



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

FRANCIELLEM THAIUINA DE SOUZA SILVA

**ESTUDO DA VIABILIDADE DO EXTRATO DA CASTANHA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa*) NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO**

**BELÉM - PA
2017**

FRANCIELLEM THAIUINA DE SOUZA SILVA

**ESTUDO DA VIABILIDADE DO EXTRATO DA CASTANHA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa*) NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dsc. Kaliandra Souza Alves

BELÉM - PA
2017

FRANCIELLEM THAIUNA DE SOUZA SILVA

**ESTUDO DA VIABILIDADE DO EXTRATO DA CASTANHA-DO-BRASIL
(Bertholletia excelsa) NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia: área de concentração Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kaliandra Souza Alves

Aprovado em 23 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luis Rennan Sampaio Oliveira (Presidente – Externo ao Programa)
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Rafael Mezzomo (Membro Titular)
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues (Membro Titular)
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente (Membro Titular)
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

LISTA DE TABELAS

	Pág	
Tabela 1	Composição dos meios experimentais utilizados na congelamento de sêmen bovino	50
Tabela 2	Composição química do extrato da castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>), utilizado no meio diluidor na criopreservação de sêmen de touros Nelore	50
Tabela 3	Composição em ácidos graxos das frações lipídicas obtidas a partir do extrato da castanha-do-brasil	51
Tabela 4	Valores relativos à morfologia espermática e teste hiposmótico (HOST) de sêmen criopreservado de touros Nelore	52
Tabela 5	Integridade da membrana plasmática avaliada pela análise de epifluorescência, de acordo com a concentração de extrato de castanha-do-brasil em substituição à gema de ovo.	53
Tabela 6	Correlação entre células espermáticas com membrana plasmática íntegra, semilesados e lesada com o potencial de membrana mitocondrial	54
Tabela 7	Motilidade espermática do sêmen de touros Nelore após diluição e durante o teste de termorresistência (TTR) após descongelamento	55
Tabela 8	Vigor (escala de 0-5) de espermatozoides de touros Nelore após diluição e durante o teste de termorresistência rápido (TTR)	56
Tabela 9	Coefficiente de variação dos parâmetros da cinética espermática obtidos pelo sistema de análise computadorizada da motilidade espermática no sêmen de touros da raça Nelore	57
Tabela 10	Média da taxa de clivagem obtida na fertilização in vitro utilizando sêmen criopreservado com e sem extrato de castanha-do-brasil	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem, unidade de razão na base 100
<	Símbolo matemático que indica valores inferiores
>	Símbolo matemático que indica valores superiores
±	Símbolo utilizado entre as unidades estatísticas de média e desvio padrão
®	Marca registrada
µg	Micrograma, unidade de medida de massa
µL	Microlitro, unidade de medida de volume
ACP102c	Água de coco em pó
ALH	Amplitude de deslocamento lateral de cabeça
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência de batimentos
CASA	Computer-assisted sperm analysis
CCOs	Complexo cúmulos oócito
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIV	Cultivo in vitro
cm	Centímetro, unidade de medida de comprimento
CO ₂	Gás dióxido de carbono
CV	Coefficiente de variação
cv.	Cultivar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FDA	Diacetato de 6-carboxifluoresceína
FIV	Fecundação in vitro
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas, unidade de medida de massa
GSH	Glutathiona reduzida
h	Hora, medida de tempo
HOST	Teste hipomótico
IP	Iodeto de propídio
Kg	Quilograma, unidade de medida de massa

LDL	Lipoproteínas de baixa densidade – Low density lipoproteins
LH	Hormônio luteinizante
LIN	Linearidade
m	Metro, unidade de medida de comprimento
mg	Miligrama, unidade de medida de massa
MIV	Maturação in vitro
mL	Mililitro, unidade de medida de volume
mm	Milímetro, unidade de medida de comprimento
mM	Milimolar
MM	Membrana mitocondrial
mOsm	Miliosmol
MP	Membrana plasmática
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
ng	Nanograma
n°	Número
°C	Graus Celsius
P	Símbolo estatístico que denota grau de significância entre as variáveis estudadas
PB	Proteína bruta
ppb	Partes por bilhão
ROS	Espécies reativas do oxigênio
rpm	Rotação por minuto
SAS	Statistical Analysis System
Se	Micromineral selênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluído sintético do oviduto
STR	Retilinearidade
TrxRs	Tioredoxina redutase
TTR	Teste de termorresistência
v/v	Volume/volume
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva

RESUMO

A criopreservação de sêmen é amplamente utilizada para aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto valor genético e zootécnico, entretanto, os protocolos utilizados resultam em considerável número de espermatozoides que sofrem algum tipo de lesão devido a formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide e toxicidade dos crioprotetores. Dessa forma, objetivou-se avaliar a viabilidade do uso do extrato da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) na elaboração do meio crioprotetor em substituição à gema de ovo na criopreservação de sêmen bovino. Os tratamentos experimentais consistiram em 0, 25, 50, 75 e 100% de substituição da gema de ovo pelo extrato da castanha-do-brasil em meio crioprotetor, estabelecendo-se a mesma concentração de água destilada e Tryladil em todas as diluições. Foram utilizados cinco touros da raça Nelore com idades entre 24 e 36 meses, sendo o método para obtenção do material a eletroejaculação. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, considerando-se bloco cada animal, sendo assim definido por cinco blocos, cinco tratamentos e cinco repetições, sendo essa última os ejaculados. Os espermatozoides foram contabilizados em câmara de Neubauer para continuamente serem realizadas as diluições nos tratamentos experimentais e envase. Em seguida, as palhetas foram seladas, resfriadas, congeladas e armazenadas à -196°C . Após a descongelação, as amostras foram avaliadas quanto à morfologia, cinética (teste de termorresistência e análise computadorizada – CASA), integridade de membranas (teste hiposmótico e epifluorescência), e posteriormente Fertilização in vitro (FIV). Utilizou-se o teste contraste de regressão para os dados paramétricos e para os não paramétricos o Kruskal Wallis, ambos à 5% de significância. Foi utilizado o teste correlação de Pearson simples entre células íntegras ou lesadas com o potencial de membrana mitocondrial. Na análise morfológica, os defeitos menores e totais apresentaram efeito linear crescente em função da substituição, mostrando que à medida que aumentou-se a concentração do extrato, maior foi a quantidade de células que apresentaram defeitos; no teste hiposmótico observou-se efeito linear decrescente resultando em maior número de células com membranas lesadas à medida que foi substituindo a gema pelo extrato de castanha. Comportamento semelhante foi observado na análise de integridade de membranas por meio da epifluorescência, verificando-se maior número de células sem potencial de membrana mitocondrial e que apresentaram lesões quando substituiu-se 100% a gema de ovo pelo extrato. O teste de termorresistência apresentou efeito quadrático para motilidade nas horas zero e uma e efeito linear na segunda hora do teste; entretanto, o vigor apresentou diferença apenas na segunda hora, em função da substituição da gema de ovo pelo extrato de castanha-do-brasil. Também foi observado efeito quadrático para as motilidades total e progressiva avaliadas pelo CASA e taxa de clivagem na FIV, sendo todos os resultados influenciados negativamente com a substituição da gema de ovo pelo extrato da castanha-do-brasil. Dessa forma, a substituição da gema de ovo pelo extrato de castanha-do-brasil demonstrou não ser eficiente na criopreservação do sêmen, indicando que a fração de LDL da gema é imprescindível. Além disso, o teor de selênio encontrado no extrato foi considerado elevado e tóxico aos espermatozoides.

Palavras-chave: Antioxidante. Congelamento de sêmen. Castanha-do-brasil. Membrana plasmática.

ABSTRACT

Semen cryopreservation is widely used to increase the reproductive potential of animals of high genetic and zootechnical value; however, the protocols used result in a considerable number of spermatozoa that suffer some kind of lesion due to the formation of ice crystals, oxidative injuries, alterations On the sperm membrane and cryoprotective toxicity. The objective of this study was to evaluate the feasibility of the use of Brazil nut extract (*Bertholletia excelsa*) in the elaboration of the cryoprotective medium in substitution of egg yolk for cryopreservation of bovine semen. Experimental treatments consisted of 0, 25, 50, 75 and 100% replacement of the egg yolk by Brazil nut extract in cryoprotectant medium, with the same concentration of distilled water and Tryladil being established at all dilutions. Five bulls of the Nelore breed were used between 24 and 36 months, being the method to obtain the material the electroejaculation. The experimental design was a randomized complete block design, with five blocks, five treatments and five replications. The spermatozoa were counted in the Neubauer chamber to continuously carry out the dilutions in the experimental and packaging treatments. The blades were then sealed, cooled, frozen and stored at -196 ° C. After thawing, the samples were evaluated for morphology, kinetics, membrane integrity (HOST and epifluorescence), and then IVF. The regression test was used for the parametric data and for the non-parametric Kruskal Wallis, both at 5% significance. We used the simple Pearson correlation test between intact or damaged cells with mitochondrial membrane potential. In the morphological analysis, the minor and total defects had an increasing linear effect as a function of the substitution, showing that as the concentration of the extract was increased, the number of defects was higher; In the HOST test, a linear decreasing effect was observed, resulting in a larger number of cells with damaged membranes as it replaced the yolk with the chestnut extract. Similar behavior was observed in the membrane integrity analysis through epifluorescence, with a higher number of cells without mitochondrial membrane potential and lesions when 100% egg yolk was replaced by the extract. TTR showed quadratic effect for motility at zero hours and one and linear effect at the second hour of the test; However, the vigor presented difference only in the second hour, due to the replacement of the egg yolk with the Brazilian nut extract. It was also observed a quadratic effect for the total and progressive motilities evaluated by the CASA and cleavage rate in the IVF, all of which were negatively influenced by the substitution of the egg yolk for the Brazil nut extract. Thus, the substitution of the egg yolk for Brazil nut extract was not efficient in semen cryopreservation, indicating that the LDL fraction of the yolk is essential. In addition, the selenium content found in the extract was considered high and toxic to spermatozoa.

