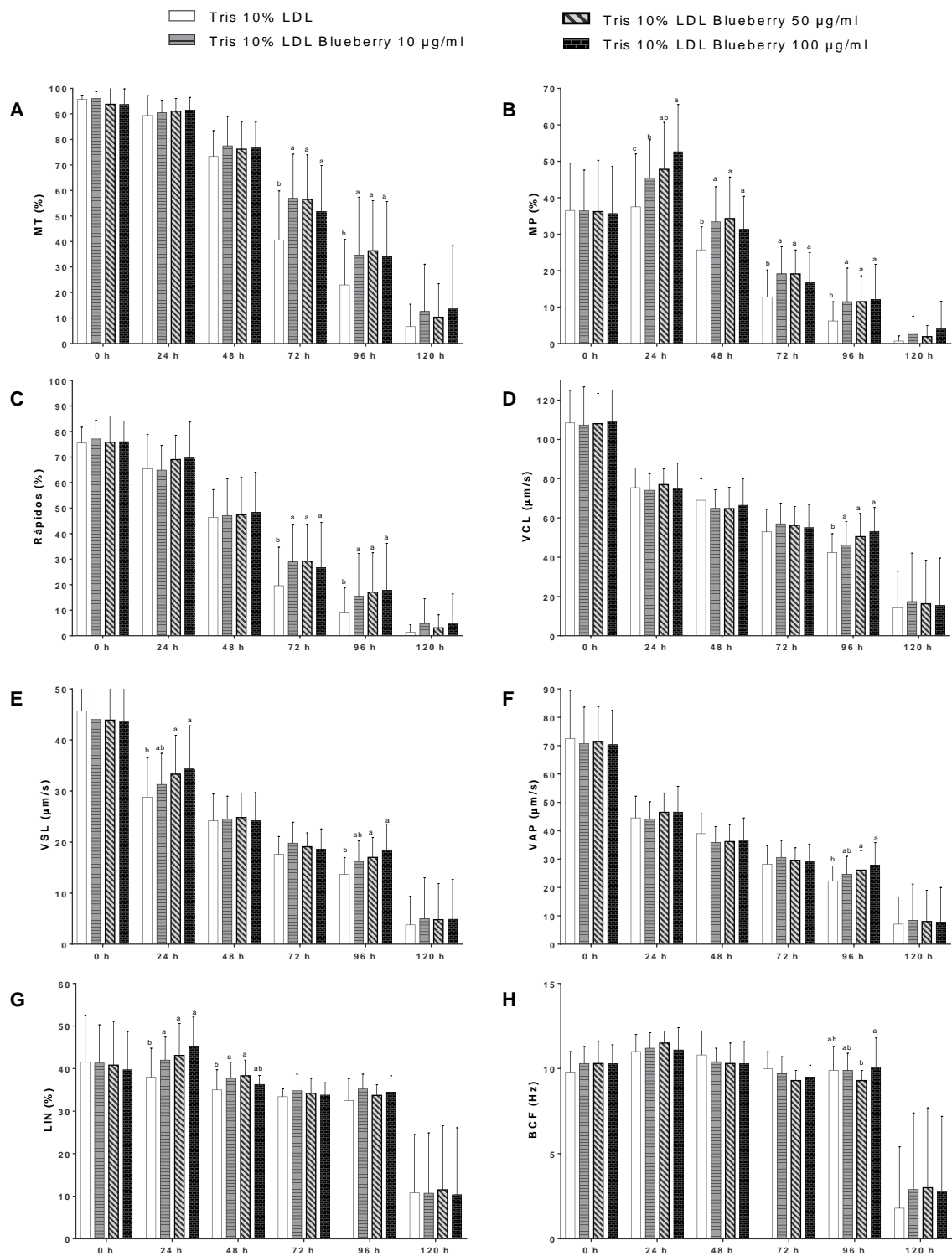


Figura 10. Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos ($n=9$) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μ g de blueberry/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos ($P<0.05$). **A)** Motilidade total. **B)** Motilidade progressiva. **C)** Rápidos. **D)** Velocidade curvilínea. **E)** Velocidade linear progressiva. **F)** Velocidade média da trajetória. **G)** Linearidade. **H)** Batimento flagelar cruzado.

5.1.3. Polifenol de chá verde

Os resultados da cinética espermática são apresentados na figura 11 (Anexo 3, tabela 19). A concentração de polifenol de chá verde de 0,05 µg/ml foi similar à concentração de 5 µg/ml e ao diluidor controle tris 10% LDL nos resultados dos parâmetros da cinética espermática (MT, MP, Rápidos, VCL, VSL, VAP, LIN, BCF). No entanto, estes foram significativamente superiores ($P < 0.05$) aos obtidos quando foi usada a maior concentração do extrato (50 µg/ml).

Apesar de não existir diferença significativa ($P > 0.05$). A motilidade total inicial teve menor queda com a concentração de 0,05 µg/ml de polifenol de chá verde comparando às outras concentrações (5 e 50 µg/ml), incluso com o meio controle até às 120 horas de refrigeração. Enquanto às concentrações 5 e 50 µg/ml de polifenol de chá verde a queda de motilidade foi mais pronunciada no decorrer do tempo.

Enquanto ao número de amostras que mantiveram motilidade total até às 120 horas houve diferença significativa ($P < 0.05$) no tratamento controle e o meio diluidor polifenol 0,5 µg/ml (Tabela 10) quando comparados com o meio com a maior concentração de polifenol. A maior concentração 50 µg/ml deste composto demonstrou ser mais nociva a partir das 72 horas de resfriamento com três de nove amostras mostrando motilidade total ($15,5 \pm 23,9\%$) e apenas houve 1/9 amostras com motilidade de $3,1 \pm 9,2\%$ às 120 horas de incubação a 5°C.

Tabela 10. Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05, 5 e 50 µg/ml de polifenol de chá verde.

Amostras 120 horas	Motilidade Total %	Diluidor	p. valor
7/9	$12,7 \pm 13,9\%$	Tris 10%	a 0,0076
6/9	$14 \pm 13,1\%$	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,05 µg/ml	a 0,0249
5/9	$12,4 \pm 14,9\%$	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 5 µg/ml	0,0656
1/9	$3,1 \pm 9,2\%$	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 50 µg/ml	b 0,0076

Letras diferentes na linha indicam que o efeito diluidor foi significativo ($P < 0.05$). Teste exato de Fisher.

No teste hiposmótico, o polifenol de chá verde na concentração de 50 µg/ml foi significativamente inferior aos outros tratamentos às 72 horas, mostrando uma baixa preservação da integridade funcional da membrana plasmática. Tabela 11 (Anexo 4, figura 13).

Tabela 11. Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05; 5 e 50 µg/ml de polifenol de chá verde.

Tempo	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,05 ug/ml	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 5 ug/ml	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 50 ug/ml	p. valor
0 h	$83,33 \pm 4,74$	$83,33 \pm 4,74$	$83,33 \pm 4,74$	$83,33 \pm 4,74$	
48 h	$76,11 \pm 4,34$	$74,44 \pm 5,03$	$75,78 \pm 7,03$	$70,33 \pm 4,64$	0,1178
72 h	$65,33 \pm 3,87$	a $64,89 \pm 8,24$	a $65,67 \pm 8,85$	b $22,56 \pm 27,01$	0,0001

Médias seguidas por letras diferentes na linha indicam que o efeito diluidor foi significativo ($P < 0.05$). Horas de avaliação: 0 horas, sêmen fresco. 24 e 72 horas de incubação a 5°C.

Em base aos parâmetros da cinética espermática (MT, MP, Rápidos, VCL, VSL, VAP, linearidade e BFC) foi escolhido o meio tris 10% LDL polifenol de chá verde 0,05 µg/ml, para realizar a segunda fase do experimento.

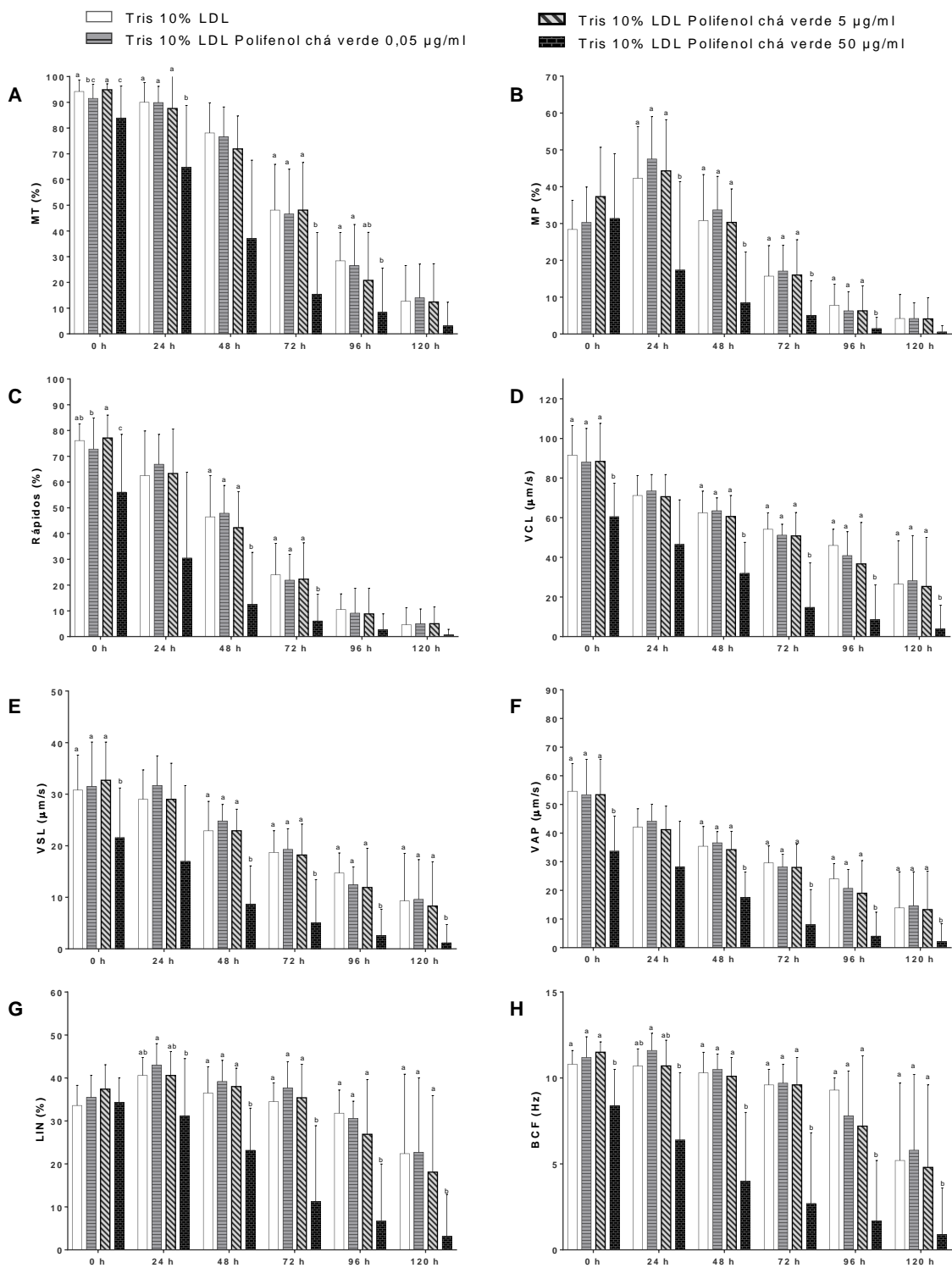


Figura 11. Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos ($n=9$) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05; 5 e 50 $\mu\text{g/ml}$ de Polifenol de chá verde, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos ($P<0.05$). A) Motilidade total. B) Motilidade progressiva. C). Rápidos. D) Velocidade curvilínea. E) Velocidade linear progressiva. F) Velocidade média da trajetória. G) Linearidade. H) Batimento flagelar cruzado.

5.2. FASE 2 – COMPARAÇÃO ENTRE ANTIOXIDANTES

Os parâmetros da cinética espermática MT, MP, Rápidos, VSL, VCL, VAP, Linearidade e BCF são apresentados na figura 12 (Anexo 5, tabela 20). No quesito motilidade total às 24 horas o meio controle tris 10% LDL, *Aniba canelilla* 50 µg/ml e polifenol de chá verde 0,5 µg/ml foram estatisticamente iguais entre eles, no entanto, mostraram superioridade ($P < 0,05$) em relação ao meio tris 10% LDL 0,5% DMSO. Às 48 e 72 horas a MT de espermatozoides diluídos em *Aniba canelilla* 50 µg/ml foi significativamente superior ($P < 0,05$) aos demais tratamentos, já às 120 horas de avaliação a MT de espermatozoides em o meio Blueberry 50 µg/ml foi superior ($P < 0,05$) aos demais tratamentos.

A superioridade ($P < 0,05$) do meio diluidor contendo *Aniba canelilla* 50 µg/ml se expressou na MP (24, 48, 72, 96 horas), Rápidos (48 e 72 horas), VCL (72, 96, e 120 horas), VSL (24, 48, 72 e 96 horas), VAP (72 e 96 horas), linearidade (96 e 120 horas) e BCF (120 horas) quando comparados aos demais tratamentos. O meio tris 10% LDL blueberry 50 µg/ml foi estatisticamente similar a *Aniba canelilla* 50 µg/ml às 120 horas de avaliação para os quesitos MP, Rápidos, VCL, VSL e VAP sendo superiores ($P < 0,05$) em relação aos demais meios. A linearidade foi estatisticamente igual às 48 horas de avaliação nos meios polifenol de chá verde e *Aniba canelilla*, mostrando superioridade ($P < 0,05$) em comparação com os demais tratamentos.

Apesar de não haver diferença significativa entre tratamentos, ($P > 0,05$), o meio tris10% LDL *Aniba canelilla* 50 µg/ml teve um maior número de amostras que mantiveram a motilidade às 120 horas de incubação a 5°C. Neste tempo de incubação 7/9 amostras apresentaram motilidade total $\geq 30\%$ no meio *Aniba canelilla* 50 µg/ml, no meio blueberry 50 µg/ml 6/9 amostras tiveram $\geq 30\%$ de motilidade total, no meio polifenol de chá verde 0,05 µg/ml e no meio com DMSO 0,5% em 4/9 amostras a motilidade total foi $> 10\%$ às 120 horas. Finalmente a motilidade total dos espermatozoides diluídos no meio tris 10% LDL foi de $11,5 \pm 18\%$ na hora 120 em 3/9 amostras (tabela 12). Para todos os casos não citados, a motilidade estava $\leq 10\%$ às 120 horas de refrigeração.

Tabela 12. Número de amostras com motilidade às 120 horas de avaliação diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo A. canelilla 50 µg/ml; blueberry 50 µg/ml e polifenol de chá verde 0,05 µg/ml e resfriados a 5°C.

Amostras 120 horas	Motilidade Total % (n=9)	Diluidor	p.valor
7/9	31,6±23 %)	Tris 10% LDL <i>Aniba canelilla</i> 50 µg/ml	0,0767
6/9	38,5±30%	Tris 10% LDL Blueberry 50 µg/ml	0,1735
4/9	11,8±14%	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,5 µg/ml	0,1674
	13,3±16%	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	0,6614
3/9	11,5±18%	Tris 10% LDL	0,0767

Não houve diferença significativa entre tratamentos ($P > 0,05$). Teste exato de Fisher.

Os resultados de integridade funcional da membrana avaliada pelo teste hiposmótico (Tabela 13, Anexo 6, figura 14) e a integridade acrossomal analisada pela coloração Giemsa 6% (Tabela 14, Anexo 6, figura 14), foram realizadas às 24 e 72 horas de incubação a 5°C. Estas avaliações não mostraram diferenças significativas entre os diluidores testados ($P > 0,05$).