Keywords: Antioxidant. Freezing of semen. Brazil nuts. Plasma membrane.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	7
ABSTRACT	8
SUMÁRIO	9
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	11
1.1 1.1 Estrutura do espermatozoide e membrana plasmática	11
1.2 1.2 Criopreservação de sêmen bovino	12
1.3 Crioprotetores	14
1.4 Castanha-do-brasil	16
1.4.1 Selênio e sua função antioxidante	18
REFERÊNCIAS	19
ESTUDO DA VIABILIDADE DO EXTRATO DA CASTANHA-DO-BRASIL (Bertholletia excelsa) NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO	24
RESUMO	24
ABSTRACT	25
2 INTRODUÇÃO	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	27
3.2 Locais e período do experimento	27
3.3 Manejo dos animais e colheita de sêmen	28
3.4 Tratamentos experimentais	28
3.5 Preparo do extrato da castanha-do-brasil	29
3.6 Composição química do extrato da castanha	30
3.7 Diluição e criopreservação do sêmen	30
3.8 Descongelamento do sêmen criopreservado	31
3.8.1 Morfologia espermática	31
3.8.2 Teste Hiposmótico (HOST)	31
3.8.3 Análise de epifluorescência	32
3.8.4 Teste de termorresistência	32
3.8.5 Avaliação da motilidade espermática por meio do sistema computadorizado	33

3.8.6	Avaliação da fertilidade in vitro do sêmen de acordo com os tratamentos	33
3.8.6.1	Obtenção e maturação de ovócitos	33
3.8.6.2	Fecundação in vitro e Cultivo in vitro	34
3.15	Análise de aflatoxinas	35
3.10	Análise estatística	35
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO	59

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O uso de biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial, fecundação *in vitro* e transferência de embriões permite o aumento da produção na pecuária. No entanto, essas técnicas necessitam de gametas masculinos viáveis provenientes do sêmen fresco ou criopreservado (MUIÑO et al. 2007)

A criopreservação de sêmen apresenta algumas vantagens, como por exemplo, o aumento do potencial reprodutivo dos machos, evita a perda de material genético de animais de alto valor zootécnico, comercialização de sêmen e formação de bancos de germoplasmas. Porém, as células espermáticas normalmente sofrem lesões durante o processo, devido às trocas de temperatura e substâncias utilizadas no meio crioprotetor (AMIRAT-BRIAND et al. 2009).

Os crioprotetores comumente utilizados são o glicerol e a gema de ovo, os quais são necessários para manter a capacidade de fertilização dos espermatozoides após o processo de congelação/descongelação (SANGEETA et al. 2015). Entretanto, apesar dos efeitos benéficos, a gema de ovo favorece o processo de oxidação da bicamada lipídica dos espermatozoides promovendo a lesão da mesma, o que ocasiona a perda da capacidade seletiva da membrana plasmática. Além disso, há o risco à biossegurança por ser um produto de origem animal (LAYEK et al. 2016).

Para que a célula consiga fertilizar o óvulo é necessário que a mesma apresente movimento progressivo, seja capaz de produzir energia (ATP) e mantenha as membranas plasmática e acrosomal íntegras (ANDRABI, 2007). A alteração de qualquer uma dessas características durante o processamento de criopreservação provavelmente, comprometerá a capacidade de fertilização (LAYEK et al. 2016).

1.3 Estrutura do espermatozoide e membrana plasmática

O espermatozoide é formado por meio do processo denominado espermatogênese, o qual divide-se em espermatocitogênese (caracterizado pela multiplicação mitótica das espermatogônias) e espermiogênese (momento em que ocorre divisões meióticas consecutivas, resultando em células haploides denominadas espermátides, que

posteriormente serão espermatozoides) (KAYA & MEMILI, 2016). Em sua fisiologia normal, esse tipo de célula é formado por dois componentes principais: cabeça e cauda, tendo como junção o colo (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A cabeça é de formato arredondado e achatado, onde se encontra o núcleo. Em sua região frontal tem-se o acrossoma, constituído por duas membranas formadas por glicoproteínas e açúcares (HAFEZ & HAFEZ, 2004; FLESCHE & GADELLA, 2000). A cauda/flagelo é formada pelo axonema central, contendo nove pares de microtúbulos localizados radialmente ao redor de dois microtúbulos centrais (MORTIMER, 2000). Na peça intermediária, está presente o axonema e as mitocôndrias, que se encontram arranjadas em espiral e são essenciais para a produção e disponibilização de energia (ATP) durante o batimento flagelar.

Após sua formação o espermatozoide possui como parte de sua estrutura as membranas plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial, que são agregados de lipídios e proteínas formadas durante a espermatogênese (CELEGHINI, 2005), período em que essas células possuem no citoplasma organelas essenciais à síntese proteica, como complexo de golgi e retículo endoplasmático (HOLT, 2000).

A membrana plasmática (MP) é formada por uma bicamada lipídica, constituída por proteínas, glicoproteínas, fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol (NELSON et al. 2014).

Esse tipo de membrana é o componente mais externo da célula espermática, exercendo papel importante em sua sobrevivência e manutenção da capacidade fertilizante. Além disso, garante a homeostase celular (CELEGHINI, 2005). Sua estrutura possui a forma de um modelo fluido-mosaico devido às interações do tipo covalente entre proteínas e lipídios, que ao se ligarem, são denominadas proteínas integrais ou periféricas. As integrais atuam como canais através da membrana, liberadas apenas por solventes ou detergentes. As periféricas, por outro lado, são solúveis em diluidores seminais e água, podendo ser removidas facilmente (BORGES et al. 2011). Esse modelo é caracterizado pela fluidez da membrana, que em temperatura ambiente apresenta o estado conhecido como líquido-cristalino. Entretanto, essa fluidez pode ser alterada devido a proporção colesterol:lipídeos, tipos de lipídeos e temperatura. Sabe-se que quanto mais colesterol, menos flexível e permeável se torna a membrana (PINHO et al. 2014).

1.4 Criopreservação de sêmen bovino

A criobiologia pode ser definida como o ramo da biologia que estuda os efeitos de baixas temperaturas em células, tecidos e organismos vivos (SILVA & GUERRA, 2011). Na reprodução o uso dessa técnica tornou-se mais acentuado após a descoberta do glicerol como crioprotetor, há quase 70 anos, possibilitando o rápido desenvolvimento de técnicas de criopreservação, bem como possíveis soluções crioprotetoras (MORRELL & RODRIGUES-MARTINEZ, 2011). Seu uso possibilita o armazenamento seminal de diferentes espécies, por meio de um banco de material genético, o qual pode ser utilizado na produção *in vitro* de embriões e/ou inseminação artificial (BOSCARATO & MARTINS, 2014).

A criopreservação consiste nas etapas de resfriamento, equilíbrio e congelação que apesar de serem executadas de forma gradual, são capazes de causar diversos danos celulares, implicando negativamente na fertilidade quando comparada a do sêmen fresco (MUIÑO et al. 2007). Os danos sofridos pelas células durante a criopreservação são principalmente: I – a formação de cristais de gelo intracelular; II – a toxicidade dos crioprotetores. O primeiro é decorrente da alta instabilidade da água intracelular durante o resfriamento (5°C), tornando esse fenômeno, o principal responsável pela ruptura da membrana (MAZUR, 1970). Uma segunda via de formação dos cristais de gelo é o crescimento de microcristais provenientes da recristalização durante a descongelação (SALLE et al. 2002). Durante o processo de congelação, o sêmen passa por uma grande variação de temperatura até que alcance o ponto de congelação. Consequentemente, a membrana plasmática tem seu estado alterado, deixando de apresentar uma consistência líquida ou fluida, gerando uma organização mais rígida (cristalina ou gel) devido à transição dos lipídios presentes na bicamada (BADYAKAR & CHAKRABARTY, 2014). Esse acontecimento pode ser explicado pelo fato das cadeias de ácidos graxos que antes encontravam-se dispostas desordenadamente, passam a apresentar-se paralelamente, promovendo esse estado de rigidez e consequentemente, a membrana torna-se susceptível às lesões (HOFFMANN et al. 2011).

O segundo dano mais provável refere-se a toxidez dos crioprotetores, os quais provocam lesões severas à membrana plasmática promovendo a lise da célula. Vários fatores podem fazer dos crioprotetores substâncias tóxicas, como por exemplo, a própria substância presente no crioprotetor, a concentração utilizada, as interações de substâncias (crioprotetor x membrana da célula) que podem desencadear a toxidez de outros compostos.

Outro fator importante a ser considerado na criopreservação é a taxa de congelação a ser utilizada, que em síntese, quando lenta permite a desidratação celular, a fim de compensar a concentração extracelular de sais. Em contrapartida, esse mecanismo de desidratação promove o aumento de sais intracelular levando a um possível choque osmótico (efeito solução). No entanto, quando realizada de forma rápida resulta em células que não tiveram tempo suficiente para desidratar culminando na formação de gelo intracelular, causando lesões na membrana. Dessa forma, a congelação deve ser lenta suficientemente para evitar a formação de gelo intracelular e rápida o suficiente para evitar o choque osmótico (ANZAR et al. 2011).

Na espécie bovina, entre as fases de resfriamento (5°C) e congelação (-120°C) do sêmen se faz necessário o tempo de equilíbrio, com o intuito de melhorar os resultados após a descongelação. Inicialmente, pensava-se que esse período fosse necessário para ocorrer uma maior interação do glicerol com célula espermática. Entretanto, já é sabido que essa penetração ocorre facilmente, levando a considerar que o tempo de equilíbrio é imprescindível para que haja melhor adaptação das membranas espermáticas às baixas temperaturas. Nessa espécie, normalmente utiliza-se o tempo de 4h para em seguida, prosseguir a congelação. O principal objetivo dessa etapa é garantir o transporte de água, reduzindo a formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação (MUIÑO et al. 2007).

1.3 Crioprotetores

Os crioprotetores são solventes orgânicos, cuja finalidade é preservar as células e/ou tecidos contra as injúrias durante o processo de criopreservação. Entretanto, quando são usados inapropriadamente podem ser tóxicos. Entre os efeitos causados, estão os danos osmóticos, injúrias bioquímicas (desnaturação e inativação de enzimas e alteração das bombas de íons) e outros danos na estrutura celular (BARBAS & MASCARENHAS, 2009). Assim, um crioprotetor considerado eficiente é aquele que apresenta baixo risco de toxicidade para a célula e alta solubilidade em água. Visando maior eficácia da técnica, essa substância deve ser adicionada ao meio diluidor possibilitando maior proteção ao espermatozoide durante a congelação e descongelação (AMIRAT-BRIAND et al. 2009).

Os crioprotetores são classificados como intracelulares (permeáveis) e extracelulares (impermeáveis). Os intracelulares atuam retirando a água da célula e diminuindo a temperatura dentro da mesma, além de evitar a formação de cristais de gelo.

Dentre os mais utilizados estão o glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e etilenoglicol (SALEM & GOMA, 2014).

Os crioprotetores intracelulares agem como solventes, os quais possuem ponto de congelação menor que a água, o que os torna de congelação mais lenta quando comparados a congelação da água. Por a água congelar primeiro, formam-se os cristais de gelo e entre esses cristais encontram-se canais de diluidor/crioprotetor, permitindo a afluência de espermatozoides. Além disso, a osmolaridade do meio extracelular é elevada, pois se tem uma concentração de soluto resultando no egresso de água da célula e desidratação celular, permitindo que o espermatozoide diminua seu volume (passagem de água ocorre mais rapidamente quando comparada ao crioprotetor), resultando em congelação satisfatória (HOLT, 2000; WATSON, 2000).

Diferentemente, os crioprotetores extracelulares não conseguem penetrar a célula, agindo de forma a recobrir a superfície celular, estabilizando a membrana, ajudando, portanto, a minimizar os danos celulares causados pelo processo de congelação (SANGEETA et al. 2015). Tradicionalmente, o crioprotetor extracelular utilizado para espécie bovina é a gema de ovo, sua eficiência é atribuída à vasta porção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que é composta por um centro lipídico (triglicérides e colesterol) circundado por proteínas e fosfolípidios. A LDL tem ação direta na membrana plasmática disponibilizando fosfolípidios e colesterol, conferindo estabilidade e inibindo as crioinjúrias derivadas da criopreservação, além de se ligar a algumas proteínas do plasma seminal inibindo sua toxicidade (BERGERON et al. 2004; VARELA JUNIOR et al. 2009; BITTENCOURT et al. 2013).

Apesar de a gema de ovo ser o crioprotetor externo mais utilizado, tem sido testado substâncias que a substitua, na tentativa de suprimir alguns fatores intrínsecos como: o risco de contaminação bacteriana, visto que esse é um produto de origem animal; combater as endotoxinas produzidas por tais contaminantes, culminando na redução do potencial fertilizante das células; e por fim, a gema possibilita a presença de vacúolos lipídicos interferindo na avaliação microscópica (LAYEK et al. 2016). Além dos fatores citados, buscam-se por substâncias que garantam ação antioxidante aos espermatozoides, combatendo o excesso de espécies que metabolizam o oxigênio (ROS).

Portanto, na literatura verifica-se que a utilização da fração isolada de LDL após esterilização em substituição à gema de ovo, promoveu diminuição na carga microbiana sem alterar a sua composição, garantindo a biossegurança durante a criopreservação, sem modificação da atividade espermática (PILLET et al. 2011). Outros autores também

utilizando a LDL, perceberam melhoria nas taxas de motilidade, integridade da membrana plasmática e acrossomal ao utilizar-se concentração de 8% de LDL, além de maior potencial antioxidante sobre os espermatozoides (HU et al. 2011).

Na avaliação do efeito da própolis e o ácido ascórbico (ambos com função antioxidante) sobre a criopreservação de sêmen caprino verificou-se resultados satisfatórios com o ácido ascórbico, o qual garantiu a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides, tornando-se uma alternativa na composição de diluentes para espermatozoides dessa espécie animal. Por outro lado, a própolis não alcançou os mesmos efeitos, além de ter causado toxicidade às células quando utilizadas as concentrações de 0,25 e 0,5% (CASTILHO et al. 2009).

Na espécie ovina, o sêmen criopreservado com os diluidores TRIS e água de cocô em pó (ACP-102c), apresentou diferença estatística nos parâmetros percentuais de motilidade, porém, integridade acrossomal e os parâmetros quantitativos (VCL e VAP) e qualitativos (LIN e STR) de velocidade, logo após descongelamento, não diferiram. Possivelmente, melhores resultados seriam obtidos com o aprimoramento da formulação da ACP-102c, em estudos de congelação de sêmen (CAVALCANTE et al. 2014).

Diante do exposto, pode-se inferir que estudos como os citados acima demonstram a possível substituição da gema de ovo por alternativas que garantam a biossegurança da criopreservação, sem afetar a qualidade espermática e permitam maior efeito antioxidante. Nesse contexto, acredita-se que produtos de origem vegetal possuam capacidade de atuar de forma semelhante à gema de ovo na congelação de sêmen, como por exemplo, os frutos oriundos da flora amazônica, como açaí, tucumã e castanha-do-brasil.

A amêndoa da castanha-do-brasil é um produto de origem vegetal, considerado energético devido sua alta composição lipídica, seu teor proteico é relativamente aceitável e em sua composição mineral tem-se o selênio que ligado às proteínas possibilita condições favoráveis às células contra o estresse oxidativo (STOCKLER-PINTO et al. 2008).

1.4 Castanha-do-brasil

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) pertencente à família das Lecythidaceae é uma planta nativa da Amazônia conhecida como castanha verdadeira, castanheiro, castanha-do-pará, castanha-do-maranhão, etc. Esta espécie por muito tempo

tem sido uma das mais importantes para a exploração extrativista, especialmente na região Norte (MARTINS et al. 2008; COSTA et al. 2009; MARTINS et al. 2011).

A maior parte da produção é exportada para a Europa e América do Norte, países em que a semente é apreciada como “delicatessen” (FELBERG et al. 2004). A amêndoa da castanheira possui alto valor nutritivo, além de ser rica em minerais como cálcio e fósforo contribuindo positivamente no equilíbrio de funções celulares (FREITAS-SILVA & VENANCIO, 2011).

Recentemente foi comprovado que a amêndoa também é rica em selênio (Se), mineral com ação antioxidante (SAFA et al. 2016). Verifica-se na literatura diversos valores de selênio em amêndoas da castanha-do-brasil: $3,6 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ (PAREKH et al. 2008), $3,44 \mu\text{g/g}$ (FELBERG et al. 2004), $11,48 \pm 0,779 \text{ g/g}$ (SANTOS et al. 2013) com possibilidade de utilização durante a criopreservação devido a presença do selênio.

Em estudo com misturas proteicas utilizando-se a farinha da castanha-do-brasil e isolado proteico de soja, verificou-se que a farinha da amêndoa apresentou 45% de proteína bruta (PB), sendo semelhante ao teor de proteína da farinha de soja (47%), porém maior que a própria amêndoa da castanha-do-brasil (18,22%). O valor encontrado (45% de PB) foi atribuído pelos autores à extração de gordura das amêndoas, que após este processo de retirada dos lipídeos, os demais componentes da matéria seca, como por exemplo, o teor de proteína das amostras, ficam concentrados elevando o valor dos mesmos (SANTOS et al. 2012). Esses dados corroboram com os encontrados por Souza e Meneses (2004), que em estudo com a amêndoa e torta de castanha-do-Brasil, visando identificar seus parâmetros de qualidade constataram teor de PB maior na torta (40,23%) do que na amêndoa (14, 29%), devido ao desengorduramento parcial da torta.

O processo de desengorduramento parcial da castanha-do-brasil possibilita a retirada do excesso de gordura, o qual pode facilitar a formação de vacúolos lipídicos, possivelmente o que dificulta a visualização microscópica das células. Portanto, a retirada parcial de componente lipídeos é essencial ao processo de congelação de sêmen. Entretanto, essa gordura retirada (principalmente os ácidos graxos poli-insaturados) poderia ser benéfica na criopreservação de sêmen, pois assim como a gema de ovo (que é rica em lipoproteínas de baixa densidade), podem atuar como responsáveis na resistência dos espermatozoides ao choque térmico. Além disso, a gordura presente na castanha-do-brasil evitaria a perda de lipídios pela membrana plasmática (MUNIZ et al. 2015; IAFFALDANO et al. 2014; LAYEK et al. 2016).

1.4.1 – Selênio e sua função antioxidante

O selênio é um mineral que atua diretamente no crescimento, fertilidade e prevenção de várias doenças, além de estar relacionado a diferentes funções enzimáticas e metabólicas (BERNO et al. 2010). Em sua ação antioxidante tem-se presente a enzima glutathiona peroxidase que quando em estado reduzido (GSH) mantém as proteínas estáveis, reduz ligações dissulfetos (induzidas pelo estresse oxidativo) e neutraliza os radicais livres (ROS - reactive oxygen species) (LI-GUANGA et al. 2010). Esses efeitos podem exercer função protetora na estrutura da membrana espermática, atuando diretamente nos lipídeos dessa membrana para evitar a peroxidação.

As espécies reativas do metabolismo do oxigênio são átomos, moléculas ou íons que contém em sua composição um elétron desemparelhado, de grande instabilidade e altamente reativo (ALVAREZ & MORAES, 2006). Sua produção oriunda do metabolismo de oxigênio é considerada normal. Já é sabido que pequenas quantidades do ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são favoráveis à célula (MAIA & BICUDO, 2009). Entretanto, quando em excesso gera efeitos adversos à membrana plasmática, subjugando o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, que é fraco, devido à escassez de citoplasma, tornando-o susceptível ao estresse oxidativo (MAIA & BICUDO, 2009; BATHGATE, 2011). Dentre os efeitos gerados pela produção excessiva de ROS, pode-se citar a ruptura nas cadeias de DNA, o que leva ao desenvolvimento embrionário anormal (AITKEN & DE IULIIS, 2007; BADOUARD et al. 2008).

Nesse contexto, o selênio encontrado na amêndoa da *Bertholletia excelsa* está associado à fração proteica na forma de Se-Metionina e/ou Se-Cistina, que varia em quantidade de acordo com as condições do solo. Souza & Menezes (2004) encontraram 7,13mg/Kg de selênio na torta e 2,04mg/Kg nas amêndoas de castanha-do-brasil. Dessa forma, tudo indica que o selênio poderia atuar como um aditivo para minimizar a produção de radicais livres no processo peroxidação lipídica e conseqüentemente, diminuir produção excessiva de ROS que poderia refrear o sistema intracelular de defesa antioxidante tornando-a susceptível ao estresse oxidativo (BATHGATE, 2011).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a viabilidade do uso do extrato da amêndoa da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em substituição a gema de ovo na criopreservação de sêmen bovino.

As referências a seguir seguem as normas da ABNT (NBR 6023/2002)

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J., DE IULIIS, G. N., Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. **Reproductive Bio Medicine (Online)** 14, 727–733. 2007.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. de. Efeitos da selenometionina e vitamina c sobre o sêmen. SaBios: **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 1, n.1, 2006
- AMIRAT-BRIAND L. B. D.; VERA-MUNOZ, O.; PINEAU. S.; THORIN, C. DESTRUMELLE, S.; DESHERCES, S.; ANTON, M.; JOUAN, M.; SHMITT, E.; TAINTURIER, D. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: preliminary results of artificial inseminations. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.282-287. 2009
- ANDRABI, S.M.H. Fundamental principles of cryopreservation of *Bostaurus* and *Bosindicus* bull spermatozoa: mini review. **International Journal of Agriculture and Biology**, 9, 367–369. 2007.
- ANZAR, M.; KROETSCHB, T.; BOSWALL, L. Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes M. **Animal Reproduction Science** 126 23–31. 2011
- BADOUARD, C., MENEZO, Y., PANTEIX, G., RAVANAT, J.L., DOUKI, T., CADET, J., FAVIER, A. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. **Zygote**, 16, 9–13. 2008.
- BADYAKAR, D.; CHAKRABARTY, J. Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation Review Article. **Advances in Andrology**, V 2014, Article ID 190542, 9 pages. 2014.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **International consensus Meeting**, Vale do Santarém, Portugal, maio, 2009.
- BATHGATE, R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. **Reproduction Domestic Animal**, 46 (Suppl. 2), 23–25. 2011.
- BERGERON, A., CRÊTE, M. H., BRINDLE, Y., MANJUNATH, P., Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, 70, 708–717. 2004.
- BERNO, L. I.; POETA, P. T.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Efeitos do selênio oriundo da torta de Castanha-do-brasil sobre a concentração de Glutathiona reduzida (gsh) em ratos wistar. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 21, n. 2, p. 231-239, abr./jun. 2010. ISSN 0103-4235
- BITTENCOURT, R. F.; EUNICE O.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; CHALHOUB, M. AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino i:

diluidores e crioprotetores. **Ciência animal brasileira**, Goiânia, v.14, n.4, p. 522-536, out./dez. 2013.