Tris 10% LDL
 Tris 10% LDL DMSO 5%
 Tris 10% LDL A.canelilla 50 µg/ml
 Tris 10% LDL Blueberry 50 µg/ml
 Tris 10% LDL Polifenol chá verde Verde 0,05 µg/ml

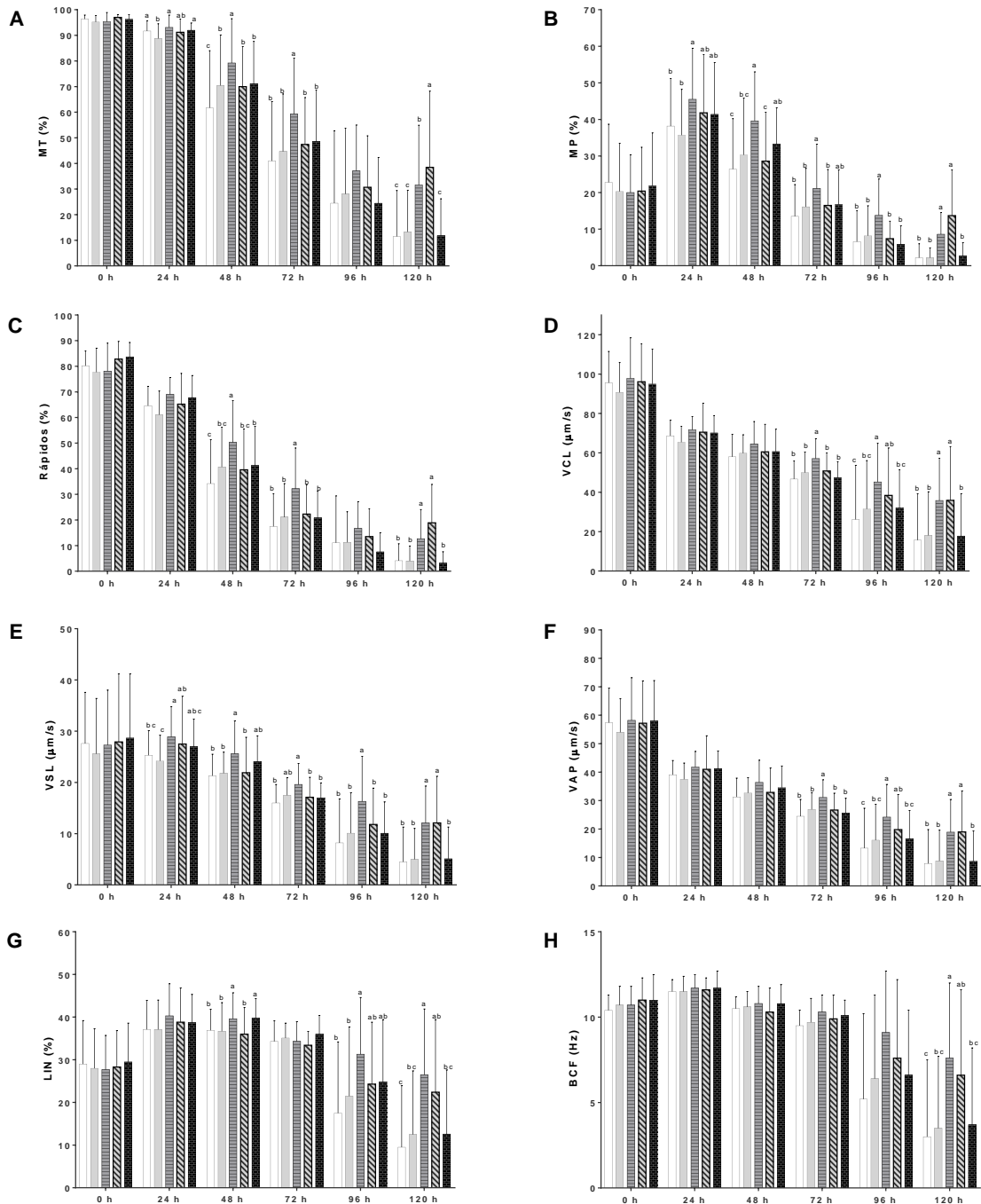


Figura 12. Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos ($n=9$) diluídos em meio tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 µg/ml; blueberry 50 µg/ml e polifenol de chá verde 0,05 µg/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos ($P<0.05$). A) Motilidade total. B) Motilidade progressiva. C). Rápidos. D) Velocidade curvilínea. E) Velocidade linear progressiva. F) Velocidade média da trajetória. G) Linearidade. H) Batimento flagelar cruzado.

Tabela 13. Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C.

Tempo	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	Tris 10% LDL Aniba canelilla 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Blueberry 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml	p. valor
0h	91,0 \pm 4,3	91,0 \pm 4,3	91,0 \pm 4,3	91,0 \pm 4,3	91,0 \pm 4,3	
24h	68,1 \pm 7,8	67,9 \pm 12,1	73,0 \pm 10,9	66,8 \pm 11,1	68,9 \pm 8,1	0.0764
72h	47,2 \pm 5,9	45,7 \pm 11,7	50,6 \pm 7,6	45,0 \pm 8,1	48,6 \pm 9,1	0.4320

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0.05$). Horas de avaliação: 0 horas, sêmen fresco. 24 e 72 horas de incubação a 5°C.

Tabela 14. Médias (\pm DP) da integridade acrossomal de espermatozoides de búfalos diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C, avaliados pelo teste de coloração Giemsa 6%.

Tempo	Integridade Acrossomal	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	Tris 10% LDL Aniba canelilla 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Blueberry 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml	p. valor
0h	Intacto	83,9 \pm 7,2	83,9 \pm 7,2	83,9 \pm 7,2	83,9 \pm 7,2	83,9 \pm 7,2	
	Lesado	8,6 \pm 4,2	8,6 \pm 4,2	8,6 \pm 4,2	8,6 \pm 4,2	8,6 \pm 4,2	
	Destacado	7,6 \pm 4,6	7,6 \pm 4,6	7,6 \pm 4,6	7,6 \pm 4,6	7,6 \pm 4,6	
24h	Intacto	70,8 \pm 9,9	65,1 \pm 10,5	70,1 \pm 5,5	69,4 \pm 8,9	67,9 \pm 10,5	0.3239
	Lesado	16,3 \pm 7,4	20,1 \pm 9,9	16,3 \pm 4,4	17,1 \pm 6,4	17,3 \pm 6,4	0.2973
	Destacado	11,9 \pm 5,2	14,8 \pm 8,9	13,6 \pm 7,1	13,4 \pm 7,0	14,8 \pm 11,3	0.8505
72h	Intacto	51,4 \pm 8,2	51,0 \pm 12,8	54,4 \pm 7,0	52,4 \pm 6,6	50,2 \pm 5,8	0.6734
	Lesado	30,2 \pm 9,1	29,6 \pm 13,6	28,7 \pm 5,1	31,3 \pm 6,9	30,9 \pm 8,3	0.9385
	Destacado	18,3 \pm 8,5	19,4 \pm 7,6	16,9 \pm 5,0	16,2 \pm 3,6	18,9 \pm 9,9	0.6520

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0.05$). Horas de avaliação: 0 horas, sêmen fresco. 24 e 72 horas de incubação a 5°C.

Os testes de integridade estrutural da membrana plasmática do espermatozoide e a integridade da cromatina foram analisados mediante citometria de fluxo (Tabelas 15 e 16, Anexo 7, figura 15) às 24 e 72 horas de incubação a 5°C. A integridade estrutural da membrana plasmática não mostrou diferenças significativas entre os diluidores testados ($P > 0.05$).

Quanto a integridade da cromatina espermática o índice de fragmentação alto às 24 horas foi menor nos dois meios controles e maior nos meios com antioxidantes, particularmente no meio com polifenol de chá verde. Às 72 horas de incubação a única variação observada foi nos espermatozoides preservados no meio controle Tris 10% LDL, com um índice maior de fragmentação total que os preservados no resto de diluidores ($P < 0.05$). O índice de fragmentação total teve um menor aumento nos meios com antioxidantes às 72 horas de incubação.

Tabela 15. Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos positivos ao teste de integridade estrutural da membrana plasmática avaliado mediante citometria de fluxo (sonda PI/SBYR) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C.

Tempo	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	Tris 10% LDL Aniba canelilla 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Blueberry 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml	p. valor
24	82,4 \pm 8,3	82,3 \pm 8,1	76,1 \pm 18,0	82,4 \pm 8,0	82,2 \pm 8,0	0.2965
72	74,8 \pm 9,0	73,8 \pm 10,3	77,1 \pm 7,9	75,0 \pm 8,0	76,3 \pm 6,3	0.3494

Não houve diferença significativa entre tratamentos ($P > 0.05$). Avaliação às 24 e 72 horas de incubação a 5°C.

Tabela 16. Médias (\pm DP) do índice de fragmentação de cromatina de espermatozoides de búfalos, diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml e resfriados a 5°C, avaliados mediante citometria de fluxo (sonda AO) às 24 e 72 horas de incubação.

Tempo	DNA	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	Tris 10% LDL Aniba canelilla 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Blueberry 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml	p.valor
24h	IDF baixo	0,21 \pm 0,11	0,25 \pm 0,17	0,53 \pm 0,88	0,54 \pm 1,02	0,52 \pm 0,66	0.6515
	IDF médio	0,19 \pm 0,05	0,16 \pm 0,06	0,21 \pm 0,11	0,22 \pm 0,17	0,23 \pm 0,15	0.6426
	IDF alto	0,03 \pm 0,02 ab	0,02 \pm 0,02 a	0,04 \pm 0,03 bc	0,06 \pm 0,03 bc	0,10 \pm 0,07 c	0.0046*
	IDF total	0,43 \pm 0,15	0,42 \pm 0,21	0,78 \pm 0,98	0,81 \pm 1,08	0,85 \pm 0,68	0.4656
	IDF idetectavel	99,6 \pm 0,2	99,6 \pm 0,2	99,2 \pm 1	99,2 \pm 1,1	99,2 \pm 0,7	
72h	IDF baixo	0,71 \pm 1,17	0,38 \pm 0,49	0,23 \pm 0,14	0,21 \pm 0,16	0,30 \pm 0,25	0.1642
	IDF médio	0,52 \pm 0,56	0,24 \pm 0,15	0,20 \pm 0,08	0,22 \pm 0,19	0,22 \pm 0,15	0.1119
	IDF alto	0,13 \pm 0,19	0,05 \pm 0,04	0,05 \pm 0,04	0,05 \pm 0,04	0,06 \pm 0,05	0.2744
	IDF total	1,36 \pm 1,44 b	0,67 \pm 0,61 a	0,48 \pm 0,24 a	0,48 \pm 0,36 a	0,59 \pm 0,37 a	0.0264
	IDF idetectavel	98,6 \pm 1,4	99,3 \pm 0,6	99,5 \pm 0,2	99,5 \pm 0,4	99,4 \pm 0,4	

Médias seguidas por letras diferentes na linha indicam que o efeito diluidor foi significativo ($P < 0.05$). Horas de avaliação: 24 e 72 horas de incubação a 5°C. IDF: índice de fragmentação da cromatina (%).

6. DISCUSSÃO

Aniba canelilla não tem sido testada em meios diluidores para preservação de sêmen em nenhuma espécie. As concentrações usadas do óleo essencial de *A. canelilla* ao longo das análises não mostraram a queda ou parada abrupta da motilidade, ou alteração da cinética espermática. Mostrando que as concentrações inicialmente utilizadas não teriam prejuízos na motilidade espermática e na funcionalidade da membrana plasmática de búfalos quando usadas no meio diluidor. Foi observado que os parâmetros cinéticos tiveram uma menor queda dos valores ao longo do tempo conforme a concentração de *A. canelilla* aumentava. A motilidade espermática teve diferença significativa e foi melhor preservada durante mais tempo (120 horas) quando o meio diluidor continha *Aniba canelilla* 50 μ g/ml durante a primeira e segunda fase do experimento. As diferenças significativas entre *A. canelilla* e os meios controles permitem sugerir que o efeito observado da motilidade e cinética espermática foi resultante de *A. canelilla*, e não do solvente DMSO. Reforçando os resultados que foram obtidos no teste preliminar com DMSO, onde as concentrações de 0,1% e 5% de DMSO acrescentados ao meio tris 10% LDL foram significativamente superiores ao meio controle tris 10% LDL unicamente até às 48 horas de análise (Becerra *et al.*, 2017).

Enquanto a funcionalidade da membrana plasmática, não houve diferença significativa entre tratamentos, tampouco foi afetada pela adição de *A. canelilla* em nenhuma de suas concentrações. Trabalhos realizados por AHMED *et al.* (2016), nos quais avaliaram vários parâmetros para prever a fertilidade de sêmen criopreservado de búfalo *in vivo*, mostraram que a integridade da membrana plasmática está significativamente correlacionada com a fertilidade.

Os resultados obtidos quando a *A. canelilla* foi adicionada ao meio diluidor poderiam ser explicados pela capacidade antioxidante do composto, assim como suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (Oger *et al.*, 1994; Da Silva *et al.*, 2007; De Lima *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Silva, 2012; Vale *et al.*, 2013). *A. canelilla* poderia inibir a liberação de H₂O₂ dos neutrófilos e macrófagos presentes no ejaculado ajudando no controle do estresse oxidativo, ou ter influenciado a queda do crescimento bacteriano ao potencializar ou ao atuar em sinergismo com amicacina, antibiótico usado no meio diluidor base. Desta maneira, além da atividade antioxidante, as outras vias de atuação de *Aniba canelilla* poderiam ter contribuído

com a manutenção de um ambiente favorável e indiretamente inibido a produção de ERO que geram as bactérias e leucócitos, sendo um conjunto de fatores adequados para a preservação dos espermatozoides. Outra propriedade favorável é sua estabilidade à oxidação (Silva, 2012). O 1-nitro-2-feniletano é o componente principal do óleo essencial usado neste experimento, com valor total de 90,3%. Este componente pode adotar diferentes conformações para conferir maior estabilidade a sua estrutura, e está relacionado com as atividades biológicas de 1-nitro-2-feniletano (Vale *et al.*, 2013). Esta característica própria de *A. canelilla* permitiria proteger as estruturas dos espermatozoides das ERO e NRO prolongando a longevidade e viabilidade espermática, assim como à conservação e estabilidade do meio diluidor ao longo do tempo. Ação que foi refletida na conservação dos espermatozoides até às 120 horas de avaliação.

Enquanto a Blueberry, nossas análises realizadas com sêmen de búfalo não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações testadas, tampouco houve queda abrupta da motilidade ou perda da integridade funcional da membrana plasmática usando blueberry na dosagem de 10, 50 e 100 µg/ml no meio diluidor. Mostrando ser concentrações atóxicas para os espermatozoides de búfalos. Os valores dos parâmetros da cinética espermática durante o resfriamento da fase 1 não manifestaram diferença estatística entre as concentrações de blueberry. Entretanto, as dosagens empregadas de blueberry tiveram diferença significativa quando comparadas com o meio controle, predominantemente às 72 e 96 horas de refrigeração nos quesitos MT, VCL, VAP e VSL. No presente experimento não foi observada melhoria na preservação na integridade funcional da membrana plasmática adicionando blueberry no meio à base tris 10% LDL. Similares resultados foram achados no emprego de extrato de folhas de blueberry na concentração de 1, 2, 4 e 6% adicionado ao meio tris - gema de ovo para congelação de sêmen canino. As concentrações 1, 2 e 4% não tiveram diferença significativa quando comparadas com o tratamento controle tanto na integridade da membrana acrossomal, integridade e viabilidade da membrana plasmática. Não obstante, a maior concentração do extrato exerceu um efeito negativo, que provocou uma queda significativa na motilidade progressiva, integridade acrossomal, viabilidade e integridade da membrana plasmática (Deppe *et al.*, 2016).