BORGES, J.C. SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011.

BOSCARATO, A. G.; MARTINS, L. F. Uso de colesterol na criopreservação espermática e fertilidade: uma revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 2, p. 143-148, abr./jun. 2014

CASTILHO, E. F. de; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS, L. F.; PINHO, R. O.; GUIMARÃES, S. E. F.; ESPESCHIT, C. J. B.; Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2335-2345, 2009.

CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; SALGUEIRO, C. C. de M.; BRITO, C. S.; VANDERLEY, S.; NUNES, J. F. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP102c). **Ciência animal brasileira**, v.15, n.3. 2014

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186p. Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo.São Paulo, 2005

COSTA, A.; CASTRO, B.C.; WANDELLI, E. V.; CORAL, S. C. T.; SOUZA, S. A. G. de. Aspectos silviculturais da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na Amazônia Central. **Acta amazônica**, v. 39(4): 843 – 850. 2009

FELBERG, I.; DELIZ, R.; GONÇALVES, E. B.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. de; CABRAL, L. C. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 163-174, 2004

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1469 197-235. 2000

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v. 44, p.1434–1440. 2011

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.112-118, 2011

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, p.3-22, 2000.

HU, J.H.; JIANG, Z.L.; LV, R.K.; LI, Q.W.; ZHANG, S.S.; ZAN, L.S.; LI, W.K.; LI, X. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, n.62, p. 83–87, 2011

IAFFALDANO, N. DI IORIO, M.; ROSATO, M.P.; MANCHISI, A. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. **Animal Reproduction Science**, 151 p220–228. 2014

KAYA, A.; MEMILI, E. Sperm macromolecules associated with bull fertility. **Animal Reproduction Science**, 169 88–94. 2016

LAYEK, S.S. MOHANTY, T.K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J.E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science** 172 1–9. 2016.

LI-GUANGA, S.; RU-JIEA, Y.; WEN-BINA, Y.; WEN-JUANA, X.; CHUN-XIANGA, Z.; YOU-SHEA, R.; LEI, S.; FU-LIN, L. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. **Animal Reproduction Science**, 118 p.248–254. 2010

MAIA, M.S.; BICUDO, D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009

MARTINS, L. F.; PINHO, R. O. ; PARAIZO, R. M.; OLIVEIRA, R. R.; CASTILHO, E. F.; GUIMARÃES, J. D. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. ISSN 1806-9290. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7, p.1519-1525, 2011

MARTINS, L.; SILVA, Z. P. G.; SILVEIRA, B. C. **Produção e comercialização da castanha do brasil (Bertholletia excelsa, H.B.K) no estado do Acre- Brasil, 1998-2006.** In: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco – Acre, 20 a 23 de julho de 2008. Resumo.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, 168: 939-949. 1970

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, 247, C125–C142. 1984.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. Review Article. **Veterinary Medicine International**, Article ID 894767, 9 p. 2011

MORTIMER, S. T. CASA: Practical Aspects Andrology Lab Corner. **Journal of Andrology**, p.515–524, 2000.

MUIÑO, R.; FERNANDEZ, M.; PEÑA, A.I. Post-thaw survival and longevity of Bull spermatozoa frozen with in egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. **Reproduction Domestic Animal**, 42:305-11. 2007

MUNIZ, M. A. P.; SANTOS, M. N. F. dos; COSTA, E. F.; MORAIS, L.; LAMARÃO, M. L. N.; RIBEIRO-COSTA, R. M.; SILVA-JÚNIOR, J. O. C. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. **Pharmacogn Magazine**, 11(41): 147–151. 2015

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios básicos de bioquímica de Lehninger** (recurso eletrônico). 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 425p

NHO, R.O.; LIMAB, D.M.A.; SHIOMIC, H.H.; SIQUEIRAB, J.B.; SILVA, H.T.; LOPESA, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J.D. Effect of different cryoprotectants on the viability of frozen/thawed semen from boars of the Piau breed. **Animal Reproduction Science** 146 187–192. 2014

PAREKH, P.P.; KHANA, A.R.; TORRESA, M.A.; KITTO, M.E. Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21 332–335. 2008.

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M. DESHERCES, S.; SCHIMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v.75, p.105-114, 2011.

SAFA, S.; MOGHADDAMA, G.; JOZANIB, R. J.; KIA, H. D.; JANMOHAMMADI, H. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. **Animal Reproduction Science** 174 (2016) 100–106

SALEM, A. A.; GOMA, Y. A. Effect of combination vitamin E and single long-acting progesterone dose on enhancing pregnancy outcomes in the first two parities of young rabbit does. **Animal Reproduction Science**, 150 35–43. 2014

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; RUDIGOZ, R.F.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemiovaries into ewes. **Fertility and Sterility**, 77: 403-408. 2002.

SANGEETA A, S.; ARANGASAMY, A. B.; S. KULKARNI, A.; SELVARAJU, S. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, 161 82–88. 2015.

SANTOS, O. V. DOS; LOPES, A. S.; CARDOSO, V. M. M.; SILVA, R. J. F. Avaliação de misturas proteicas mistas com farinha Parcialmente desengordurada de castanha-do-brasil e Isolado proteico de soja: comportamento térmico e morfológico. **Sinergia**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 35-41, jan./abr. 2012.

SANTOS, O.V.; CORRÊA, N.C.F.; CARVALHO JR., R.N.; COSTA, C.E.F.; FRANÇA, L.F.F.; LANNES, S.C.S. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. **Food Research International**, 51 841–847. 2013.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.370-384, out./dez. 2011.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H.C. de. PROCESSAMENTOS DE AMÊNDOA E TORTA DE CASTANHA-DO-BRASIL E FARINHA DE MANDIOCA: PARÂMETROS DE QUALIDADE. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, 24(1): 120-128, jan.-mar. 2004.

STOCKLER-PINTO, M. B. MAFRA, D. FARAGE, N.E. BOAVENTURA, G.T. COZZOLINO, S.M.F.; MARTINS, L.; SILVA, Z. P. G.; SILVEIRA, B. C. Produção e comercialização da castanha do brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) no estado do Acre-Brasil, 1998-2006. In: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco – Acre, 20 a 23 de julho de 2008. Resumo

VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; ULGUIM, R. R.; ALVARENGA, M. V. F.; BIANCHI, I.; CORRÊA, M. N.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J. C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, 115 323–327. 2009

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.481-492, 2000.

1 Efeito do uso do extrato da Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) sobre os
2 parâmetros espermáticos de sêmen bovino criopreservado¹

3 RESUMO

4 Objetivou-se avaliar o uso do extrato da amêndoa da castanha-do-brasil (*Bertholletia*
5 *excelsa*) em substituição a gema de ovo, na criopreservação de sêmen bovino. Os
6 tratamentos consistiam em 0, 25, 50, 75 e 100% de extrato em substituição à gema de ovo
7 em meio crioprotetor, mantendo-se a mesma concentração de Triladyl e água destilada
8 em todas as diluições. Foram utilizados cinco touros Nelore, com 24 a 36 meses. O
9 delineamento foi em blocos casualizados, considerando-se bloco cada animal, sendo
10 assim definido por cinco tratamentos, cinco blocos e cinco repetições. Depois do envase,
11 as palhetas foram seladas, resfriadas e em seguida congeladas e mantidas à -196°C. Após
12 a descongelação, as amostras foram avaliadas quanto à morfologia, cinética, integridade
13 de membranas (teste hiposmótico-HOST e epifluorescência), e posteriormente
14 fertilização em vitro. Utilizou-se o teste contraste de regressão para os dados paramétricos
15 e para os não paramétricos o Kruskal Wallis, ambos 5% de significância. Foi utilizado o
16 teste correlação de Pearson simples entre células íntegras ou lesadas com o potencial de
17 membrana mitocondrial. A morfologia e o HOST apresentaram efeito linear crescente e
18 decrescente ($P<0,05$) e integridade de membrana, motilidade espermática, e taxa de
19 clivagem apresentaram efeito quadrático ($P<0,05$), sendo todos os resultados
20 influenciados negativamente com a substituição da gema de ovo pelo extrato da castanha-
21 do-brasil. A substituição da gema de ovo pelo extrato de castanha-do-brasil não foi
22 eficiente na criopreservação do sêmen, indicando que a fração de LDL da gema é
23 imprescindível. O teor de selênio foi considerado elevado e tóxico aos espermatozoides.
24 Palavras-chave: Antioxidante, congelação de sêmen, castanha-do-brasil, membrana
25 plasmática.

26 ¹ O Artigo segue as normas da Revista Animal Reproduction Science

27

28 Effect of the use of the Brazil nut extract (*Bertholletia excelsa*) on spermal parameters
29 of criopreserved bovine semen¹

30 ABSTRACT

31 The objective of this study was to evaluate the viability of the Brazilian nut (*Bertholletia*
32 *excelsa*) extract in substitution of egg yolk for the cryopreservation of bovine semen. The
33 treatments consisted of 0, 25, 50, 75 and 100% of extract replacing the egg yolk in
34 cryoprotectant medium, maintaining the same concentration of Triladyl and distilled
35 water in all dilutions. The five Nellore bulls were 24 to 36 months. The experimental
36 design was in randomized blocks, considering each animal block, being defined by five
37 treatments (5 blocks and 5 replicates). After the package, the vanes were sealed, cooled
38 and then frozen and held at -196 ° C. After thawing, the samples were evaluated for
39 morphology, kinetics, membrane integrity (HOST and epifluorescence), and afterwards
40 IVF. The regression test was used for the parametric data and for the non-parametric
41 Kruskal Wallis, both 5% of significance. We used the simple Pearson correlation test
42 between intact or damaged cells with mitochondrial membrane potential. The HOST and
43 morphology presented linear decreasing and increasing effect, respectively (P <0.05) and
44 membrane integrity, sperm motility, and cleavage rate presented quadratic effect (P
45 <0.05), all results being negatively influenced by Replacement of egg yolk with Brazilian
46 nut extract. The substitution of the egg yolk for Brazil nut extract was not efficient in
47 cryopreservation of the semen, indicating that the LDL fraction of the yolk is essential.
48 Selenium content was considered high and toxic to spermatozoa.

49 Keywords: Antioxidant, freezing of semen, Brazil nuts, plasma membrane.

50

51 Introdução

52 A criopreservação de sêmen tem sido largamente utilizada para aumentar o
53 potencial reprodutivo de reprodutores com alto mérito genético, sendo ferramenta
54 imprescindível em programas de melhoramento. Nos últimos 60 anos o glicerol e a gema
55 de ovo têm sido os crioprotetores mais utilizados para manter a capacidade de fertilização
56 do espermatozoide durante o processo de congelação/descongelação (Amirat-Briand et
57 al. 2009).

58 Apesar de todo avanço, o processo de criopreservação causa danos à integridade
59 estrutural, bioquímica e biofísica da membrana plasmática (MP) do espermatozoide,
60 resultando em menor fertilidade do sêmen após a descongelação (Furst et al. 2012).