O potencial antioxidante do blueberry tem sido testado em poucos experimentos visando a criopreservação do sêmen. Há relatos com experiências positivas do seu uso em sêmen de salvelino ártico (*Salvelinus alpinus*) e sêmen de barrão (Desroches *et al.*, 2005; Mansour *et al.*, 2006), mas sem determinação da composição fitoquímica dos extratos usados. O blueberry é reconhecido pelos benefícios antioxidantes conferidos pelos compostos fenólicos antocianinas e flavonoides, componentes com propriedades antioxidantes (Smith *et al.*, 2000). As antocianinas do blueberry se encontram em forma glicosada, sendo uma macromolécula que não estaria facilmente disponível para ingressar na célula (Bornsek *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017). Porém ensaios de atividade celular antioxidante (CAA) realizados em diversos tipos de células somáticas humanas mostraram que as antocianinas teriam atividade antioxidante quando aplicadas em concentrações nanomolares (1nM) (Bornsek *et al.*, 2012). Tanto a forma glicosada das antocianinas assim como sua instabilidade em meios com pH neutro, poderiam ter afetado a interação com a membrana plasmática dos espermatozoides. Outra especulação para a nulidade dos resultados obtidos neste experimento seria que as concentrações usadas (10, 50 e 100 µg/ml) não foram as adequadas para exercer um efeito antioxidante durante o período de resfriamento do sêmen de búfalo.

A inclusão de polifenol de chá verde no meio à base tris 10% LDL na concentração de 50 µg/ml teve efeitos tóxicos na sobrevivência espermática, os impactos negativos em sêmen de búfalo foram notados na motilidade e todos os parâmetros da cinética espermática a partir das 24 horas.

Assim como na funcionalidade da membrana plasmática às 48 e 72 horas de incubação. Os parâmetros MT, MP, rápidos, VCL, VSL, VAP, linearidade e BCF apontam que o emprego deste antioxidante em sêmen resfriado de búfalos não traz melhores efeitos do que o tratamento controle, ainda quando usadas concentrações de 0,5 e 5 µg/ml. Quando avaliada a motilidade as concentrações de 5 e 50 µg/ml de polifenol de chá verde observou-se que a queda da motilidade foi mais pronunciada no decorrer do tempo. Às 48 horas de incubação que os espermatozoides diluídos em meio com a maior concentração de polifenol de chá verde tinham 37% MT enquanto os espermatozoides dos demais tratamentos tiveram $\geq 71\%$ MT. A supressão da cinética espermática também tem sido observada quando espermatozoides humanos foram expostos a concentrações de 25 - 400 µM de epigallocatequina galato (EGCG) durante duas horas a 37°C assim como outras catequinas presentes no polifenol de chá verde como epicatequina galato (ECG), catequina galato (CG) e galocatequina galato (GCG) em concentrações de 50 - 200 µM (Aitken *et al.*, 2016).

Os valores do teste hiposmótico às 48 e 72 horas refletem uma notável perda da funcionalidade da membrana plasmática com a concentração de 50 µg/ml de polifenol de chá verde. Possivelmente às 48 horas de refrigeração o extrato atuou imobilizando ou matando aos espermatozoides sem lesar sua membrana plasmática. Os polifenóis tem efeito inibitório dose-dependente no potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides humanos. Este efeito não está ligado à osmolaridade ou pH, mas sim à redução significativa da geração de ERO na mitocôndria e que não está necessariamente associada à viabilidade celular (Aitken *et al.*, 2016). Entretanto, a estabilidade do polifenol de chá verde é pH dependente, mostrando-se estável em soluções com pH ácido (Zhu *et al.*, 1997; Bruno *et al.*, 2014). Devido à própria fisiologia dos espermatozoides os meios diluidores produzidos se encontravam próximos a pH 7. Este valor de pH pode ter inativado as catequinas, perdendo a ação antioxidante esperada. Para resolver este problema poderia ser usada como estratégia a adição de vitamina C ou a enzima SOD, para conseguir estabilizar as catequinas do polifenol de chá verde, dessa forma seria evitada a degradação e pró-oxidação (Wittayarat *et al.*, 2012). Esta alternativa não foi testada no presente trabalho.

O polifenol de chá verde possui propriedades antagônicas. Em baixas concentrações mostra ter características antioxidantes, mas se ultrapassar os limiares este se torna pró-oxidante desencadeando estresse oxidativo, peroxidação lipídica, podendo ser letal. Além disso, foi reportado que o polifenol de chá verde pode atuar de maneira simultânea: antioxidante e pró-oxidante (Aitken *et al.*, 2016), quando este desempenha sua atividade antitumoral (Yang *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014). É conhecido que os compostos fenólicos atuam diminuindo a peroxidação de proteínas de baixa densidade (Mueen Ahmed e Baral, 2011). Apesar disso, as respostas desfavoráveis em espermatozoides de búfalos obtidas na maior concentração de polifenol de chá verde poderia indicar a atividade pró-oxidante descrita em estudos *in vitro*, que relatam as respostas geradas por EGCG ao produzir o bloqueio da enzima catalase induzindo a produção de ERO, H₂O₂⁻, lipoperoxidação lipídica, perda da motilidade e viabilidade celular, e finalmente, apoptose (Yang *et al.*, 2000; Landau *et al.*, 2006; Bruno *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 2016). Estas causas podem ter levado a uma falta de expressão nas respostas dos testes efetuados neste experimento. Gale *et al.*, (2015) relataram que ao adicionar 2,5, 5 e 10% de extrato de *Camellia sinensis* ao meio lactose - gema de ovo para criopreservação de sêmen de suíno, não teve melhora na qualidade dos parâmetros espermáticos. Apesar de ter tido taxas menores de peroxidação no meio suplementado com 5% do extrato. Este estudo também registrou um incremento na capacitação dos espermatozoides à medida que aumentava a concentração do extrato no meio diluidor. Entretanto, outras pesquisas divergem destes resultados. Respostas positivas têm sido observadas ao usar polifenol de chá verde em sêmen refrigerado de cão, sêmen congelado de carneiros e touros Sahiwal (Wittayarat *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2014; Mehdipour *et*

al., 2016). As concentrações 0,05; 5 µg/ml de polifenol de chá verde usadas no presente experimento foram similares às usadas nas pesquisas citadas anteriormente, a exceção do estudo de Gale *et al.*, (2015). Nossos resultados indicam que o polifenol de chá verde não trouxe benefícios para o sêmen refrigerado de búfalo. Especulando que a falta de resultados pode se dever a soma de fatores. A inativação dos compostos do polifenol de chá verde pode ter ocorrido pelo valor neutro do pH, interação dos reagentes usados no meio diluidor, ação pró-oxidante, ou devido a que o polifenol de chá verde tem uma resposta espécie-específica.

Na segunda fase do experimento, os parâmetros da cinética espermática mostraram diferença significativa para *A. canelilla* 50 µg/ml quando comparados com blueberry 50 µg/ml, polifenol 0,5 µg/ml e os meios diluidores controle. A motilidade espermática também foi melhor preservada e durante mais tempo (120 horas de incubação) quando o meio diluidor continha *Aniba canelilla* 50 µg/ml. No entanto, às 120 horas blueberry 50 µg/ml foi superior a *A. canelilla* no quesito MT, e igualou estatisticamente a *A. canelilla* nos parâmetros VCL, VSL, VAP, BFC e linearidade.

Os espermatozoides diluídos com *A. canelilla* teoricamente teriam maiores chances de fecundar o oócito, particularmente quando o tempo de incubação for mais prolongado, devido aos valores obtidos da cinética espermática. Segundo Ahmed (2016a), os espermatozoides com movimento linear e velocidade rápida teriam maior possibilidade de alcançar o oócito, enquanto os parâmetros espermáticos VAP e VSL estão positivamente correlacionados com a fertilidade na espécie bubalina. Na concentração de 50 µg/ml de *Aniba canelilla* foi possível aumentar a longevidade de espermatozoides bubalinos, prolongando a motilidade e vigor espermático possivelmente pela ação antioxidante e demais propriedades faladas anteriormente, que são expressivas nos compostos do óleo essencial. Ajudando a preservar os espermatozoides desde o início até o final da incubação.

Durante a segunda fase do experimento a integridade acrossomal, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos. Os resultados obtidos do teste hiposmótico e integridade acrossomal sugerem que as concentrações usadas de *A. canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde na segunda fase do experimento não danificaram a membrana plasmática além do que é normalmente esperado com o decorrer do tempo. Mantendo a sua funcionalidade e integridade espermática em níveis aceitáveis para sêmen de búfalo (Rasul *et al.*, 2000; Rasul *et al.*, 2001). Em búfalos as percentagens altas de acrossomas intactos e espermatozoides viáveis são bons índices para prever a fertilidade *in vivo* (Ahmed *et al.*, 2016a; Ahmed *et al.*, 2016b) e também está altamente correlacionado com o sucesso de clivagem quando usada a fertilização *in vitro* (Boccia *et al.*, 2010). Apesar da integridade acrossomal e a integridade estrutural da membrana plasmática não terem apresentado diferença significativa entre tratamentos ($P > 0.05$), pode-se observar que às 72 horas o meio diluidor que possuía *Aniba canelilla* apresentou um maior número de espermatozoides íntegros e acrossomas intactos. As percentagens obtidas em nosso trabalho na análise da integridade acrossomal de sêmen resfriado foram maiores aos valores obtidos por Rasul *et al.*, (2001) após o descongelamento de sêmen de búfalo em meio tris-ácido cítrico. No entanto, os valores foram semelhantes em ambos estudos no sêmen fresco e pós diluição. O que sugere que a integridade acrossomal é mais afetada quando o sêmen é congelado.

Os resultados obtidos através da citometria de fluxo indicam que os espermatozoides mantiveram alta a integridade estrutural da membrana plasmática assim como o índice de fragmentação indetectável (DNA não lesado), apontando que a estrutura espermática foi pouco afetada até às 72 horas de avaliação. A importância do DNA espermático está no fato que ele carrega 50% da informação genética, é indispensável para ocorrer a fertilização, o desenvolvimento fetal e a expressão plena das características da progênie (Andrabi, 2007; Aitken *et al.*, 2015). Em

humanos, a fertilidade esta correlacionada com o IDF, valores do IDF <15% correspondem a indivíduos normais (possivelmente férteis), >15% e < 27% afetação média da fertilidade, enquanto >27% corresponde a indivíduos inférteis (Evenson e Jost, 2000a; Larson-Cook *et al.*, 2003; Gosálvez Berenguer *et al.*, 2008). Já em búfalos o IDF foi classificado como baixo quando <8,5% e alto quando >8,5% (Pawar e Kaul, 2011). Os valores obtidos neste estudo, no índice de fragmentação total foram <2% para todos os diluidores usados. O que permite especular que o processo de fertilização e clivagem não seria afetado se o meio diluidor Aniba canelilla 50 µg/ml fosse usada. A fragmentação da cromatina pode ser originada durante a espermiogênese e a compactação do DNA no intercâmbio de histonas por protaminas durante a maturação, no qual há certo tipo de rupturas no DNA que depois serão reparadas. Também ocorre devido a ação das ERO quando existe o estresse oxidativo, ocasionando danos na base e rupturas de uma das hélices do DNA. Adicionalmente a fragmentação da cromatina espermática pode acontecer como consequência do processo de apoptose (Andrabi, 2007; Gosálvez Berenguer *et al.*, 2008; Aitken e Koppers, 2011; Aitken *et al.*, 2015; Kocer *et al.*, 2015). Estas causas de fragmentação de cromatina podem ocorrer em conjunto. A utilização de *Aniba canelilla* no meio diluidor preservaria a viabilidade dos espermatozoides mediante a proteção do estresse oxidativo principalmente na mitocôndria e na membrana plasmática. Uma vez que a apoptose ocorre quando mitocôndria gera ERO e entra em estresse oxidativo, havendo perda do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspases assim como a exposição à fosfatidilserina, o que gera finalmente a fragmentação do DNA com a ruptura da membrana (Koppers *et al.*, 2008; Aitken *et al.*, 2015). Em espermatozoides de bovinos a ativação da caspase 9 unicamente aconteceu após a criopreservação dos espermatozoides (Hendricks e Hansen, 2009). Já em búfalos o potencial da membrana mitocondrial diminui após a diluição, enquanto a ativação da caspase 9 acontece após o tempo de equilíbrio e a desestabilização da membrana plasmática posterior ao congelamento e descongelamento (Khan *et al.*, 2009).

Os altos valores da integridade estrutural da membrana plasmática e a integridade da cromatina espermática às 24 e 72 horas de incubação mostram um contraste quando comparados com os valores da motilidade que decrescem com o decorrer do tempo. Estes resultados estão em concordância com estudos feitos em sêmen refrigerado de búfalo (Kadirvel *et al.*, 2009) e sêmen congelado de bovino (Martin *et al.*, 2004). A curva de resfriamento realizada durante o experimento teve uma queda de -0,25°C/minuto aproximadamente, estando próxima ao desejado. Os resultados obtidos revelam que a membrana plasmática e DNA espermático conseguiram ser preservados, mostrando que o processo de resfriamento não ocasionou grandes crioinjúrias aos espermatozoides. Vantagem que pode ser aproveitada na inseminação artificial ao usar sêmen refrigerado versus congelado. As maiores lesões ocasionadas nos espermatozoides pelas crioinjúrias acontecem durante o congelamento e descongelamento (Martin *et al.*, 2004). Isto em conformidade com resultados obtidos em sêmen resfriado de búfalo, os quais sugerem que o processo de refrigeração não afeta significativamente o dano do DNA (Kadirvel *et al.*, 2009). Kumar *et al.*, (2011) relataram que a integridade do DNA espermático sofreu alterações e danos irreversíveis, assim como a perda da qualidade seminal no sêmen congelado de búfalo. Esta implicação foi associada a um baixo perfil antioxidante e estresse oxidativo presente no sêmen.

O processo de criopreservação de sêmen envolve inúmeras variáveis, que podem afetar as estruturas e o funcionamento normal dos espermatozoides, comprometendo consequentemente a fertilização. O conhecimento dos efeitos que as ERO exercem sobre os espermatozoides favoráveis quando em concentrações desejáveis e deletérios quando em excesso, permite propor o uso de antioxidantes não enzimáticos para combater os efeitos causados pelas ERO. Melhorando a preservação das células quando submetidas aos processos de resfriamento, congelamento e

descongelamento. No entanto, ainda não está claro qual seria o mecanismo exato de como essas substâncias interatuam na estrutura espermática durante o estresse oxidativo.

Os achados do presente experimento demonstraram o efeito favorável de *Aniba canelilla* na dosagem de 50 µg/ml para preservação de espermatozoides de búfalo à temperatura de 5°C. Enquanto o polifenol de chá verde expressou toxicidade espermática na maior concentração. Adicionalmente, todas as concentrações de blueberry e as menores concentrações de polifenol de chá verde não expressaram vantagens de uso no sêmen de búfalo quando comparado com o meio Tris 10% LDL, sendo estes resultados condizentes com certos relatos encontrados na literatura referentes a outras espécies de uso doméstico. *Aniba canelilla* é um composto novo que poderá ser de considerável ajuda prática na preservação dos espermatozoides, se ajustadas as concentrações nos meios diluidores. Tanto para sêmen bubalino como para outras espécies. Há necessidade de serem realizadas mais avaliações para atingir as concentrações ótimas de cada substância e testes específicos para avaliar a capacidade antioxidante da substância. Com o fim de obter um ganho na preservação de espermatozoides *in vitro* e protegê-los do estresse oxidativo. Também se requerem mais estudos sobre a função e atividade que cada composto dos extratos vegetais têm sob a capacidade fertilizante dos espermatozoides.

7. CONCLUSÕES

- A adição do óleo essencial de *Aniba canelilla* na concentração de 0,5 e 5 µg/ml, blueberry 10, 50 e 100 µg /ml e polifenol de chá verde na concentração de 0,05 e 5 µg/ml ao meio à base tris 10% LDL não apresentaram melhorias notáveis na cinética espermática e integridade funcional da membrana plasmática;
- A concentração de 50 µg/ml de polifenol de chá verde têm efeitos nocivos na sobrevivência espermática e consequências negativas, registrados na motilidade e na funcionalidade da membrana plasmática nos espermatozoides de búfalos;
- A adição do óleo essencial de *Aniba canelilla* ao meio à base tris 10% LDL na concentração de 50µg/ml mostrou ser mais apropriado que o blueberry e polifenol de chá verde na preservação da cinética de espermatozoides bubalinos resfriados e mantidos a 5°C;
- A integridade funcionalidade e estrutural da membrana plasmática, integridade do acrossoma, e integridade da cromatina de espermatozoides bubalinos foram igualmente preservados com a adição de *A. canelilla* 50 µg/ml; blueberry 50 µg /ml e polifenol de chá verde 0,05 µg/ml no meio à base tris 10% LDL e refrigerados a 5°C;
- O uso de *Aniba canelilla* promove a longevidade espermática em sêmen de búfalo refrigerado a 5°C.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCB. Associação brasileira de criadores de búfalos. Derivados de leite de búfala. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br> site acessado 3/02/2017
- AGARWAL, A.; MAKKER, K. and SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*, n.1, v.59, p. 2-11, 2008.
- AHMED, H.; ANDRABI, S. M. H.; ANWAR, M., *et al.* Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia* p. n/a-n/a, 2016a.
- AHMED, H.; ANDRABI, S. M. H. and JAHAN, S. Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. *Theriogenology*, n.6, v.86, p. 1516-1522, 2016b.
- AHMED, S. M. U.; LUO, L.; NAMANI, A., *et al.* Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, n.2, v.1863, p. 585-597, 2017.
- AITKEN, R. J. and BAKER, M. A. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *Journal of Reproductive Immunology*, n.1, v.100, p. 11-19, 2013.
- AITKEN, R. J. and CURRY, B. J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal*, n.3, v.14, p. 367-381, 2011.
- AITKEN, R. J.; GIBB, Z.; BAKER, M. A., *et al.* Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, n.2, v.28, p. 1-10, 2015.
- AITKEN, R. J.; JONES, K. T. and ROBERTSON, S. A. Reactive Oxygen Species and Sperm Function—In Sickness and In Health. *Journal of Andrology*, n.6, v.33, p. 1096-1106, 2012.
- AITKEN, R. J. and KOPPERS, A. J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*, n.1, v.13, p. 36-42, 2011.
- AITKEN, R. J.; MUSCIO, L.; WHITING, S., *et al.* Analysis of the effects of polyphenols on human spermatozoa reveals unexpected impacts on mitochondrial membrane potential, oxidative stress and DNA integrity; implications for assisted reproductive technology. *Biochem Pharmacol*.121, p. 78-96, 2016.
- AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE IULIIS, G. N., *et al.* Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, n.10, v.91, p. 4154-4163, 2006.
- AKHTER, S.; ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A., *et al.* Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*, n.4, v.76, p. 759-764, 2011.
- ALI, H.; RIAZ, A.; GHAFUOR, A., *et al.* Antioxidative Protection by Strawberry and Green Tea Extracts During Cryopreservation of Sahiwal Bull Semen. *life*, n.2, v.12, p. 97-100, 2014.
- ALLAI, L.; DRUART, X.; CONTELL, J., *et al.* Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Animal Reproduction Science*.160, p. 57-67, 2015.

- ALMEIDA, J. and BALL, B. A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, n.3–4, v.87, p. 321-337, 2005.
- AMRIT KAUR, B. and BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International* p., 2011.
- ANDRABI, S. M. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, n.1439-0531 (Electronic), v.44, p. 552-569, 2009.
- ANDRABI, S. M. H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, n.12, v.24, p. 561-569, 2007.
- ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G. and MANOLAKOU, P. ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reproductive Toxicology*, n.2, v.28, p. 167-171, 2009.
- ANZAR, M.; FAROOQ, U.; MIRZA, M., *et al.* Factors affecting the efficiency of artificial insemination in cattle and buffalo in Punjab, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, n.3, v.23, p. 106-113, 2003.
- ARRUDA-BARBOSA, L.; RODRIGUES, K. M. S.; SOUZA-NETO, F. d. C. V., *et al.* Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethene in rat isolated aortic rings. *Vascular Pharmacology*, n.2, v.63, p. 55-62, 2014.
- AZAB, K. S.; SALAMA, A. F.; MAGDY, A., *et al.* Cranberry extract modulate inflammation in irradiated rats. *Sci Res Essays*v.2, p. 392, 2014.
- BAGCHI, D.; ROY, S.; PATEL, V., *et al.* Safety and whole-body antioxidant potential of a novel anthocyanin-rich formulation of edible berries. *Mol Cell Biochem*, n.1-2, v.281, p. 197-209, 2006.
- BAGCHI, D.; SEN, C. K.; BAGCHI, M., *et al.* Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)*, n.1, v.69, p. 75-80, 71 p preceding 75, 2004.
- BAGHSHAHI, H.; RIASI, A.; MAHDAVI, A. H., *et al.* Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, n.3, v.69, p. 482-487, 2014.
- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, n.3–4, v.107, p. 257-267, 2008.
- BALL, B. A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C. G., *et al.* Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, n.4, v.56, p. 577-589, 2001.
- BARUSELLI, P. and CARVALHO, N. Biotechnology of reproduction in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Rev Bras Reprod Anim*v.29, p. 4-17, 2005.
- BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. and DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, n.3, Supplement 3, v.91, p. S2-S13, 1991.
- BECERRA, V. B.; PARZEWSKI, B.; BRITO, M., *et al.* Effect of dimethyl sulfoxide on buffalo sperm motility refrigerated at 5°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n.1, v.41, p. 351, 2017.

- BECONI, M. T.; FRANCIÀ, C. R.; MORA, N. G., *et al.* Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, n.4, v.40, p. 841-851, 1993.
- BERGERON, A. and MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, n.10, v.73, p. 1338-1344, 2006.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica (Buffaloes breeding in Brasil: position and economic relevancy). *Revista Brasileira de Reprodução Animal* p. 293-298, 2007.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk veterinærmedicin*, n.7, v.25, p. 383-391, 1973.
- BOCCIA, L.; DI PALO, R.; DE ROSA, A., *et al.* Evaluation of buffalo semen by Trypan blue/Giemsa staining and related fertility in vitro. *Italian Journal of Animal Science*, n.2s, v.6, p., 2010.
- BORGES, G.; DEGENEVE, A.; MULLEN, W., *et al.* Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *J Agric Food Chem*, n.7, v.58, p. 3901-3909, 2010.
- BORNSEK, S. M.; ZIBERNA, L.; POLAK, T., *et al.* Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chem*, n.4, v.134, p. 1878-1884, 2012.
- BRITO, M. F. (2014). Criopreservação do sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*) em diluidores contendo lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema de ovo. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Mestrado: 68 f.
- BRUNO, R. S.; BOMSER, J. A. and FERRUZZI, M. G. (2014). Chapter 4 - Antioxidant Capacity of Green Tea (*Camellia sinensis*) A2 - Preedy, Victor. Processing and Impact on Antioxidants in Beverages. San Diego, Academic Press: 33-39.
- BUCAK, M. N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P. B., *et al.* The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, n.1, v.89, p. 24-30, 2010.
- BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N., *et al.* Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, n.3-4, v.150, p. 77-83, 2014.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; BERNARDINI, M., *et al.* Effect of dietary α -tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen stored at 5 °C. *Theriogenology*, n.4, v.54, p. 523-533, 2000.
- CASTREJÓN, A. D. R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S., *et al.* Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, n.3, v.109, p. 564-572, 2008.
- CBRA (2013). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. . Colegio Brasileiro de Reprodução Animal 3. ed. Belo Horizonte.

- CHEN, L.; YANG, X.; JIAO, H., *et al.* Tea Catechins Protect against Lead-Induced ROS Formation, Mitochondrial Dysfunction, and Calcium Dysregulation in PC12 Cells. *Chemical Research in Toxicology*, n.9, v.16, p. 1155-1161, 2003.
- CRESPILHO, A. M.; NICHI, M.; GUAISTI, P. N., *et al.* Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, n.3-4, v.146, p. 126-133, 2014.
- DA SILVA, J. K.; SOUSA, P. J.; ANDRADE, E. H., *et al.* Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of Aniba canelilla (H.B.K.) Mez. *J Agric Food Chem*, n.23, v.55, p. 9422-9426, 2007.
- DA SILVA, S. L. and DE NARDI JUNIOR, G. PRODUÇÃO DE DERIVADOS BUBALINOS E MERCADO CONSUMIDOR. *Tekhne e Logos*, n.1, v.5, p. 15-30, 2014.
- DAHAM, A. F. and AL-HILFI, H. A. M. Effects of aqueous extract of catechin tea on some parameters of sperms and histopathological changes in testis of mice treated with Methotrexate (MTX). *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, n.2, v.1, p., 2010.
- DE LIMA, A. B.; SANTANA, M. B.; CARDOSO, A. S., *et al.* Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of Aniba canelilla essential oil. *Phytomedicine*, n.6-7, v.16, p. 555-559, 2009.
- DENG, Y.; YANG, G.; YUE, J., *et al.* Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*, v.38, p. 184-191, 2014.
- DEPPE, M.; PEZO, F.; REYES-DÍAZ, M., *et al.* Criopreservación de Espermatozoides de Canino con Extracto de Hojas de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *International Journal of Morphology*, n.2, v.34, p. 653-659, 2016.
- DESROCHES, N.; MCNIVEN, M. A.; FOOTE, K., *et al.* The effect of blueberry extracts and quercetin on capacitation status of stored boar sperm. *Cell Preservation Technology*, n.3, v.3, p. 165-168, 2005.
- DROST, M. Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology*, n.3, v.68, p. 447-449, 2007.
- EICHHOLZ, I.; HUYSKENS-KEIL, S. and ROHN, S. (2015). Chapter 21 - Blueberry Phenolic Compounds: Fruit Maturation, Ripening and Post-Harvest Effects A2 - Preedy, Victor. Processing and Impact on Active Components in Food. San Diego, Academic Press: 173-180.
- EL-SHARAWY, M.; EL-SHAMAA, I.; IBRAHIM, M., *et al.* Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of egyptian buffalo bull semen. *Scientific Papers, Animal Science, Series Dv*, v.55, p., 2012.
- EL-TAIEB, M. A.; ALI, M. A. and NADA, E. A. Oxidative stress and acrosomal morphology: A cause of infertility in patients with normal semen parameters. *Middle East Fertility Society Journal*, n.2, v.20, p. 79-85, 2015.
- EVENSON, D. and JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science*, n.2, v.22, p. 169-189, 2000a.
- EVENSON, D. and JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*, n.2-3, v.22, p. 169-189, 2000b.

- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Producción y productos lácteos. Búfalos de agua. Disponible em: <http://Www.Fao.Org/Agriculture/Dairy-Gateway/Produccion-Lechera/Animales-Lecheros/Bufalos-De-Agua/Es/> site acessado 8/8/2016
- FARRELL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C., *et al.* Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, n.4, v.49, p. 871-879, 1998.
- FREI, B. and HIGDON, J. V. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *The Journal of Nutrition*, n.10, v.133, p. 3275S-3284S, 2003.
- GALE, I.; GIL, L.; MALO, C., *et al.* Effect of Camellia sinensis supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. *Andrologia*, n.5, v.47, p. 505-512, 2015.
- GARG, A.; KUMARESAN, A. and ANSARI, M. R. Effects of Hydrogen Peroxide (H₂O₂) on Fresh and Cryopreserved Buffalo Sperm Functions During Incubation at 37°C In Vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, n.6, v.44, p. 907-912, 2009.
- GARNER, D. L. and JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*, n.2, v.53, p. 276-284, 1995.
- GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology*, n.1, v.57, p. 237-256, 2002.
- GOSÁLVEZ BERENGUER, J.; CABALLERO PEREGRÍN, P.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., *et al.* Fragmentación del ADN espermático. *Revista Internacional de Andrología*, n.3, v.6, p. 193-209, 2008.
- GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry*, n.5, v.11, p. 1537-1570, 1972.
- GOTTLIEB, O. R. and KUBITZKI, K. Chemosystematics of Aniba. *Biochemical Systematics and Ecology*, n.1, v.9, p. 5-12, 1981.
- GURLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMANN, M., *et al.* Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, n.2, v.86, p. 562-571, 2016.
- HENDRICKS, K. E. and HANSEN, P. J. Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa? *Theriogenology*, n.7, v.71, p. 1138-1146, 2009.
- HENRY, M.; BRITO, M. F.; LOAIZA-ECHEVERRI, A. M., *et al.* Scrotal Circumference Growth Curves of Buffalo Bulls of Different Breeds Raised in Brazil. *Editorial Board* p. 439, 2013.
- HOLT, W. and NORTH, R. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: Freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, n.3, v.230, p. 473-483, 1984.
- HOLT, W. V. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, n.3, v.9, p. 309-320, 1997.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, n.1-3, v.62, p. 3-22, 2000.
- HOUSTON, B.; CURRY, B. and AITKEN, R. J. Human spermatozoa possess an IL4I1 l-amino acid oxidase with a potential role in sperm function. *Reproduction*, n.6, v.149, p. 587-596, 2015.

- IZAGUIRRY, A. P.; SOARES, M. B.; VARGAS, L. M., *et al.* Blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) extract ameliorates ovarian damage induced by subchronic cadmium exposure in mice: Potential δ -ALA-D involvement. *Environmental Toxicology* p. n/a-n/a, 2015.
- KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; GHOSH, S. K., *et al.* Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to lipid peroxidation and semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, n.3, v.3, p. 210-217, 2014.
- KADIRVEL, G.; KUMAR, S. and KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science*, n.1–3, v.114, p. 125-134, 2009.
- KALT, W.; LAWAND, C.; RYAN, D. A., *et al.* Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, n.6, v.128, p. 917-923, 2003.
- KHAN, D. R.; AHMAD, N.; ANZAR, M., *et al.* Apoptosis in fresh and cryopreserved buffalo sperm. *Theriogenology*, n.5, v.71, p. 872-876, 2009.
- KHAN, M. I. R. and IJAZ, A. Effects of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. *animal*, n.04, v.2, p. 548-553, 2008.
- KHERADMAND GARMSIR, A.; ZAREH SHAHNEH, A.; ALI JALALI, S. M., *et al.* Effects of Dietary Thyme (*Thymus vulgaris*) and Fish Oil on Semen Quality of Miniature Caspian Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, n.9, v.34, p. 1069-1075, 2014.
- KIM, H. S.; QUON, M. J. and KIM, J. A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol*.2, p. 187-195, 2014.
- KIM, J.; CHA, Y. N. and SURH, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res*, n.1-2, v.690, p. 12-23, 2010.
- KIM, M. J.; CHUNG, J.-Y.; KIM, J. H., *et al.* Effects of cranberry powder on biomarkers of oxidative stress and glucose control in db/db mice. *Nutrition research and practice*, n.6, v.7, p. 430-438, 2013.
- KOCER, A.; HENRY-BERGER, J.; NOBLANC, A., *et al.* Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: Size matters. *Free Radical Biology and Medicine*.89, p. 993-1002, 2015.
- KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M., *et al.* Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, n.8, v.93, p. 3199-3207, 2008.
- KUMAR, R.; JAGAN MOHANARAO, G.; ARVIND, *et al.* Freeze–thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status. *Molecular Biology Reports*, n.3, v.38, p. 1499-1506, 2011.
- LANDAU, J. M.; LAMBERT, J. D. and YANG, C. S. (2006). CHAPTER 35 - Green Tea A2 - Heber, David. Nutritional Oncology (Second Edition). Burlington, Academic Press: 597-606.
- LARSON-COOK, K. L.; BRANNIAN, J. D.; HANSEN, K. A., *et al.* Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, n.4, v.80, p. 895-902, 2003.