61 A membrana espermática por ser rica em ácidos graxos poli-insaturados, se torna
62 altamente sensível às espécies reativas do oxigênio, que quando oxidam as cadeias
63 produzem novos metabólitos oxidantes, potencializando o dano celular, resultando em
64 perda da motilidade e indução da morte celular (Bansal and Bilaspuri, 2010). Diversos
65 podem ser os danos espermáticos ocorridos durante o processo de criopreservação, como,
66 o estresse oxidativo, químico, osmótico, térmico e mecânico (Rasul et al. 2001).

67 Para minimizar esses prejuízos, a técnica vem sendo aperfeiçoada com o uso de
68 novos diluidores. A adição de diferentes tipos de antioxidantes aos meios tem se tornado
69 uma prática comum no combate aos danos oxidativos causados as células espermáticas
70 durante a congelação/descongelação. Alguns trabalhos demonstraram que o uso de
71 antioxidantes melhorou parâmetros de qualidade dos espermatozoides bovinos (Bucak et
72 al. 2014).

73 A supressão de substâncias de origem animal em meios de conservação de sêmen
74 tem sido sugerida, a fim de garantir a segurança sanitária nos processos biológicos
75 (Forouzanfar et al. 2010), fazendo com que a procura por substitutos para a gema de ovo
76 seja intensificada (Del Valle et al. 2013).

77 Neste contexto, a amêndoa da Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.),
78 parece se enquadrar neste propósito, por apresentar composição química com alto teor
79 lipídico (60 a 70%), contendo 3,8% de ácido palmítico, 8,5% de ácido esteárico, 31,5%
80 de ácido oleico e 45,0% de ácido linoleico (Freitas et al. 2007) o que possivelmente
81 poderia contribuir em meios utilizados na criopreservação de sêmen, visto que esses
82 ácidos fazem parte dos fosfolipídeos que compõe a membrana celular (Queiroga Neto et
83 al. 2009). Além disso, possui elevada quantidade de aminoácidos essenciais e minerais,
84 especialmente o selênio que quando em pequenas quantidades, exerce função
85 antioxidante combatendo o excesso de radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo
86 (Pacheco and Scussel, 2007). São poucos os alimentos ricos nessa substância, fazendo
87 com que a castanha-do-brasil seja um vegetal peculiar quando se pensa em selênio (Zubair
88 et al. 2015).

89 Diante do exposto, objetivou-se com avaliar a viabilidade do uso do extrato da
90 amêndoa da castanha-do-brasil em substituição a gema de ovo, na criopreservação de
91 sêmen bovino.

92 Material e Métodos

93 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

94 O protocolo usado neste estudo está de acordo com os princípios éticos da
95 experimentação animal, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e
96 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade
97 Federal Rural da Amazônia - UFRA, Brasil (nº 035/2015 – CEUA/UFRA).

98 Locais e período do experimento

99 O experimento foi conduzido na área de Bovinocultura e nos Laboratórios de
100 Biotecnologia em Reprodução Animal e Nutrição Animal e Bromatologia do Campus de
101 Parauapebas da Universidade Federal Rural da Amazônia, no período de fevereiro a

102 agosto de 2016. A avaliação da cinética de movimento dos espermatozoides utilizando o
103 sistema eletrônico de análise de sêmen foi realizada na Embrapa Recursos Genéticos e
104 Biotecnologia, em Brasília.

105 Manejo dos animais e colheita de sêmen

106 Foram utilizados cinco touros da raça Nelore, com idades entre 24 e 36 meses,
107 previamente selecionados pela avaliação andrológica e teste de congelabilidade do sêmen.
108 Os animais foram mantidos em pastagem de capim braquiária (*Urochloa briantha* cv.
109 Marandu), com fornecimento de água e suplementação mineral ad libitum, no início e no
110 término do período experimental o peso corpóreo foi aferido e realizado o controle de
111 ecto e endoparasitas.

112 Inicialmente os touros foram adaptados à colheita de sêmen e submetidos a um
113 nivelamento biológico, por meio da avaliação da sua capacidade reprodutiva e exame
114 andrológico (Henry and Neves, 1998). Foram realizadas cinco colheitas de cada animal,
115 sendo uma por semana. Após a contenção dos touros, estes foram submetidos ao processo
116 de higienização (externa e interna) realizado na seguinte sequência: estímulo de micção,
117 aparagem de pelos do prepúcio (quando necessário), lavagem externa do prepúcio com
118 água a temperatura ambiente, lavagem interna do prepúcio com solução salina (0,9%) à
119 37°C e secagem da região do prepúcio. O sêmen foi coletado por eletroestimulação,
120 utilizando-se eletroejaculador (Autojac®, Neovet, Brazil) o qual foi drenado para o tubo
121 graduado de 15 mL (Falcon ®) e continuamente, realizada a análise física.

122 Tratamentos experimentais

123 O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados,
124 considerando-se bloco cada touro, sendo assim definido por cinco tratamento, cinco
125 blocos e cinco repetições.

126 Foram utilizados como crioprotetores a gema de ovo (externo) e o diluidor
127 comercial Triladyl® (interno) (MINITUB – Produtos Agropecuários Ltda., Porto Alegre,
128 RS, Brasil) A diluição das proporções Triladyl® mais gema de ovo seguiu as
129 recomendações descritas pelo o fabricante, o qual consistiu no meio padrão para a
130 congelação do sêmen.

131 O preparo dos meios experimentais foi realizado pela substituição da gema de
132 ovo pelo extrato de castanha, mantendo-se a mesma concentração de Triladyl e água
133 destilada em todas as diluições (tabela 1).

134 As diluições referentes a cada tratamento foram transferidas para sacos de
135 polietileno compacidade de 100 mL, selados termicamente e submetidos à luz ultravioleta
136 por 30 minutos e armazenados em freezer à -18 °C.

137 Preparo do extrato da castanha-do-brasil

138 Foram utilizadas amêndoas de castanha-do-brasil provenientes do município de
139 Parauapebas/PA. Após a recepção, as castanhas passaram por lavagem com água
140 destilada e foram transferidas para um Becker contendo 1000 mL de água destilada a
141 100°C, as quais permaneciam imersas por 2 minutos, esse processo foi realizado no intuito
142 de facilitar a retirada da casca. Em seguida, foram transferidas à estufa à 55°C por 12
143 horas para a retirada de umidade e pesadas em balança analítica (Marte AW220).

144 Para a obtenção da torta por meio do processo físico de extração a frio, as
145 castanhas foram envoltas por tecido voal e organizadas em um cilindro de ferro
146 galvanizado com base constituída de material TECHNLYL®, Poliamida 6.6. Em seguida,
147 foi utilizado uma prensa hidráulica manual, com pressão inicial de 3000 e final de
148 10000kg por cinco minutos (Souza and Menezes, 2004). Após este procedimento a torta
149 foi pesada e transferida para o liquidificador (Arno – Clic Pro 500W), o qual possuía
150 peneira de separação da torta e extrato. Em seguida, adicionou-se água destilada na

151 proporção de quatro partes de água para uma de castanha, homogeneizando-se por três
152 minutos, adicionalmente foram utilizadas mais quatro partes de água, portanto a mistura
153 castanha:água foi realizada na proporção de 1:8 (conforme metodologia descrita por
154 Ferberg et al.2002). Em seguida, o conteúdo foi filtrado em tecido tipo nylon para sêmen
155 (Reproshop[®]) com porosidade 20 micras, o qual foi denominado extrato da castanha e
156 posteriormente utilizado para a elaboração dos crioprotetores que fizeram parte dos
157 tratamentos experimentais.

158 Composição química do extrato da castanha

159 A partir da amostra de extrato seco em estufa não ventilada (105°C por 72 horas),
160 foram realizadas as análises para quantificação do teor de matéria seca, que por diferença
161 foi obtido o teor de umidade da amostra, matéria mineral, proteína bruta, extrato etéreo
162 (Tabela 2), seguindo a metodologia descrita por Detmann et al. (2012).

163 O teor de selênio (Tabela 2) do extrato foi quantificado por meio do
164 espectrofotômetro de absorção atômica e o perfil de ácidos graxos (tabela 3) (AOAC,
165 2005).

166 Diluição e criopreservação do sêmen

167 Antes da colheita, o meio de criopreservação permaneceu à temperatura de 37 °C
168 em banho-maria, até o momento da diluição. Para a adição do material seminal ao meio
169 diluidor, realizou-se a contagem espermática em câmara de Neubauer para em seguida
170 proceder a diluição em tubos Falcon[®] previamente identificados de acordo com o
171 respectivo tratamento. Em seguida, foi preparada uma alíquota entre lâmina e lamínula
172 para avaliação de motilidade (%) e vigor (0-5) analisada em microscopia óptica.

173 Depois do envase as palhetas foram seladas em seladora térmica manual e levadas
174 à máquina de congelação TK 3000 Compacta SE (TK Equipamentos para Reprodução,
175 Uberaba, MG, Brasil) seguindo a curva padrão (resfriamento e congelação) com o

176 resfriamento iniciando a temperatura ambiente, baixando 0,25°C/min até chegar a 5°C,
177 mantendo-se nessa temperatura por 4 horas (tempo de equilíbrio). Em seguida, realizou-
178 se a curva de congelação em que a temperatura foi reduzida 20°C/ min até atingir a
179 temperatura de -120°C. Terminado o processo de congelação, as palhetas foram
180 colocadas diretamente no nitrogênio líquido, em temperatura de -196°C e, em seguida,
181 foi realizado o aquecimento e armazenamento das amostras em botijão criogênico de 47
182 litros, para posteriores análises.

183 Descongelação do sêmen criopreservado

184 Para todas as avaliações a descongelação seguiu o mesmo protocolo, o qual
185 consistiu na retirada das palhetas (duas de cada tratamento para em cada teste) do botijão
186 criogênico e direcionadas ao banho-maria a 37°C por 30 segundos. Para uma melhor
187 homogeneização das amostras o sêmen foi transferido das palhetas para microtubos de
188 1,5mL (Eppendorf®) e mantidos a temperatura de 37°C.

189 Morfologia espermática

190 Em tubo plástico (Eppendorf®) foi depositado 1 mL de solução formol-salina-
191 tamponada pré-aquecida à 37 °C e 20 µL de sêmen e posteriormente estocado em
192 temperatura ambiente até o dia da avaliação da morfologia espermática de cada amostra.
193 Nesta avaliação foi empregada a técnica de câmara úmida, contabilizando 200 células
194 para identificação de alterações morfológicas.

195 Teste Hiposmótico (HOST)

196 O teste hiposmótico foi realizado com finalidade da determinação da integridade
197 funcional da membrana plasmática, sendo método simples e acessível, consistindo no
198 influxo de fluidos para o interior da célula em meio hiposmótico até que gere o equilíbrio
199 entre os compartimentos (Amirat-Briand et al. 2009). Considerou-se normais aqueles
200 espermatozoides que foram reativos ao teste, dobrando ou enrolando a cauda quando em

201 solução hiposmótica após contagem de 100 células. Para este procedimento, utilizou-se a
202 solução frutose de 100 mOsm/Kg (9 g de frutose, 49 g de citrato trisódico e água destilada
203 suficiente para completar um litro), colocando em tubos de 2,0 mL (Eppendorf®) 20 µL
204 de sêmen adicionado de 1,0 mL desta solução, incubados em banho-maria por 60 minutos
205 e posteriormente adicionado 500 µL de formol. A solução juntamente com sêmen foi
206 armazenada em temperatura ambiente.