- LIMA, M. d. P.; SILVA, T. M. D.; SILVA, J. D. d., *et al.* Essential oil composition of leaf and fine stem of Aniba canelilla (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. *Acta Amazonicav.*34, p. 329-330, 2004.
- LIU, C.-H.; DONG, H.-B.; MA, D.-L., *et al.* Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Animal Reproduction Sciencev.*164, p. 47-56, 2016.
- LIU, Q.; ZHOU, Y. F.; DUAN, R. J., *et al.* Effects of dietary n-6:n-3 fatty acid ratio and vitamin E on semen quality, fatty acid composition and antioxidant status in boars. *Animal Reproduction Sciencev.*162, p. 11-19, 2015.
- LOAIZA-ECHEVERRI, A. M.; CRUZ, B. C.; DAS NEVES SNOECK, P. P., *et al.* Low density lipoproteins added to an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting ovine sperm cells than when 16% whole egg yolk was added. *Semina: Ciências Agrárias*, n.3, v.36, p. 1315-1346, 2015.
- LUÑO, V.; GIL, L.; OLACIREGUI, M., *et al.* Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilising ability of boar sperm after cryopreservation. *Cryobiology*, n.1, v.69, p. 157-162, 2014.
- LYKKESFELDT, J. and SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, n.3, v.173, p. 502-511, 2007.
- MADAN, M. L.; DAS, S. K. and PALTA, P. Application of reproductive technology to buffaloes. *Animal Reproduction Science*, n.1, v.42, p. 299-306, 1996.
- MALHADO, C. H. M.; RAMOS, A. d. A.; CARNEIRO, P. L. S., *et al.* Melhoramento e estrutura populacional em bubalinos da raça Mediterrâneo no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileirav.*43, p. 215-220, 2008.
- MANDELKER, L. (2011). Oxidative Stress, Free Radicals, and Cellular Damage. Studies on Veterinary Medicine. L. Mandelker and P. Vajdovich. Totowa, NJ, Humana Press: 1-17.
- MANSOUR, N.; MCNIVEN, M. A. and RICHARDSON, G. F. The effect of dietary supplementation with blueberry, α -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology*, n.2, v.66, p. 373-382, 2006.
- MARTI, E.; MARTI, J. I.; MUINO-BLANCO, T., *et al.* Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl*, n.4, v.29, p. 459-467, 2008.
- MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P., *et al.* Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, n.1, v.71, p. 28-37, 2004.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T., *et al.* Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, n.6, v.77, p. 1129-1136, 2012.
- MEHDIPOUR, M.; DAGHIGH KIA, H.; NAJAFI, A., *et al.* Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, n.3, v.73, p. 297-303, 2016.
- MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y., *et al.* Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal Reproduction Science*, n.1-2, v.129, p. 44-49, 2011.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E., *et al.* Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, n.2, v.68, p. 204-212, 2007.

Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Disponível em http://www.agricultura.gov.br%2Farq_editor%2Ffile%2FDados%2520de%2520rebanho%2520bovino%2520e%2520bubalino%2520do%2520Brasil%25202015_site.pdf&usg=AFQjCNGBK3I-F6T4gkSeCLdp3DACn7dcWA site acessado 8/8/2016

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A., *et al.* Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, n.6, v.57, p. 1695-1706, 2002.

MUEEN AHMED, K. K. and BARAL, M. Tea Polyphenols as Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, n.2, v.1, p. 2-3, 2011.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S., *et al.* A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*, n.1-2, v.96, p. 21-29, 2006.

NARDI, G. M.; FARIAS JANUARIO, A. G.; FREIRE, C. G., *et al.* Anti-inflammatory Activity of Berry Fruits in Mice Model of Inflammation is Based on Oxidative Stress Modulation. *Pharmacognosy Res*, n.Suppl 1, v.8, p. S42-49, 2016.

NEVES, M. M.; HENEINE, L. G. D. and HENRY, M. Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.66, p. 769-777, 2014.

O'FLAHERTY, C.; BECONI, M. and BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, n.5, v.29, p. 269-275, 1997.

OGER, J.-M.; FARDEAU, A.; RICHOMME, P., *et al.* Nouveaux alcaloïdes isoquinoléiques isolés d'une Lauraceae bolivienne: Aniba canelilla HBK. *Canadian journal of chemistry*, n.8, v.71, p. 1128-1135, 1993.

OGER, J. M.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H., *et al.* Aniba canelilla (H.B.K.) Mez Essential Oil: Analysis of Chemical Constituents, Fungistatic Properties. *Journal of Essential Oil Research*, n.5, v.6, p. 493-497, 1994.

OLIVEIRA-FILHO, A.; FERNANDES, H. and ASSIS, T. Lauraceae's Family: A Brief Review of Cardiovascular Effects. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*.7, p. 22-26, 2015.

PARKS, J. E. and GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, n.2, v.38, p. 209-222, 1992.

PAWAR, K. and KAUL, G. Assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm DNA fragmentation using a sperm chromatin dispersion test. *Reprod Domest Anim*, n.6, v.46, p. 964-969, 2011.

PENG, C.; WANG, X.; CHEN, J., *et al.* Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int*.2014, p. 831841, 2014.

PERERA, B. Reproduction in Domestic Buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*.43, p. 200-206, 2008.

- PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D., *et al.* Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. *Food Chemv.*164, p. 81-88, 2014.
- PERVIN, M.; HASNAT, M. A. and LIM, B. O. Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, n.6, v.3, p. 444-453, 2013.
- POMARI, E.; STEFANON, B. and COLITTI, M. Effect of plant extracts on H₂O₂-induced inflammatory gene expression in macrophages. *Journal of inflammation researchv.*7, p. 103, 2014.
- PRESICCE, G. A. Reproduction in the Water Buffalo. *Reproduction in Domestic Animalsv.*42, p. 24-32, 2007.
- RACKOVA, L.; MAJEKOVA, M.; KOST'ALOVA, D., *et al.* Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. *Bioorg Med Chem*, n.17, v.12, p. 4709-4715, 2004.
- RASTEGARNIA, A.; SHAHVERDI, A.; TOPRAGGALEH, T. R., *et al.* Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell j (Yakhteh)*, n.4, v.14, p., 2013.
- RASUL, Z.; AHMAD, N. and ANZAR, M. Changes in Motion Characteristics, Plasma Membrane Integrity, and Acrosome Morphology During Cryopreservation of Buffalo Spermatozoa. *Journal of Andrology*, n.2, v.22, p. 278-283, 2001.
- RASUL, Z.; ANZAR, M.; JALALI, S., *et al.* Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, n.1-2, v.59, p. 31-41, 2000.
- REQUE, P. M.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A., *et al.* Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, n.1, v.33, p. 111-116, 2014.
- RHEMREV, J. P.; VAN OVERVELD, F.; HAENEN, G., *et al.* Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a postaddition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds. *Journal of Andrology*, n.6, v.21, p. 913-920, 2000.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. and PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, n.7, v.20, p. 933-956, 1996.
- RIIHINEN, K.; JAAKOLA, L.; KÄRENLAMPI, S., *et al.* Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, n.1, v.110, p. 156-160, 2008.
- ROSS, C.; MORRISS, A.; KHAIRY, M., *et al.* A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, n.6, v.20, p. 711-723, 2010.
- ROWLAND, L. and HAMMERSCHLAG, F. *Vaccinium* spp. blueberry. *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK p. 222-246, 2005.
- ROY, S. C. and ATREJA, S. K. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide by capacitating buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, n.3-4, v.103, p. 260-270, 2008.

- SABEUR, K. and BALL, B. A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction*, n.2, v.134, p. 263-270, 2007.
- SALAH, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G., *et al.* Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, n.2, v.322, p. 339-346, 1995.
- SAMPAIO, I. B. M. (1998). Estatística aplicada à experimentação animal, Fepmvz.
- SANSONE, G.; NASTRI, M. J. F. and FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, n.1-3, v.62, p. 55-76, 2000.
- SHAHIDI, F. (2015). 1 - Antioxidants: Principles and applications. Handbook of Antioxidants for Food Preservation. F. Shahidi, Woodhead Publishing: 1-14.
- SHEN, G.; XU, C.; HU, R., *et al.* Comparison of (-)-epigallocatechin-3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Pharmaceutical research*, n.11, v.22, p. 1805-1820, 2005.
- SHUKLA, S.; JHA, R. K.; LALORAYA, M., *et al.* Identification of non-mitochondrial NADPH oxidase and the spatio-temporal organization of its components in mouse spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun*, n.2, v.331, p. 476-483, 2005.
- SIDDIQ, M. and DOLAN, K. D. Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemv*.218, p. 216-220, 2017.
- SIEME, H.; OLDENHOF, H. and WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sciv*.169, p. 2-5, 2016.
- SILVA, G. (2012). Estudo do potencial biotecnológico de Aniba canelilla (HBK) Mez para formulação de cosméticos, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais)–Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas. Manaus.
- SILVA, J. R. d. A.; CARMO, D. F. M. d.; REIS, É. M., *et al.* Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*.20, p. 1071-1076, 2009.
- SILVA, S.; COSTA, E. M.; PEREIRA, M. F., *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of aqueous extracts from dry *Vaccinium corymbosum* extracts upon food microorganism. *Food Control*, n.2, v.34, p. 645-650, 2013.
- SINGH, B. N.; SHANKAR, S. and SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, n.12, v.82, p. 1807-1821, 2011.
- SMITH, M. A. L.; MARLEY, K. A.; SEIGLER, D., *et al.* Bioactive Properties of Wild Blueberry Fruits. *Journal of Food Science*, n.2, v.65, p. 352-356, 2000.
- SNOECK, P. P.; MOURA, L. C.; SILVA, M. C., *et al.* Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm cryopreservation. *Cryobiology*.75, p. 88-90, 2017.
- SOUSA, P. J. C.; ARAUJO, J. S.; PEREIRA, L. L. S., *et al.* Phytochemical and Toxicological Evaluations of the Essential Oil From the Bark of Aniba canellila (H.B.K.) Mez. *Journal of Essential Oil Research*, n.4, v.21, p. 381-384, 2009.

- SUKHATO, P.; THONGSODSEANG, S.; UTHA, A., *et al.* Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, n.1–2, v.67, p. 69-77, 2001.
- SURESH, K. P.; NANDI, S. and MONDAL, S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: A meta-analysis. *Theriogenology*, n.7, v.72, p. 978-985, 2009.
- TAVEIRA, F. S. N.; DE LIMA, W. N.; ANDRADE, E. H. A., *et al.* Seasonal essential oil variation of Aniba canelilla. *Biochemical Systematics and Ecology*, n.1, v.31, p. 69-75, 2003.
- THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J., *et al.* Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*, n.9, v.24, p. 2061-2070, 2009.
- TÖRRÖNEN, R.; HÄKKINEN, S.; KÄRENLAMPI, S., *et al.* Flavonoids and phenolic acids in selected berries. *Cancer Letters*, n.1, v.114, p. 191-192, 1997.
- UBEDA, A.; MONTESINOS, C.; PAYÁ, M., *et al.* Antioxidant Action of Benzylisoquinoline Alkaloids. *Free Radical Research Communications*, n.3, v.18, p. 167-175, 1993.
- VALE, J. K.; LIMA, A. B.; PINHEIRO, B. G., *et al.* Evaluation and Theoretical Study on the Anti-inflammatory Mechanism of 1-Nitro-2-phenylethane. *Planta medica*, n.08, v.79, p. 628-633, 2013.
- VALE, W. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo Journal* v.2, p. 65-81, 1994.
- VIEIRA, M. C.; CAVICHILOLO, J. R.; FACHINI, C., *et al.* Viabilidade econômica da implantação de uma unidade industrial para a produção de mozzarella e de massa coagulada, fermentada e congelada de leite de búfala. *Informações Econômicas*, n.10, v.39, p., 2009.
- VISHWANATH, R. and SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev*, n.3, v.9, p. 321-331, 1997.
- VISHWANATH, R. and SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, n.1–3, v.62, p. 23-53, 2000.
- VISINTIN, J.; ASSUMPÇÃO, M.; BARUSELLI, P., *et al.* Use of biotechnologies in buffalo bred in Brazil. *Proceedings of Third Course on Biotechnologies of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy. Bubalus Bubalis* v.4, p. 189-204, 1997.
- VOMHOF-DEKREY, E. E. and PICKLO, M. J., Sr. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem*, n.10, v.23, p. 1201-1206, 2012.
- WANG, H.; GUO, X.; HU, X., *et al.* Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Food Chem* v.217, p. 773-781, 2017.
- WANG, Z.-g.; YU, S.-d. and XU, Z.-r. Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocytes. *Animal Reproduction Science*, n.1–2, v.100, p. 22-31, 2007.
- WATSON, P. and MARTIN, I. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian journal of biological sciences*, n.2, v.28, p. 153-160, 1975.

- WATSON, P. F. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record*, n.1, v.97, p. 12-15, 1975.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.*, n.1031-3613 (Print), p., 1995.
- WEITZE, K. F. and PETZOLDT, R. Preservation of semen. *Animal Reproduction Science*, n.1-4, v.28, p. 229-235, 1992.
- WILLIAMS, E. J.; SIBLEY, K.; MILLER, A. N., *et al.* The effect of Escherichia coli lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *Am J Reprod Immunol*, n.5, v.60, p. 462-473, 2008.
- WITTAYARAT, M.; KIMURA, T.; KODAMA, R., *et al.* Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea polyphenol. *CryoLetters*, n.4, v.33, p. 318-326, 2012.
- WOLFE, K. L.; KANG, X.; HE, X., *et al.* Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem*, n.18, v.56, p. 8418-8426, 2008.
- YANG, G.-Y.; LIAO, J.; LI, C., *et al.* Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis*, n.11, v.21, p. 2035-2039, 2000.
- ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M., *et al.* Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, n.6, v.51, p. 675-683, 2007.
- ZEPEDA, A. B.; AGUAYO, L. G.; FUENTEALBA, J., *et al.* Blueberry extracts protect testis from hypobaric hypoxia induced oxidative stress in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012, p., 2012.
- ZHAO, M.; LIU, X.; LUO, Y., *et al.* Evaluation of protective effect of freeze-dried strawberry, grape, and blueberry powder on acrylamide toxicity in mice. *J Food Sci*, n.4, v.80, p. H869-874, 2015.
- ZHONG, R.-z. and ZHOU, D.-w. Oxidative Stress and Role of Natural Plant Derived Antioxidants in Animal Reproduction. *Journal of Integrative Agriculture*, n.10, v.12, p. 1826-1838, 2013.
- ZHU, Q. Y.; ZHANG, A.; TSANG, D., *et al.* Stability of Green Tea Catechins. *J Agric Food Chem*, n.12, v.45, p. 4624-4628, 1997.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 17. Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,5; 5 e 50 μ g/ml *Aniba canelilla*, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.