207 Análise de epifluorescência

208 Para avaliação da integridade da membrana plasmática utilizou-se o diacetato de
209 6 carboxifluoresceína (C-FDA) associado ao iodeto de propídeo (IP) (Sigma-aldrich®,
210 Brasil), como descrito por Harrison and Vickers (1990). Uma amostra de sêmen (10 µL)
211 foi adicionada à solução trabalho (40 µL) (Anexo A) e incubada por 10 minutos em
212 microtubo protegido da luz. Uma alíquota de 10 µL de solução de corante com sêmen foi
213 colocada entre lâmina e lamínula para observação em microscópio de epifluorescência
214 (modelo Lepzig – China). Avaliou-se 200 células, classificadas de acordo com a
215 membrana plasmática em: membrana íntegra (presença de coloração verde na cabeça);
216 membrana semi-lesada (presença de coloração verde e vermelha na cabeça); membrana
217 lesada (presença de coloração vermelha na cabeça).

218 As células foram ainda avaliadas quanto ao seu potencial de membrana
219 mitocondrial por meio do corante Rodamina 123 (Sigma-aldrich®, Brasil). Utilizou-se
220 10 µL de sêmen descongelado em 40 µL da solução trabalho, em ato contínuo incubou-
221 se as amostras por 10 minutos à 37°C. Foram contabilizadas 200 células por amostra.

222 Teste de termorresistência

223 O teste de termorresistência (TTR) consistiu na avaliação de motilidade e vigor
224 espermático sob microscopia óptica em aumento de 100X, nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas,
225 permanecendo o sêmen incubado à 37°C até o fim da análise

226 Avaliação da motilidade espermática por meio do sistema computadorizado

227 Para a avaliação dos parâmetros utilizando o CASA (Ivos-Ultimate 12's,
228 Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) o equipamento foi previamente
229 ajustado para análise de espermatozoide bovino e em seguida a lâmina de leitura (Makler,
230 Santa Ana, CA, USA) previamente aquecida foi preenchida com o volume de 8 µL de
231 sêmen. Foram contabilizados pelo menos três campos selecionados manualmente para
232 leitura e análise, sendo as características de movimento avaliadas: motilidade total (MT)
233 e motilidade progressiva (MP) em percentagem; velocidade de trajeto (VAP), velocidade
234 retilínea (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) em micrômetro por segundo; amplitude
235 lateral de cabeça (ALH) em micrômetro; frequência de batimentos (BCF) em Hz; e
236 linearidade (LIN), em percentagem.

237 Avaliação da fertilidade in vitro do sêmen de acordo com os tratamentos

238 Obtenção e maturação de ovócitos

239 Os ovários foram coletados no Frigorífico Frigovan, no município de
240 Parauapebas-PA, e transportados para o laboratório em solução salina (0,9% NaCl),
241 suplementada de penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (50µg/mL) à temperatura de
242 36°C. Os folículos ovarianos com diâmetro de 3,0 - 8,0 mm foram aspirados com auxílio
243 de agulha hipodérmica (40 x 1,2 mm) acoplada à seringa de 10 mL. O líquido folicular
244 aspirado foi depositado em tubos Falcon de 15 mL. Depois de 10 minutos em repouso,
245 tempo mínimo para formação do pellet contendo os ovócitos, somente o sobrenadante foi
246 removido e centrifugado em outro tubo Falcon de 15 mL por 5 minutos a 700G. Esse
247 líquido foi utilizado para o rastreamento dos complexos cumulus-ovócitos (CCOs) em
248 placas de 100 mm.

249 Os ovócitos rastreados foram classificados de acordo com Caixeta and Dode
250 (2010). Somente os classificados em grau I e II foram lavados e maturados em meio de

251 maturação (TCM 199 saís de Earl's (Gibco, Waltham, MA, EUA) suplementado com
252 10% de soro fetal bovino SFB (Gibco, Waltham, MA, EUA), 12 UI/mL de hormônio
253 luteinizante (LH Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 0,01 UI/mL de hormônio folículo
254 estimulante (FSH – Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 0,1 mg/mL de L-glutamina
255 (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 1µM de Piruvato (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA),
256 1µM de Cisteamina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 0,075 mg/mL de sulfato de
257 amicacina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), em gotas de 150 µL cobertas por óleo de
258 silicone e incubados por 22 – 24 horas em estufa de cultivo a 38,5 °C com atmosfera de
259 5% de CO₂ e umidade saturada.

260 Fecundação in vitro e Cultivo in vitro

261 Para a fecundação in vitro foram utilizadas as doses de sêmen de acordo com os
262 tratamentos experimentais, sendo submetidos a fecundação, 150 ovócitos por tratamento,
263 totalizando 750 ovócitos. O sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos em banho-
264 maria e as células espermáticas foram selecionadas por centrifugação em gradiente
265 descontínuo de Percoll (400 µL de Percoll 90% e 400 µL de Percoll 45% (GE, Healthcare,
266 Piscataway, NJ, USA), centrifugado a 5000g/5min) (Machado et al. 2009). Após a
267 centrifugação, o pellet foi retirado e centrifugado por 3 minutos em meio TALP (Parrish
268 et al. 1995) suplementado com 2 mM de penicilamina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA),
269 1 mM de hipotaurina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 250 mM de epinefrina (Sigma,
270 St. Louis, Missouri, EUA) e 10 µg/mL de heparina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), a
271 700G. O pellet resultante foi ressuspensionado com meio de fecundação (FEC), e adicionado
272 na gota de fecundação na concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

273 Após a incubação dos espermatozoides com os ovócitos maturados (16-18 horas),
274 os prováveis zigotos foram lavados em gotas de 150µL de meio de fluido de oviduto
275 sintético (SOF) e cultivados utilizando meio SOF suplementado com aminoácidos

276 essenciais e não essenciais 0,34 mM de sodium tri citrato, 2,77 mM de myo-inositol e 5%
277 SFB (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) em estufa à 38,5 °C e 5% de CO₂. Os
278 embriões foram avaliados no Dia (D) 2 para determinação da taxa de clivagem, e no D6
279 e D7 para taxa de blastocisto.

280 Análise de aflatoxinas

281 A análise de aflatoxinas foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta
282 eficiência (CLAE), no Laboratório CBO, em São Paulo.

283 Análise estatística

284 A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical
285 Analysis System). Para a variável para a variável vigor utilizou-se o teste Kruskal wallis,
286 para as demais variáveis empregou-se a ANOVA, seguida de análise de regressão para os
287 níveis quadráticos e lineares. Quando avaliou-se a correlação entre a integridade de
288 membrana plasmática e potencial mitocondrial, fez-se uso da correlação simples de
289 Pearson. Todas as variáveis foram testadas ao nível de significância de 5%.

290 Resultados

291 Na análise de morfologia, os defeitos menores e totais apresentaram efeito linear
292 crescente em função da substituição ($P < 0,05$) mostrando que à medida que aumenta a
293 concentração do extrato, maior a quantidade de células que apresentaram alguns defeitos,
294 exceto os defeitos maiores que não foram influenciados pelo o nível de substituição. Por
295 outro lado, o teste HOST apresentou efeito linear decrescente ($P < 0,05$; Tabela 4)
296 demonstrando maior número de células com membranas lesadas em decorrência do
297 processo de criopreservação à medida que foi substituindo a gema pelo extrato de
298 castanha.

299 A integridade da membrana plasmática, avaliada por meio da análise de
300 epifluorescência apresentou efeito quadrático para células íntegras e lesadas ($P < 0,05$)

301 (tabela 5), além de correlação positiva e baixa entre as células com membrana plasmática
302 íntegra e seu potencial mitocondrial (tabela 6) Indicando que nas condições desse estudo,
303 células que não tiveram sua membrana plasmática lesada durante o uso da técnica e seu
304 armazenamento possuem maiores chances de apresentarem seu potencial de membrana
305 mitocondrial.

306 Em relação à motilidade espermática durante o teste de termorresistência (TTR)
307 do sêmen criopreservado avaliado no tempo zero e uma hora após a descongelação
308 apresentou efeito quadrático (Tabela 7; $P < 0,05$). Duas horas após a descongelação, a
309 motilidade espermática apresentou efeito linear decrescente ($P < 0,05$) em função da
310 substituição da gema de ovo pelo extrato de castanha-do-brasil. Entretanto, no tempo três
311 horas após descongelação verificou-se que não houve efeito de substituição. Não houve
312 efeito ($P > 0,05$; Tabela 8) sobre o vigor espermático nas horas zero, uma e três.
313 Entretanto, na hora dois observou-se que diferença entre os tratamentos, em que, o
314 controle não diferiu do nível de 75% de substituição, porém diferiu dos demais
315 tratamentos.

316 Para as variáveis motilidade total (MT) e progressiva (MP) no sêmen
317 descongelado verificou-se efeito quadrático ($P < 0,05$; Tabela 9) em função da substituição
318 da gema de ovo pela castanha-do-brasil. Em relação às velocidades de trajeto (VAP) e
319 curvilínea (VCL), não foi verificado efeito ($P > 0,05$). Os parâmetros velocidade
320 progressiva (VSL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de
321 batimento (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) apresentaram efeito linear
322 decrescente em função da concentração de extrato da castanha ($P < 0,05$; Tabela 7) por
323 meio da avaliação no sistema eletrônico de análise de sêmen (CASA).

324 A técnica de fertilização in vitro apresentou maior taxa de clivagem no controle e
325 em até 25% de substituição da gema de ovo pelo extrato da castanha (Tabela 10). Foi

326 observado a alta contaminação encontrada nas placas devido a proliferação fúngica no
327 extrato, impossibilitando o desenvolvimento dos gametas fecundados.

328 Discussão

329 A composição química do extrato de castanha-do-brasil empregado para a
330 elaboração do meio utilizado nos tratamentos experimentais apresentou elevado teor
331 proteico (42,95%), superior a 18,87% encontrado na gema de ovo (Sartori et al. 2009). A
332 quantidade de proteínas presentes no extrato aponta a castanha-do-brasil como um
333 ingrediente proteico para elaboração de meios de criopreservação, por apresentar valor
334 de proteína bruta superior a 20% (Valadares Filho et al. 2016). As proteínas encontradas
335 na castanha são do tipo 2S, uma classe de baixo peso molecular (Heng et al. 2004), o que
336 demonstra a potencialidade desse fruto na nutrição celular (Tabela 2).