Parâmetro	Hora	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	Tris 10% LDL Aniba canelilla 0,5 ug/ml	Tris 10% LDL Aniba canelilla 5 ug/ml	Tris 10% LDL Aniba canelilla 50 ug/ml	p.valor
MT (%)	0 h	97,5 \pm 2,0 a	97,5 \pm 1,0 a	97,5 \pm 1,5 a	95,5 \pm 2,2 b	96,2 \pm 1,4 b	0.0006
	24 h	88,5 \pm 6,5 b	90,4 \pm 4,6 ab	92,6 \pm 4,1 a	88,6 \pm 5,0 b	92,5 \pm 4,9 a	0.0233
	48 h	63,0 \pm 17,9 b	74,5 \pm 14,4 a	62,3 \pm 19,9 b	70,8 \pm 13,0 a	75,4 \pm 13,3 a	0.0004
	72 h	30,7 \pm 15,2 c	40,1 \pm 23,0 ab	39,4 \pm 23,7 b	45,3 \pm 21,8 ab	46,6 \pm 26,6 a	0.0004
	96 h	15,0 \pm 13,7 b	20,5 \pm 17,4 ab	19,0 \pm 18,8 b	20,0 \pm 16,0 ab	25,8 \pm 22,2 a	0.0466
	120 h	5,2 \pm 10,5 b	9,2 \pm 11,3 b	8,3 \pm 10,2 b	9,8 \pm 11,8 b	17,0 \pm 14,0 a	0.0212
MP (%)	0 h	27,3 \pm 11,7 a	26,3 \pm 10,5 ab	23,4 \pm 10,0 b	22,7 \pm 9,9 b	24,2 \pm 9,0 b	0.0062
	24 h	36,1 \pm 11,2	38,5 \pm 12,1	36,1 \pm 12,1	36,9 \pm 12,5	42,1 \pm 11,8	0.3694
	48 h	21,3 \pm 11,7	24,5 \pm 7,5	23,1 \pm 13,3	25,4 \pm 9,0	27,8 \pm 10,1	0.1497
	72 h	9,3 \pm 6,6 c	10,0 \pm 7,5 c	11,3 \pm 9,0 bc	13,8 \pm 10,6 ab	16,2 \pm 12,4 a	0.0045
	96 h	3,7 \pm 3,8	5,4 \pm 5,1	5,4 \pm 5,9	5,7 \pm 5,5	8,4 \pm 8,5	0.0529
	120 h	1,3 \pm 2,7 b	2,3 \pm 2,9 b	1,8 \pm 2,8 b	2,7 \pm 3,5 ab	4,5 \pm 4,0 a	0.0152
Rápidos (%)	0 h	86,9 \pm 6,0	87,6 \pm 3,9	85,6 \pm 5,2	84,0 \pm 8,1	85,0 \pm 6,4	0.2023
	24 h	66,7 \pm 9,6 bc	70,2 \pm 10,6 ab	73,2 \pm 7,2 a	63,5 \pm 11,6 c	73,4 \pm 8,1 a	0.0038
	48 h	36,3 \pm 18,5 c	44,3 \pm 14,1 ab	39,0 \pm 19,7 bc	41,3 \pm 19,1 bc	49,6 \pm 15,7 a	0.0060
	72 h	12,6 \pm 9,2 c	16,1 \pm 13,3 bc	17,5 \pm 15,1 bc	20,6 \pm 15,2 ab	25,4 \pm 19,5 a	0.0011
	96 h	4,5 \pm 4,9	7,6 \pm 7,9	7,0 \pm 7,7	8,1 \pm 7,0	11,2 \pm 10,6	0.0664
	120 h	1,8 \pm 3,7	2,9 \pm 3,5	2,4 \pm 3,5	3,0 \pm 3,7	5,1 \pm 4,7	0.0727
VCL (μ m/s)	0 h	111,9 \pm 18,6	108,1 \pm 13,8	109,5 \pm 19,0	109,0 \pm 16,0	105,4 \pm 15,0	0.3064
	24 h	82,3 \pm 9,9 a	79,3 \pm 8,5 ab	85,1 \pm 10,6 a	74,0 \pm 11,2 b	81,2 \pm 8,6 a	0.0131
	48 h	61,3 \pm 14,1	64,1 \pm 10,3	65,1 \pm 15,1	61,0 \pm 14,4	68,4 \pm 12,0	0.2184
	72 h	46,2 \pm 13,1 b	44,3 \pm 12,1 b	48,1 \pm 14,1 b	49,0 \pm 10,4 ab	54,2 \pm 14,6 a	0.0088
	96 h	25,7 \pm 20,1	29,8 \pm 23,3	24,6 \pm 24,2	30,6 \pm 23,4	34,8 \pm 23,4	0.1877
	120 h	9,9 \pm 19,6	18,9 \pm 22,4	17,2 \pm 21,5	18,5 \pm 22,2	26,7 \pm 21,5	0.1199
VSL (μ m/s)	0 h	35,2 \pm 10,4	33,3 \pm 8,9	32,3 \pm 11,3	32,4 \pm 9,9	31,6 \pm 8,6	0.1508
	24 h	28,5 \pm 3,2	28,7 \pm 4,8	29,1 \pm 5,0	26,2 \pm 3,1	29,0 \pm 3,5	0.2574
	48 h	20,0 \pm 6,3	20,7 \pm 3,0	21,8 \pm 6,5	20,8 \pm 5,8	22,9 \pm 4,4	0.2772
	72 h	14,3 \pm 5,4 bc	13,1 \pm 4,3 c	15,2 \pm 5,2 bc	15,5 \pm 4,6 ab	17,8 \pm 6,0 a	0.0065
	96 h	7,8 \pm 6,4	9,1 \pm 7,2	8,1 \pm 8,3	10,0 \pm 8,1	11,6 \pm 8,9	0.2182
	120 h	3,1 \pm 6,1	6,3 \pm 7,9	5,6 \pm 7,7	6,2 \pm 7,6	8,8 \pm 7,6	0.1153
VAP (μ m/s)	0 h	67,1 \pm 13,1	64,6 \pm 10,6	64,4 \pm 15,0	64,9 \pm 12,8	63,0 \pm 12,2	0.5069
	24 h	45,4 \pm 4,4 a	45,7 \pm 6,6 a	48,2 \pm 7,4 a	40,6 \pm 5,9 b	45,2 \pm 4,2 a	0.0130
	48 h	32,1 \pm 9,1	33,6 \pm 6,5	35,1 \pm 9,2	32,5 \pm 9,4	36,5 \pm 6,5	0.2823
	72 h	23,3 \pm 7,6 b	22,1 \pm 6,7 b	24,5 \pm 8,2 b	25,1 \pm 6,6 ab	28,0 \pm 8,4 a	0.0183
	96 h	12,8 \pm 10,3	15,0 \pm 11,9	12,9 \pm 12,9	16,0 \pm 12,4	18,6 \pm 13,3	0.1568
	120 h	5,0 \pm 9,9	10,0 \pm 12,2	9,3 \pm 12,1	9,6 \pm 11,6	13,7 \pm 11,3	0.1379
LIN (%)	0 h	31,5 \pm 7,7	30,8 \pm 7,0	29,1 \pm 6,8	29,8 \pm 7,2	30,1 \pm 6,6	0.0907
	24 h	35,0 \pm 5,1	36,4 \pm 6,1	34,5 \pm 6,3	36,0 \pm 5,6	36,1 \pm 5,6	0.7738
	48 h	32,2 \pm 6,1	32,5 \pm 3,6	33,2 \pm 5,0	33,9 \pm 3,5	33,7 \pm 4,3	0.7901
	72 h	30,1 \pm 6,2	29,3 \pm 3,3	31,3 \pm 4,7	31,4 \pm 4,2	32,4 \pm 2,8	0.1810
	96 h	20,2 \pm 15,8	20,2 \pm 15,3	18,3 \pm 18,2	21,4 \pm 16,5	24,7 \pm 16,5	0.2419
	120 h	6,9 \pm 13,7	14,7 \pm 18,2	14,0 \pm 17,6	14,9 \pm 17,9	21,5 \pm 16,7	0.0667
BCF (Hz)	0 h	11,1 \pm 1,0 ab	11,6 \pm 0,9 a	10,6 \pm 0,8 b	11,1 \pm 1,5 ab	11,3 \pm 1,3 a	0.0144
	24 h	10,7 \pm 1,0	11,5 \pm 1,1	11,3 \pm 1,3	10,7 \pm 1,0	11,2 \pm 0,8	0.0542
	48 h	9,9 \pm 1,4	9,9 \pm 0,9	10,1 \pm 1,5	10,0 \pm 1,5	10,5 \pm 1,3	0.5636
	72 h	8,2 \pm 3,1	8,4 \pm 0,9	8,9 \pm 1,4	9,1 \pm 1,2	9,7 \pm 1,2	0.3015
	96 h	4,7 \pm 3,8	6,1 \pm 4,7	4,9 \pm 4,8	5,4 \pm 4,5	6,5 \pm 5,0	0.2246
	120 h	2,0 \pm 3,9 b	3,9 \pm 4,7 ab	3,6 \pm 4,5 ab	3,8 \pm 4,6 ab	6,0 \pm 4,8 a	0.0482

Médias seguidas por letras diferentes na linha indicam diferença estatística entre tratamentos (P<0.05).

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, Rápidos, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade linear progressiva, VAP: velocidade média do trajeto, LIN: linearidade, BCF: frequência de batimento flagelar.

ANEXO 2

Tabela 18. Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 10, 50 e 100 μ g de blueberry/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.

Parâmetro	Hora	Tris 10% LDL			p. valor	
		Tris 10% LDL	Blueberry 10 μ g/ml	Blueberry 50 μ g/ml		Blueberry 100 μ g/ml
MT (%)	0 h	95,70 \pm 1,7	95,95 \pm 2,7	93,76 \pm 6,3	93,74 \pm 6,1	0.2595
	24 h	89,37 \pm 7,8	90,44 \pm 5,0	91,04 \pm 5,0	91,39 \pm 5,1	0.5899
	48 h	73,33 \pm 10,1	77,50 \pm 11,5	76,18 \pm 10,8	76,59 \pm 10,2	0.4890
	72 h	40,62 \pm 19,2 b	56,84 \pm 17,4 a	56,48 \pm 17,5 a	51,79 \pm 18,0 a	0.0015
	96 h	22,98 \pm 17,9 b	34,70 \pm 22,7 a	36,36 \pm 19,6 a	34,12 \pm 21,5 a	0.0058
	120 h	6,65 \pm 8,8	12,53 \pm 18,6	10,30 \pm 13,1	13,72 \pm 24,7	0.3282
MP (%)	0 h	36,5 \pm 13,0	36,4 \pm 11,2	36,2 \pm 14,1	35,68 \pm 12,9	0.9853
	24 h	37,5 \pm 14,5 c	45,4 \pm 10,5 b	47,8 \pm 12,9 ab	52,66 \pm 12,9 a	<.0001
	48 h	25,7 \pm 6,3 b	33,4 \pm 9,6 a	34,3 \pm 11,4 a	31,32 \pm 9,1 a	0.0088
	72 h	12,8 \pm 7,4 b	19,1 \pm 7,5 a	19,1 \pm 6,6 a	16,76 \pm 8,2 a	0.0037
	96 h	6,2 \pm 5,3 b	11,5 \pm 9,2 a	11,5 \pm 7,1 a	12,14 \pm 9,6 a	0.0104
	120 h	0,7 \pm 1,4	2,5 \pm 5	1,9 \pm 3	3,95 \pm 7,7	0.1431
Rápidos (%)	0 h	75,5 \pm 6,2	77,1 \pm 7,3	75,8 \pm 10,3	76,07 \pm 8,1	0.9600
	24 h	65,4 \pm 13,4	64,9 \pm 9,7	69,0 \pm 9,6	69,60 \pm 14,1	0.3686
	48 h	46,4 \pm 10,9	47,1 \pm 14,4	47,4 \pm 14,6	48,42 \pm 15,6	0.9271
	72 h	19,6 \pm 15,1 b	28,9 \pm 14,9 a	29,2 \pm 14,5 a	26,73 \pm 17,6 a	0.0015
	96 h	9 \pm 9,7 b	15,4 \pm 16,8 a	17,1 \pm 15,4 a	17,93 \pm 18,3 a	0.0206
	120 h	1,4 \pm 3,0	4,8 \pm 9,8	3,1 \pm 5,1	5,07 \pm 11,3	0.2538
VCL (μ m/s)	0 h	108,4 \pm 16,6	107,3 \pm 19,4	108,0 \pm 15,5	109,2 \pm 15,9	0.9690
	24 h	75,4 \pm 10,1	74,1 \pm 8,3	77,0 \pm 8,2	75,3 \pm 12,6	0.7468
	48 h	69,0 \pm 10,9	64,9 \pm 9,5	64,7 \pm 10,9	66,5 \pm 13,6	0.9271
	72 h	52,9 \pm 11,5	57,0 \pm 10,5	56,2 \pm 9,6	55,2 \pm 11,7	0.2227
	96 h	42,4 \pm 9,6 b	46,2 \pm 12,0 a	50,5 \pm 12,0 a	53,2 \pm 12,1 a	0.0027
	120 h	14,3 \pm 18,5	17,4 \pm 24,7	16,3 \pm 22,1	15,4 \pm 24,2	0.5420
VSL (μ m/s)	0 h	45,7 \pm 16,3	44,0 \pm 10,3	43,9 \pm 12,4	43,7 \pm 11,7	0.8910
	24 h	28,8 \pm 7,7 b	31,3 \pm 6,1 ab	33,3 \pm 7,6 a	34,3 \pm 8,5 a	0.0099
	48 h	24,2 \pm 5,2	24,5 \pm 4,5	24,8 \pm 4,8	24,2 \pm 5,5	0.9758
	72 h	17,6 \pm 3,5	19,8 \pm 4,1	19,1 \pm 2,7	18,6 \pm 4,0	0.1245
	96 h	13,7 \pm 3,3 b	16,2 \pm 4,1 ab	17,0 \pm 3,9 a	18,5 \pm 5,0 a	0.0126
	120 h	3,8 \pm 5,6	5,0 \pm 8,0	4,8 \pm 7,1	4,9 \pm 7,8	0.3200
VAP (μ m/s)	0 h	72,5 \pm 17,0	70,7 \pm 12,9	71,5 \pm 12,3	70,4 \pm 12,1	0.9358
	24 h	44,5 \pm 7,7	44,2 \pm 6,0	46,5 \pm 6,7	46,6 \pm 9,1	0.4566
	48 h	39,0 \pm 7,0	35,9 \pm 5,5	36,2 \pm 6,0	36,7 \pm 7,8	0.3945
	72 h	28,2 \pm 6,5	30,6 \pm 6,0	29,6 \pm 4,4	29,2 \pm 6,1	0.3881
	96 h	22,3 \pm 5,3 b	24,7 \pm 6,3 ab	26,1 \pm 6,9 a	27,9 \pm 8,0 a	0.0223
	120 h	7,1 \pm 9,5	8,4 \pm 12,8	8,0 \pm 11,0	7,8 \pm 12,2	0.7675
LIN (%)	0 h	41,5 \pm 11,0	41,3 \pm 9,0	40,8 \pm 10,3	39,8 \pm 8,9	0.6764
	24 h	38,0 \pm 6,8 b	42,0 \pm 5,4 a	43,1 \pm 7,5 a	45,3 \pm 6,8 a	0.0025
	48 h	35,0 \pm 4,7 b	37,7 \pm 3,8 a	38,3 \pm 3,7 a	36,3 \pm 2,1 ab	0.0354
	72 h	33,4 \pm 1,8	34,8 \pm 3,9	34,2 \pm 3,5	33,8 \pm 2,9	0.7355
	96 h	32,5 \pm 5,1	35,2 \pm 3,5	33,7 \pm 2,5	34,5 \pm 3,8	0.4988
	120 h	10,8 \pm 13,7	10,7 \pm 14,2	11,5 \pm 15,1	10,4 \pm 15,7	0.8618
BCF (Hz)	0 h	9,8 \pm 1,2	10,3 \pm 1,0	10,3 \pm 1,3	10,3 \pm 1,1	0.1939
	24 h	11,0 \pm 1,0	11,2 \pm 0,9	11,5 \pm 0,7	11,1 \pm 1,3	0.5707
	48 h	10,8 \pm 1,4	10,4 \pm 0,8	10,3 \pm 1,2	10,3 \pm 1,3	0.3611
	72 h	10,0 \pm 1,0	9,7 \pm 1,0	9,3 \pm 0,6	9,5 \pm 0,7	0.0810
	96 h	9,9 \pm 1,4 ab	9,9 \pm 1,0 ab	9,3 \pm 0,6 b	10,1 \pm 1,7 a	0.5252
	120 h	1,8 \pm 3,6	2,9 \pm 4,5	3,0 \pm 4,7	2,8 \pm 4,4	0.1102

Médias seguidas por letras diferentes na linha indicam diferença estatística entre tratamentos (P<0.05).

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, Rápidos: velocidade curvilínea, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade linear progressiva, VAP: velocidade média do trajeto, LIN: linearidade, BCF: frequência de batimento flagelar.

ANEXO 3

Tabela 19. Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL contendo 0,05; 5 e 50 μ g/ml de Polifenol de chá, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.

Parâmetro	Hora	Tris 10% LDL		Tris 10% LDL		Tris 10% LDL		p. valor		
		Tris 10% LDL	Polifenol de chá verde 0,05 ug/ml	Polifenol de chá verde 5 ug/ml	Polifenol de chá verde 50 ug/ml					
MT (%)	0 h	94,2 \pm 4,5	a	91,5 \pm 5,5	bc	94,9 \pm 2,3	a	83,9 \pm 12,4	c	<0,0001*
	24 h	90,0 \pm 7,7	a	89,9 \pm 6,3	a	87,6 \pm 13,0	a	64,8 \pm 24,0	b	0,0061*
	48 h	78,1 \pm 11,7		76,6 \pm 11,6		71,9 \pm 12,8		37,1 \pm 30,4		0,0616*
	72 h	48,1 \pm 17,8	a	46,6 \pm 17,4	a	48,1 \pm 18,5	a	15,5 \pm 23,9	b	0,0014
	96 h	28,4 \pm 11,0	a	26,5 \pm 16,0	a	20,8 \pm 18,7	ab	8,4 \pm 17,1	b	0,0322
	120 h	12,7 \pm 13,9		14,0 \pm 13,1		12,4 \pm 14,9		3,1 \pm 9,2		0,1238
MP (%)	0 h	28,4 \pm 7,9		30,3 \pm 9,6		37,3 \pm 13,4		31,4 \pm 17,6		0,3910
	24 h	42,3 \pm 14,0	a	47,5 \pm 11,5	a	44,3 \pm 13,9	a	17,4 \pm 24,0	b	0,0005
	48 h	30,8 \pm 12,5	a	33,7 \pm 9,1	a	30,3 \pm 9,1	a	8,5 \pm 13,8	b	<0,001
	72 h	15,7 \pm 8,3	a	17,1 \pm 7,0	a	16,0 \pm 9,6	a	5,1 \pm 9,3	b	0,0064
	96 h	7,8 \pm 5,7	a	6,3 \pm 5,2	a	6,3 \pm 6,8	a	1,5 \pm 3,0	b	0,0190
	120 h	4,2 \pm 6,5		4,2 \pm 4,3		4,1 \pm 5,7		0,6 \pm 1,7		0,0918
Rápidos (%)	0 h	76,1 \pm 6,4	ab	72,8 \pm 12,1	bc	77,1 \pm 8,9	a	56,1 \pm 22,4	c	0,0007*
	24 h	62,5 \pm 17,3		66,9 \pm 11,6		63,3 \pm 17,3		30,5 \pm 33,3		0,1603*
	48 h	46,5 \pm 16,0	a	47,9 \pm 10,8	a	42,3 \pm 13,9	a	12,5 \pm 20,2	b	<0,0001
	72 h	24,0 \pm 12,2	a	21,9 \pm 10,1	a	22,3 \pm 14,1	a	6,1 \pm 10,3	b	0,0015
	96 h	10,5 \pm 6,1		9,1 \pm 9,6		8,8 \pm 10,0		2,7 \pm 6,1		0,1063
	120 h	4,6 \pm 6,6		5,0 \pm 5,7		5,0 \pm 6,5		0,7 \pm 2,1		0,0682
VCL (μ m/s)	0 h	91,6 \pm 14,8	a	88,1 \pm 16,9	a	88,4 \pm 19,2	a	60,6 \pm 16,8	b	<0,0001
	24 h	71,2 \pm 10,0		73,5 \pm 8,3		70,6 \pm 11,2		46,6 \pm 22,4		0,1603*
	48 h	62,5 \pm 10,9	a	63,5 \pm 6,5	a	60,6 \pm 10,6	a	32,0 \pm 15,6	b	<0,0001
	72 h	54,2 \pm 8,3	a	51,2 \pm 5,5	a	50,8 \pm 11,8	a	14,8 \pm 22,5	b	0,0010*
	96 h	46,0 \pm 8,2	a	40,9 \pm 12,0	a	36,7 \pm 20,9	a	8,6 \pm 17,5	b	<0,0001
	120 h	26,5 \pm 21,9	a	28,2 \pm 22,8	a	25,3 \pm 24,7	a	4,0 \pm 11,9	b	0,0124
VSL (μ m/s)	0 h	30,8 \pm 6,8	a	31,5 \pm 8,6	a	32,7 \pm 7,4	a	21,6 \pm 9,6	b	0,0003
	24 h	29,0 \pm 5,7		31,7 \pm 5,7		29,0 \pm 7,0		17,0 \pm 14,7		0,1409*
	48 h	22,9 \pm 5,7	a	24,8 \pm 3,2	a	22,9 \pm 4,2	a	8,7 \pm 7,4	b	<0,0001
	72 h	18,7 \pm 4,2	a	19,3 \pm 4,0	a	18,2 \pm 6,0	a	5,1 \pm 8,3	b	<0,0001
	96 h	14,7 \pm 3,9	a	12,4 \pm 3,5	a	11,9 \pm 7,6	a	2,6 \pm 5,1	b	<0,0001
	120 h	9,3 \pm 9,2	a	9,6 \pm 7,7	a	8,3 \pm 8,6	a	1,2 \pm 3,5	b	0,0122
VAP (μ m/s)	0 h	54,6 \pm 9,7	a	53,4 \pm 12,3	a	53,4 \pm 12,3	a	33,8 \pm 12,1	b	<0,0001
	24 h	42,1 \pm 6,4		44,2 \pm 5,9		41,2 \pm 8,2		28,3 \pm 15,8		0,1080*
	48 h	35,4 \pm 6,9	a	36,6 \pm 3,9	a	34,2 \pm 6,4	a	17,6 \pm 8,8	b	<0,0001
	72 h	29,6 \pm 5,9	a	28,2 \pm 4,4	a	28,0 \pm 8,1	a	8,0 \pm 12,3	b	<0,0001
	96 h	24,0 \pm 5,3	a	20,7 \pm 6,6	a	19,0 \pm 11,4	a	4,1 \pm 8,3	b	<0,0001
	120 h	13,9 \pm 12,6	a	14,6 \pm 11,9	a	13,3 \pm 13,4	a	2,1 \pm 6,2	b	0,0154
LIN (%)	0 h	33,6 \pm 4,7		35,5 \pm	a	37,4 \pm 5,7		34,4 \pm 5,6		0,2850
	24 h	40,6 \pm 4,2	ab	43,0 \pm 5,0	a	40,6 \pm 5,6	ab	31,2 \pm 13,3	b	0,0394*
	48 h	36,5 \pm 6,1	a	39,2 \pm 4,9	a	38,0 \pm 4,3	a	23,2 \pm 9,8	b	<0,0001
	72 h	34,5 \pm 4,4	a	37,7 \pm 6,1	a	35,4 \pm 7,8	a	11,3 \pm 17,6	b	0,0061*
	96 h	31,8 \pm 5,4	a	30,6 \pm 4,0	a	26,9 \pm 12,7	a	6,7 \pm 13,3	b	<0,0001
	120 h	22,4 \pm 18,5	a	22,7 \pm 17,3	a	18,1 \pm 17,8	a	3,2 \pm 9,7	b	0,0113
BCF (Hz)	0 h	10,8 \pm 0,8	a	11,2 \pm 1,2	a	11,5 \pm 0,6	a	8,4 \pm 2,1	b	<0,0001
	24 h	10,7 \pm 1,0	ab	11,6 \pm 1,0	a	10,7 \pm 1,5	ab	6,4 \pm 3,9	b	0,0246*
	48 h	10,3 \pm 1,2	a	10,5 \pm 0,9	a	10,1 \pm 1,1	a	4,0 \pm 4,0	b	0,004*
	72 h	9,6 \pm 0,9	a	9,7 \pm 1,1	a	9,6 \pm 1,6	a	2,7 \pm 4,1	b	0,0004*
	96 h	9,3 \pm 0,7	a	7,8 \pm 2,6	a	7,2 \pm 4,1	a	1,7 \pm 3,5	b	0,0001
	120 h	5,2 \pm 4,5	a	5,8 \pm 4,4	a	4,8 \pm 4,8	a	0,9 \pm 2,7	b	0,0225

Médias seguidas por letras diferentes na linha indicam diferença estatística entre tratamentos (P<0.05).

*Valores obtidos pelo teste de Friedman. MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, Rápidos, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade linear progressiva, VAP: velocidade média do trajeto, LIN: linearidade, BCF: frequência de batimento flagelar.

ANEXO 4

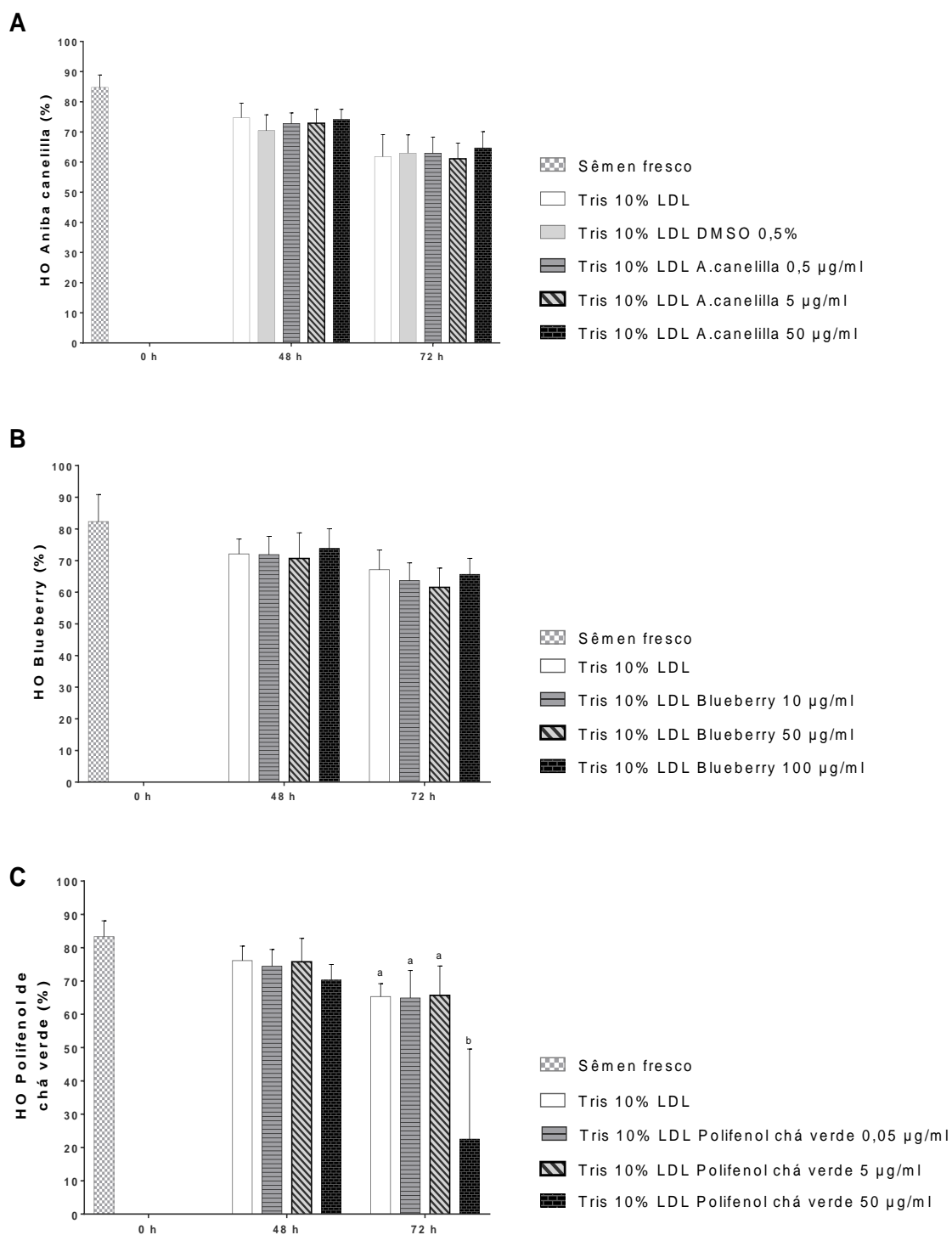


Figura 13. Médias (\pm DP) de espermatozoides de búfalos (n=9) reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática avaliados pelo teste hiposmótico (HO). A) *A. canelilla*; B) Blueberry; C) Polifenol de chá verde.

ANEXO 5

Tabela 20. Médias (\pm DP) da cinética de espermatozoides de búfalos (n=9) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado *A. canelilla* 50 μ g/ml; blueberry 50 μ g/ml e polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml, resfriados a 5°C e avaliados a cada 24 horas.