337 O teor de matéria mineral (7,94 %) presente no extrato está de acordo aos relatados
338 na literatura (Felberg et al. 2004). Apesar de não ter sido identificado quais macro e micro
339 minerais constituintes da castanha, sugere-se a possível qualidade desse fruto em relação
340 ao quantitativo de minerais presentes, os quais apresentam importância para o
341 metabolismo espermático, por favorecer parâmetros como motilidade e vigor, além de
342 apresentar função essencial em processos como a capacitação espermática (Santos et al.
343 2013).

344 A quantificação do selênio da torta utilizada para elaboração do extrato da
345 castanha, mostrou-se elevada 2mg/100g, valor 2,80 vezes superior aos 0,713mg/100g
346 descrito por Souza and Menezes (2004). Vale ressaltar que o valor deste nutriente varia
347 entre as composições química de castanha-do-brasil relatadas na literatura: 0,16 a
348 2,02mg/100g (Parekh et al. 2008), 11,48 mg/100g (Santos et al. 2013). Normalmente, sua
349 participação em vegetais varia de acordo com os diferentes tipos de solo, capacidade de
350 absorção das árvores, sua forma química, dentre outros fatores (Parekh et al. 2008).

351 Após diluição da torta, o extrato de castanha obtido apresentou, 0,162 mg/100g
352 de Selênio (Tabela 2), o qual foi utilizado para elaboração dos meios diluentes utilizados
353 nesta pesquisa. Além de ser essencial para o metabolismo celular, o Se possui função
354 intimamente correlacionada ao sistema antioxidante. Apesar de seu mecanismo de ação
355 não estar bem esclarecido, acredita-se que sua ação redutora ocorra por meio da ligação
356 covalente às proteínas, formando as selenoproteínas, como a glutathione peroxidase (GSH)
357 e a tioredoxina redutase (TrxRs), que possuem propriedades antioxidantes similares
358 (Pontual et al. 2007), como manter estáveis os grupos tióis das proteínas, reduzir as
359 ligações dissulfetos (induzidas pelo estresse oxidativo), neutralizar os radicais livres e
360 estão envolvidas em inúmeros processos vitais, como a síntese de DNA e a regulação da
361 apoptose (Gromadzinska et al. 2008). Dessa forma, as concentrações intracelulares de
362 GSH e TrxRs tornam-se um indicador da homeostasia celular, por meio da neutralização
363 de agentes oxidantes (Berno et al. 2010).

364 O teor lipídico do extrato (18,72%) (Tabela 2) apresentou-se inferior ao
365 comumente encontrado nas amêndoas de castanha-do-brasil podendo representar entorno
366 de 60 a 70% de sua composição química (Chunhieng et al. 2008). Esse teor se deve ao
367 fato de que o extrato foi obtido por meio da torta, com retirada parcial da gordura pelo
368 método de extração a frio. Como mostra a Tabela 3, os principais constituintes do perfil
369 de ácidos graxos do extrato, são os insaturados, principalmente oleico e linoleico (poli-
370 insaturado). Maiores proporções desses ácidos são necessárias em protocolos de
371 criopreservação de sêmen, visto que promovem ação importante, como reduzir a perda
372 lipídica da membrana e ajudam a evitar que ocorra a capacitação precoce da célula e
373 diminuição do tempo de vida útil dos espermatozoides (Badyakar and Chakrabarty,
374 2014). No entanto, nesse estudo a participação dos ácidos graxos insaturados demonstrou-
375 se inferior à literatura (Stockler-Pinto et al. 2008), indicando que sua maior concentração

376 está presente no óleo da amêndoa e como foi utilizado apenas a torta para elaboração do
377 extrato, sua retirada parcial culminou em baixo valor de instauração, o que provavelmente
378 contribuiu em maior índice de membranas lesadas nas análises espermáticas.

379 Referente a análise seminal, pode-se afirmar que quando os espermatozoides
380 passam pelo processo de criopreservação é comum terem um acréscimo nos defeitos
381 menores devido às mudanças de temperatura, além da manipulação das células no
382 momento de confecção das lâminas para leitura (Plessis and Soley, 2012). Contudo,
383 dentro dos parâmetros avaliados como defeitos menores, aquele que se demonstrou mais
384 acentuado em todas as amostras após a descongelação foi a cabeça isolada normal.
385 Comumente, esse tipo de defeito ocorre devido às próprias inserções entre peça
386 intermediária e colo serem mais frágeis e conseqüentemente, durante o movimento da
387 cauda, essas partes se desprendem gerando caudas e cabeças normais soltas no ejaculado
388 (Arruda et al. 2015).

389 Neste caso, observou-se que além dos danos ocasionados durante o processo de
390 criopreservação, a granulometria das partículas de castanha presentes no extrato foi um
391 fator agravante para maior ocorrência deste defeito. Uma vez que o extrato apresentava-
392 se muito concentrado (como observado no CASA), resultando em atrito entre a célula e
393 as partículas de castanha, fazendo com que a junção da cabeça e flagelo (que já estavam
394 vulneráveis) se rompessem culminando na separação dessas partes. Portanto, à medida
395 que foi substituindo a gema de ovo pelo extrato de castanha-do-brasil, houve aumento do
396 número de partículas acentuando esse tipo de defeito.

397 O efeito linear decrescente observado no teste HOST (Tabela 5) demonstrou
398 maior ocorrência de células com membranas lesadas à medida que foi aumentando o nível
399 de substituição da gema pelo extrato de castanha, apontando que a hipotética ação
400 crioprotetora do extrato da castanha-do-brasil não demonstrou ser eficiente na proteção

401 das células espermáticas contra danos ultra estruturais causados a membrana plasmática
402 durante o processo.

403 Comportamento semelhante foi observado para a análise de integridade da
404 membrana plasmática por meio de microscopia de epifluorescência (Tabela 5) quando
405 substituiu-se 100% a gema de ovo pelo extrato verificando que maior foi o número de
406 células que apresentaram lesões na membrana plasmática, confirmando que a substituição
407 total não se mostrou eficiente, afetando não somente à proteção da MP mas também
408 desfavorecendo o potencial mitocondrial celular (Tabela 6) e conseqüentemente,
409 diminuindo a produção de energia das células já que tal produção ocorre no interior das
410 mitocôndrias (Di Marino, 2012). Entretanto, o efeito quadrático demonstrou ponto de
411 máxima no nível de 75% de substituição da gema de ovo, com melhor percentual para o
412 número de células íntegras. Dessa forma, pressupõe-se que nos níveis de substituição 25
413 e 50%, as quantidades dos compostos selênio e ácidos graxos, bem como a interação
414 desses componentes com gema não tenham sido suficientes para apresentar efeito
415 positivo na proteção à membrana plasmática aos efeitos deletérios da criopreservação.

416 A gema do ovo é composta principalmente por 68% de lipoproteínas de baixa
417 densidade (LDL), com reconhecido efeito protetor às células espermáticas durante o
418 processo de congelação, onde essas moléculas se rompem fornecendo fosfolipídios e
419 colesterol à membrana plasmática, conferindo estabilidade e inibindo as crioinjúrias
420 derivadas do processo, além de se ligar a algumas proteínas do plasma seminal inibindo
421 sua toxicidade (Moussa et al. 2002). Apesar da amêndoa da castanha-do-brasil possuir
422 elevada porção lipídica, a quantidade de lipídeos do extrato da castanha, não se mostrou
423 tão eficiente quanto a fração de LDL presente na gema de ovo. Ainda não se tem trabalhos
424 que tratem do uso do extrato em condições celulares, dificultando o conhecimento da ação
425 dos ácidos graxos presentes nesse vegetal na criopreservação de sêmen.

426 Os parâmetros motilidade e vigor no teste de termorresistência (TTR) (Tabelas 7
427 e 8), quando avaliou a substituição integral da gema pelo extrato da castanha,
428 demonstraram média mínima logo após a descongelação 30% e 2,1 respectivamente,
429 sendo a motilidade considerada normal e o vigor apresentou-se baixo conforme os
430 parâmetros propostos por Henry and Neves (1998).

431 A substituição da gema de ovo pelo extrato quando avaliada nas horas zero e uma,
432 houve efeito quadrático para motilidade (Tabela 6). O fator a ser levado em consideração,
433 são os elevados valores de selênio encontrados na torta e extrato de castanha-do-brasil, o
434 que pode ter apresentado efeito tóxico aos espermatozoides, devido à presença de 1.620
435 ng de selênio por mL no extrato.

436 Após o preparo dos diluentes, a quantidade do selênio presente no nível de 100%
437 de substituição do extrato pela gema de ovo, apresentou 324 ng/mL. Apesar de o selênio
438 possuir ação antioxidante, quando se manifesta em concentrações elevadas, promove o
439 efeito inverso causando toxidez (Lovercamp et al. 2013). Estudos mostram aumento na
440 apoptose e perda da viabilidade de células cancerígenas tratadas com várias
441 concentrações de selênio, especialmente quando foram tratados com 500 ng/mL (Cao et
442 al. 2008).

443 Dessa forma, quando utilizadas às concentrações de 25 e 50% durante o TTR, (81
444 e 162 ng de Se/mL) estas ainda não seriam suficientes para que a quantidade de Selênio
445 presente no extrato demonstrasse seu potencial de toxicidade e, quando se utilizou 100%
446 de extrato (324 ng de Selênio/mL), esse mineral exerceu efeito tóxico devido à alta
447 concentração.

448 Comportamento semelhante foi observado na avaliação do vigor espermático
449 (Tabela 7), que apesar de nas primeiras horas não ter sido observado diferença quanto à
450 substituição, na segunda hora observou-se que o tratamento 75% não diferiu do controle

451 e nem dos demais, porém o controle diferiu dos tratamentos contendo 25, 50 e 100% de
452 extrato. Nesse caso, ficou evidente que quando as células são expostas à incubação por
453 períodos de tempo maiores, mesmo ocorrendo efeito esperado de redução na sua
454 intensidade de movimento, o extrato da castanha-do-brasil contribuiu negativamente para
455 a perda de sua potencialidade, tornando-se um meio nocivo às células quando
456 substituindo 100% da gema de ovo na técnica de congelação de sêmen.

457 Quando utilizado o CASA para avaliação da cinética espermática, é possível ter
458 maior precisão nos resultados, pois, além de ser uma alternativa mais objetiva, o CASA
459 analisa o comportamento celular de forma individual (Cox et al. 2006). Entretanto,
460 durante a realização da análise observou-se partículas que coincidiam com o tamanho da
461 cabeça dos espermatozoides, sendo estas partículas resíduos de torta de castanha-do-
462 brasil. A coincidência da semelhança do tamanho dessas partículas com a cabeça dos
463 espermatozoides se deve ao fato do extrato ter sido filtrado em Filtro de Nylon® 20
464 micras (tamanho semelhante ao da cabeça do espermatozoide), essa porosidade permitiu
465 a passagem de fragmentos de torta de castanha no crivo, dificultando a análise
466 computadorizada, pois embora seja o flagelo a parte do espermatozoide que propulsiona
467 o movimento, os sistemas automáticos avaliam o movimento da cabeça porque é
468 tecnicamente mais fácil acompanhar esse movimento do que o do flagelo (Amann and
469 Katz, 2004) fazendo com que o sistema confundisse partículas de castanhas (imóveis)
470 com cabeças de espermatozoide resultando em médias tão baixas.