Parâmetro	Hora	Tris 10% LDL	Tris 10% LDL DMSO 0,5%	Tris 10% LDL Aniba canelilla 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Blueberry 50 μ g/ml	Tris 10% LDL Polifenol de chá verde 0,05 μ g/ml	p. valor
MT (%)	0 h	96,4 \pm 1,5	95,2 \pm 2,5	95,3 \pm 3,6	97,0 \pm 1,1	96,3 \pm 1,8	0.2537
	24 h	91,7 \pm 3,9 a	88,8 \pm 5,7 b	93,1 \pm 4,8 a	91,2 \pm 5,2 ab	92,0 \pm 2,8 a	0.0464
	48 h	61,7 \pm 22,3 c	70,4 \pm 19,7 b	79,2 \pm 17,3 a	70,0 \pm 15,6 b	71,1 \pm 16,5 b	0.0021
	72 h	41,0 \pm 23,2 b	44,7 \pm 22,4 b	59,3 \pm 21,8 a	47,4 \pm 18,3 b	48,6 \pm 20,1 b	0.0011
	96 h	24,5 \pm 28,3	28,1 \pm 25,7	37,1 \pm 17,9	30,7 \pm 20,1	24,5 \pm 17,9	0.2150
	120 h	11,5 \pm 17,9 c	13,3 \pm 16,3 c	31,6 \pm 23,3 b	38,5 \pm 29,7 a	11,8 \pm 14,4 c	0.0013
MP (%)	0 h	22,8 \pm 15,9	20,3 \pm 13,2	20,0 \pm 10,3	20,4 \pm 12,0	21,9 \pm 14,4	0.9258
	24 h	38,2 \pm 13,0 b	35,7 \pm 12,5 b	45,5 \pm 14,0 a	41,8 \pm 15,9 ab	41,4 \pm 14,2 ab	0.0369
	48 h	26,4 \pm 13,8 c	30,3 \pm 15,5 bc	39,6 \pm 13,4 a	28,6 \pm 13,4 c	33,3 \pm 9,9 ab	0.0021
	72 h	13,5 \pm 8,7 b	16,1 \pm 10,5 b	21,1 \pm 12,1 a	16,5 \pm 9,8 b	16,8 \pm 9,4 ab	0.0308
	96 h	6,6 \pm 8,4 b	8,2 \pm 8,2 b	13,8 \pm 9,9 a	7,4 \pm 4,8 b	5,9 \pm 5,0 b	0.0093
	120 h	2,2 \pm 3,8 b	2,2 \pm 2,7 b	8,6 \pm 5,9 a	13,7 \pm 12,5 a	2,7 \pm 3,6 b	0.0007
Rápidos (%)	0 h	80,2 \pm 5,7	77,7 \pm 9,4	78,1 \pm 10,9	82,8 \pm 6,9	83,7 \pm 5,6	0.2553
	24 h	64,6 \pm 7,6	61,1 \pm 9,2	69,0 \pm 6,6	65,2 \pm 12,0	67,8 \pm 8,6	0.1724
	48 h	34,2 \pm 17,1 c	40,7 \pm 15,5 bc	50,3 \pm 16,3 a	39,6 \pm 15,9 bc	41,2 \pm 15,3 b	0.0018
	72 h	17,5 \pm 12,7 b	21,1 \pm 13,1 b	32,2 \pm 15,9 a	22,3 \pm 11,4 b	20,8 \pm 10,4 b	0.0001
	96 h	11,1 \pm 18,3	11,3 \pm 11,9	16,7 \pm 10,4	13,5 \pm 10,9	7,6 \pm 7,5	0.1456
	120 h	4,1 \pm 6,6 b	4,0 \pm 5,9 b	12,7 \pm 11,4 a	18,9 \pm 15,0 a	3,1 \pm 4,5 b	0.0008
VCL (μ m/s)	0 h	95,6 \pm 15,9	90,7 \pm 15,1	97,8 \pm 20,6	96,1 \pm 19,2	95,0 \pm 17,7	0.5945
	24 h	68,7 \pm 7,8	65,4 \pm 8,0	71,7 \pm 6,7	70,5 \pm 14,8	70,2 \pm 8,8	0.0823
	48 h	58,0 \pm 11,5	59,8 \pm 9,4	64,5 \pm 11,4	60,5 \pm 14,0	60,7 \pm 11,3	0.1298
	72 h	46,7 \pm 9,1 b	50,0 \pm 10,4 b	57,1 \pm 10,1 a	50,8 \pm 9,1 b	47,5 \pm 8,1 b	0.0001
	96 h	26,2 \pm 27,4 c	31,5 \pm 24,6 bc	45,2 \pm 19,6 a	38,4 \pm 24,1 ab	32,1 \pm 19,4 bc	0.0096
	120 h	15,7 \pm 23,6 b	18,1 \pm 22,2 b	35,8 \pm 21,5 a	35,9 \pm 27,2 a	17,8 \pm 21,5 b	0.0158
VSL (μ m/s)	0 h	27,6 \pm 10,0	25,6 \pm 10,8	27,3 \pm 10,7	27,9 \pm 13,3	28,7 \pm 12,5	0.6162
	24 h	25,3 \pm 4,8 bc	24,2 \pm 5,0 c	28,9 \pm 5,9 a	27,5 \pm 9,3 ab	27,0 \pm 5,4 abc	0.0419
	48 h	21,3 \pm 4,2 b	21,8 \pm 4,1 b	25,6 \pm 6,4 a	21,9 \pm 6,9 b	24,1 \pm 5,0 ab	0.0453
	72 h	16,0 \pm 3,6 b	17,5 \pm 3,4 ab	19,6 \pm 4,1 a	17,1 \pm 3,9 b	17,0 \pm 2,9 b	0.0356
	96 h	8,2 \pm 8,6 b	10,1 \pm 7,9 b	16,3 \pm 8,8 a	11,8 \pm 7,1 b	10,1 \pm 6,1 b	0.0043
	120 h	4,5 \pm 6,8 b	5,0 \pm 6,0 b	12,1 \pm 7,2 a	12,1 \pm 9,1 a	5,1 \pm 6,2 b	0.0017
VAP (μ m/s)	0 h	57,4 \pm 12,1	54,0 \pm 11,9	58,2 \pm 15,0	57,2 \pm 14,9	58,0 \pm 14,2	0.6402
	24 h	39,1 \pm 5,0	37,5 \pm 5,7	41,8 \pm 5,5	41,0 \pm 11,8	41,3 \pm 6,2	0.2029
	48 h	31,3 \pm 6,6	32,7 \pm 5,4	36,4 \pm 7,8	32,9 \pm 8,5	34,6 \pm 7,6	0.0678
	72 h	24,5 \pm 5,9 b	26,9 \pm 5,8 b	31,1 \pm 6,2 a	26,7 \pm 5,9 b	25,7 \pm 5,1 b	0.0005
	96 h	13,3 \pm 14,0 c	16,1 \pm 12,6 bc	24,2 \pm 11,5 a	19,8 \pm 12,3 ab	16,6 \pm 9,9 bc	0.0045
	120 h	7,9 \pm 11,9 b	8,8 \pm 10,8 b	18,9 \pm 11,5 a	19,0 \pm 14,4 a	8,7 \pm 10,7 b	0.0070
LIN (%)	0 h	29,0 \pm 10,2	28,0 \pm 9,3	27,7 \pm 8,0	28,3 \pm 8,5	29,5 \pm 9,1	0.9250
	24 h	37,1 \pm 6,8	37,1 \pm 6,9	40,3 \pm 7,5	38,8 \pm 8,0	38,7 \pm 6,6	0.1558
	48 h	36,9 \pm 4,9 b	36,7 \pm 6,7 b	39,6 \pm 6,1 a	36,0 \pm 6,2 b	39,8 \pm 4,5 a	0.0161
	72 h	34,3 \pm 4,8	35,1 \pm 3,5	34,3 \pm 4,6	33,4 \pm 3,2	36,0 \pm 4,4	0.3486
	96 h	17,5 \pm 16,7 b	21,5 \pm 16,2 b	31,3 \pm 13,3 a	24,3 \pm 14,5 ab	24,8 \pm 14,6 ab	0.0439
	120 h	9,5 \pm 14,4 c	12,5 \pm 14,9 bc	26,5 \pm 15,4 a	22,4 \pm 17,0 ab	12,6 \pm 15,0 bc	0.0089
BCF (%)	0 h	10,4 \pm 0,9	10,7 \pm 1,1	10,7 \pm 1,1	11,0 \pm 1,3	11,0 \pm 1,5	0.4174
	24 h	11,5 \pm 0,7	11,5 \pm 0,9	11,7 \pm 0,8	11,6 \pm 0,7	11,7 \pm 1,0	0.8364
	48 h	10,5 \pm 0,7	10,6 \pm 0,9	10,8 \pm 1,0	10,3 \pm 1,4	10,8 \pm 1,1	0.5107
	72 h	9,5 \pm 0,9	9,7 \pm 1,4	10,3 \pm 1,0	9,9 \pm 1,4	10,1 \pm 0,9	0.1670
	96 h	5,2 \pm 5,0	6,4 \pm 4,9	9,1 \pm 3,6	7,6 \pm 4,6	6,6 \pm 3,8	0.0636
	120 h	3,0 \pm 4,5 c	3,5 \pm 4,2 bc	7,6 \pm 4,4 a	6,6 \pm 5,0 ab	3,7 \pm 4,5 bc	0.0181

Médias seguidas por letras diferentes na linha indicam diferença estatística entre tratamentos (P<0.05).

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, Rápidos, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade linear progressiva, VAP: velocidade média do trajeto, LIN: linearidade, BCF: frequência de batimento flagelar.

ANEXO 6

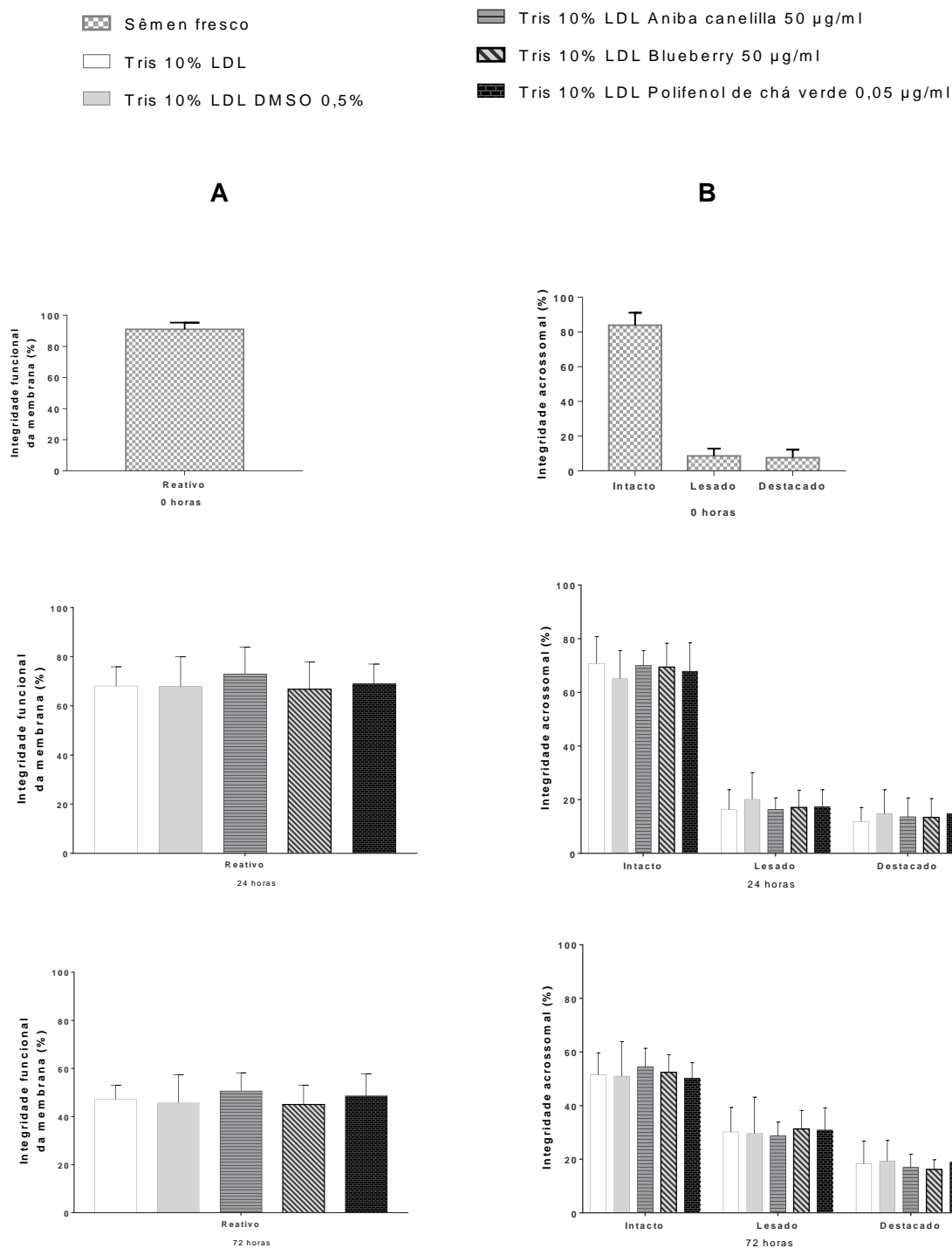


Figura 14. Médias (\pm DP) da integridade funcional da membrana plasmática e integridade acrossomal de espermatozoides de búfalos ($n=9$) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 µg/ml, blueberry 50 µg/ml e polifenol de chá verde 0,05 µg/ml, resfriados a 5°C. segunda fase A) Espermatozoides reativos ao teste de integridade funcional de membrana plasmática (teste hiposmótico). B) Integridade acrossomal (coloração de Giemsa).

ANEXO 7

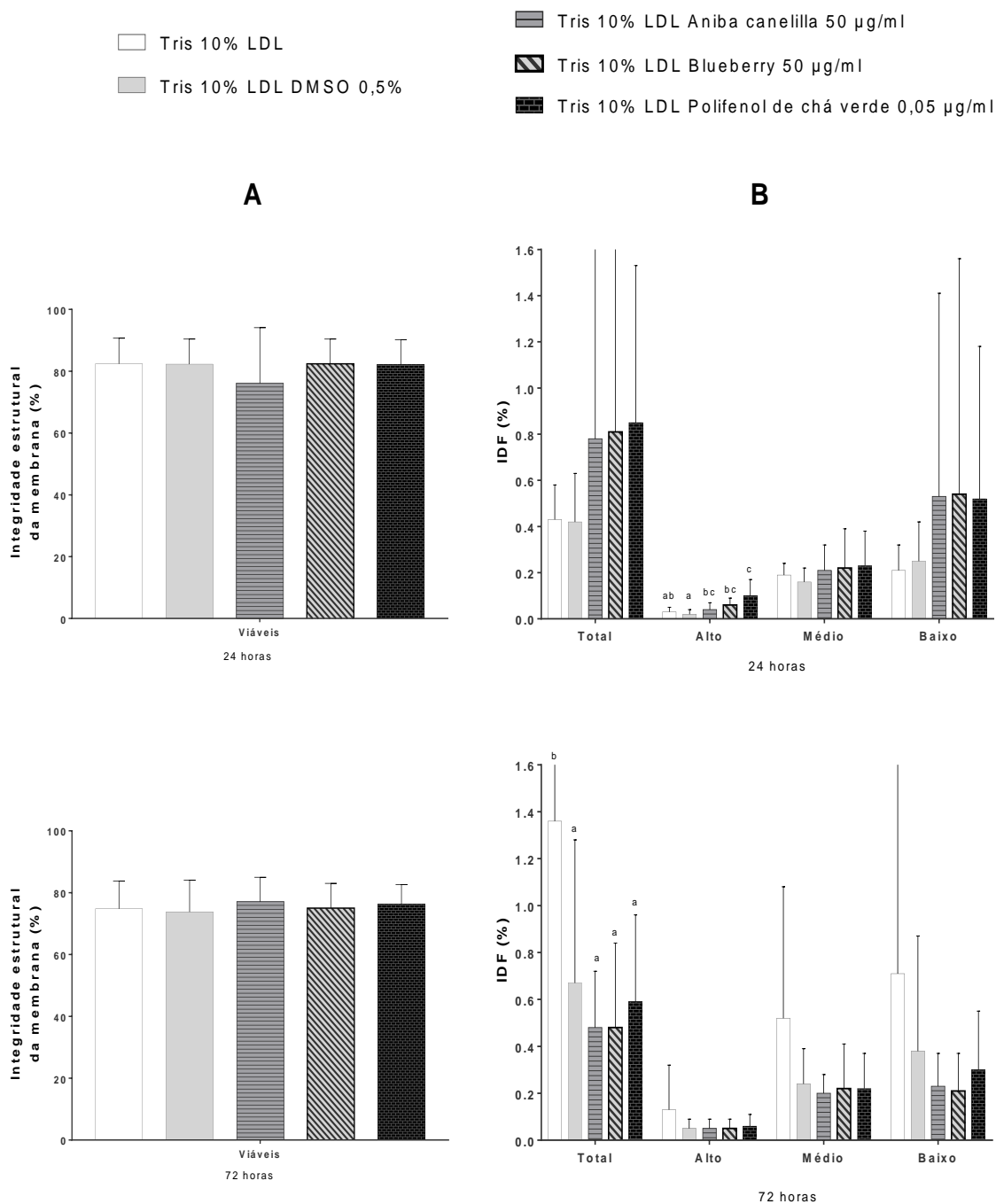


Figura 15. Médias (\pm DP) da integridade estrutural da membrana plasmática e índice de fragmentação da cromatina de espermatozoides de búfalos ($n=9$) diluídos em meio à base tris 10% LDL adicionado A. canelilla 50 µg/ml; blueberry 50 µg/ml e polifenol de chá verde 0,05 µg/ml. A) Espermatozoides positivos ao teste de integridade estrutural da membrana plasmática avaliado mediante citometria de fluxo (sonda PI/SBYR). B) Índice de fragmentação de cromatina de espermatozoides de búfalos, avaliados mediante citometria de fluxo (sonda AO)