471 Outro fator que contribuiu para os resultados da análise no CASA é que tanto a
472 gema de ovo quanto a castanha são ricas em porção lipídica e a soma desses dois meios
473 ou somente o extrato da castanha (100%) proporcionou o aumento da fração de ácidos
474 graxos presentes impossibilitando os espermatozoides demonstrarem seu verdadeiro
475 potencial de motilidade, tornando o meio mais viscoso, fazendo com que essas células se

476 encontrassem em condições de difícil locomoção. Como consequência, tem-se o gasto
477 desnecessário de ATP, levando o espermatozoide a utilizar mais energia durante a
478 locomoção, o que é desfavorável, pois essa energia é imprescindível para iniciar os
479 processos catabólicos por meio da via glicolítica, bem como favorecer a mobilidade e
480 balanço iônico (Di Marino, 2012).

481 O efeito linear decrescente ocorrido nos parâmetros velocidade progressiva
482 (VSL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento
483 (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN); (Tabela 8) mostra que nas condições
484 experimentais descritas, o extrato utilizado como ação protetora das células espermáticas
485 durante a criopreservação não possibilitou características adequadas ao ponto de
486 promover ação antioxidante por meio do selênio contido na castanha. Esses resultados
487 indicam falhas na neutralização dos radicais livres, evitando a ação do excesso das
488 espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células espermáticas (Guthrie and Welch, 2012).

489 Os dados relacionados à taxa de clivagem apresentaram efeito quadrático de
490 máxima no nível de 75% de substituição da gema de ovo, apresentando moderada
491 melhora na taxa de fertilização dos ovócitos. Tomando como base que a fertilização in
492 vitro, é um dos métodos mais eficientes em predizer o potencial de fertilização de
493 amostras de sêmen após o processo de criopreservação (Perumal et al. 2011), as taxas de
494 fertilização e clivagem dos ovócitos demonstrou que as análises de integridade funcional
495 de membranas, utilizadas neste experimento, foram eficazes em demonstrar o potencial
496 fecundante do sêmen de acordo com os tratamentos.

497 Conclusão

498 A substituição da gema de ovo pelo extrato de castanha-do-brasil não foi eficiente
499 na criopreservação do sêmen de touros bovinos.

500 A fração de LDL da gema de ovo em meio crioprotetor, demonstrou ser
501 imprescindível para minimizar os danos causados a membrana plasmática das células
502 espermáticas durante o processo de criopreservação.

503 O teor de selênio encontrado nas castanhas utilizadas para elaboração do extrato
504 foi considerado elevado e tóxico aos espermatozoides, na substituição total da gema pelo
505 extrato.

506 A utilização do extrato da castanha-do-brasil em meio crioprotetor demonstrou
507 que mais estudos são necessários a fim de avaliar seu verdadeiro potencial em biotécnicas
508 na reprodução animal. Indicando que a etapa crucial para melhores resultados é o
509 refinamento na obtenção do extrato da castanha.

510 Referências

511 A.O.A.C. - ASSOCIATIONS OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2005.
512 Official Methods of Analyses of the Association of Analytical Chemists. 18. ed, p.20-
513 25

514 Amann, R.P., Katz, D.F., 2002. Reflections on CASA after 25 years. Journal of
515 Andrology. 25, 317-325.

516 Amirat-Briand L.B.D., Vera-Munoz, O., Pineau. S., Thorin, C. Destrumelle, S.,
517 Desherces, S., Anton, M., Jouan, M., Shmitt, E., Tainturier, D., 2009. In vivo fertility
518 of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein)
519 extender: preliminary results of artificial inseminations. Animal Reproduction
520 Science. 122, 282-287.

521 Arruda, R.P.D.E., CeleghinI, E.C.C., Garcia, A.R., Santos, G.C., Leite, T.G., Oliveira,
522 L.Z., Lançoni, R., Rodrigues, M.P., 2015. Morfologia espermática de touros:
523 interpretação e impacto na fertilidade. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 39,
524 47-60.

525 Badyakar, D., Chakrabarty, J., 2014. Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm
526 Cryopreservation Review Article. *Advances in Andrology*. 9, 13-18.

527 Berno, L.I., Poeta, P.T., Maróstica Júnior, M.R., 2010. Efeitos do selênio oriundo da
528 torta de Castanha-do-brasil sobre a concentração de Glutathione reduzida (gsh) em
529 ratos wistar. *Alimentos e Nutrição*, 21, 231-239.

530 Caixeta, E.S., Dode, M.A.N., 2010. Avaliações da competência ovocitária em
531 bovinos. *Veterinária e Zootecnia*.17, 8-18.

532 Cao, Z., Wu, L.P., Li, Y.X., Guo, Y.B., Chen, Y.W., Wu, R.H., 2008. Change of
533 choline compounds in sodium selenite-induced apoptosis of rats used as quantitative
534 analysis by in vitro 9.4T MR spectroscopy. *World Journal Gastroenterology*. 14,
535 3891-3896.

536 Chunhieng, T., HafidI, A., Pioch, D., Brochier, J., Montet, D., 2008. Detailed Study
537 of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Oil Micro-Compounds: Phospholipids,
538 Tocopherols and Sterols. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 19, 1374-1380.

539 Cox, J.F., Alfaro, V., Montenegro, V., Rodriguez-Martinez, H., 2006. Computer-
540 assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration
541 in cervical mucus. *Theriogenology*.66, 860-867.

542 Del Valle, I., Souter, A., Maxwell, W.M.C., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Perez, J.A.,
543 2013. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and
544 vegetable oils. *Animal Reproduction Science*.138, 213-219.

545 Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C., Queiroz, A.C., Berchielli, T.T.,
546 Saliba, E.O.S., Cabral, L.S., Pina, D.S., Ladeira, M.M., Azevedo, J.A.G., 2012.
547 *Métodos para Análise de Alimentos*. 1ª ed. Visconde do Rio Branco, MG. Suprema.

548 Di Marino, D., Oteri, F., Della Rocca, B.M., D'annessa, I., Falconi, M., 2012.
549 Mapping multiple potential ATP binding sites on the matrix side of the bovine

550 ADP/ATP carrier by the combined use of MD simulation and docking. *Journal of*
551 *Molecular Modeling*. 18, 2377–2386.

552 Felberg, I., Deliz, R., Gonçalves, E.B., Antoniassi, R., Freitas, S.C., Cabral, L.C.,
553 2004. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-brasil: caracterização
554 físico química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. *Alimentos e Nutrição*.15,
555 163-174.

556 Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini,
557 L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R., Nasr-Esfahani, M.H., 2010. In vitro
558 comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for
559 cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73, 480-487.

560 Freitas, S.P., Freitas-Silva, O., Miranda, I.C., Coelho, M.A.Z., 2007. Extração e
561 fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. *Ciência e*
562 *Tecnologia dos Alimentos*. 27, 14-17.

563 Furst, R., Carvalho, G.R., Pugliesi, G., 2012. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio
564 na criopreservação de sêmen de garanhões. *Revista Brasileira Ciências Veterinárias*.
565 19, 172-177.

566 Gromadzinska, J., Reszka, E., Bruzelius, K., Wasowicz, W., Akesson, B., 2008.
567 Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium
568 supplements. *European Journal of Nutrition*. 47, 29-50.

569 Guthrie, H. D., Welch, G.R., 2012. Special Collection of Papers in Honor of Dr. John
570 K. Critser Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 78,
571 1700–1708.

572 Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane
573 integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88, 343-
574 352.

575 Heng, L., Koningsveld, V.G.A., Gruppen, H., Boekel, M.A.J.S., Vincken, J.P.,
576 Roozen, J.P., Voragen, A.G.J., 2004. Protein-flavour interactions in relation to
577 development of novel protein foods. *Food Science Technology*. 15, 217-224.

578 Henry, M., Neves, J.P., 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen
579 animal. CBRA, 2ed., 49p.

580 Lovercamp, K.W., Stewart, K.R., Lin, X., Flowers, W.L., 2013. Effect of dietary
581 selenium on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 138, 268– 275.

582 Machado, G.M., Carvalho, J.O., Filho, E.S., Caixeta, E.S., Franco, M.M., Rumpf, R.,
583 Dode, M.A., 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on
584 in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. 71 1289- 1297.

585 Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M., 2002. Low density
586 lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on
587 frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57, 1695-1706.

588 Pacheco, A.M., Scussel, V.M., 2007. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts
589 from the Amazon basin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55,
590 11087–11092.

591 Parekh, P.P., Khana, A.R., Torresa, M.A., Kitto, M.E., 2008. Concentrations of
592 selenium, barium, and radium in Brazil nuts. *Journal of Food Composition and*
593 *Analysis*. 21, 332–335.

594 Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar, S., Barik, A.K., Mohanty, D.N., Das, S.,
595 Mishra, P.C., 2011. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and
596 reduced glutathione in semen of crossbred jersey bulls on sperm parameters and
597 conception rates. *Reproduction in Domestic Animals*. 46, 636-641.

598 Plessis, L., Soley J.T., 2012. Abaxial tail implantation in the emu,
599 *Dromaius novaehollandiae*: morphological characteristics and origin of a rare avian
600 sperm defect. *Theriogenology*.77, 1137-1143.

601 PontuaL, M.L.A., Tuji, F.M., Barros, S.P., Bóscolo, F.N., Novaes, P.D., Almeida,
602 S.M., 2007. Ultra structural evaluation of the radio protective effect of sodium selenite
603 on submandibular glands en rats. *Journal of Applied Oral Science*. 15, 162-168.

604 Queiroga Neto, V., Bakke, O.A., Ramos, C.M.P., Bora, P.S., Letelier, J.C.,
605 Conceição, M.M., 2009. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) seed kernel oil:
606 Characterization and thermal stability. *Revista de biologia e farmácia*, 3. 23-36, 2009.

607 Santos, O.V., Corrêa, N.C.F., Carvalho J.R., Costa, C.E.F., França, L.F.F., Lannes,
608 S.C.S., 2013. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional
609 claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. *Food Research International*. 51,
610 841–847.

611 Sartori, E. V., Canniatti-Brazaca, S.G., Cruz, S.H., Gaziola, S.A., 2009. Concentração
612 de proteínas em gemas de ovos de poedeiras (*Gallus gallus*) nos diferentes ciclos de
613 postura e sua interferência na disponibilidade do ferro. *Ciência e Tecnologia dos*
614 *Alimentos*. 29, 481-487.

615 Souza, M.L., Menezes, H.C., 2004. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-
616 do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciência e Tecnologia dos*
617 *Alimentos*. 24, 120-128.

618 Stockler-Pinto, M.B., Mafra, D., Farage, N.E., Boaventura, G.T., Cozzolino, S.M.F.,
619 Martins, L., Silva, Z.P.G., Silveira, B.C., 2008. Produção e comercialização da
620 castanha do brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) no estado do Acre- Brasil, 1998-2006.
621 In: *Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*. Rio
622 Branco.

623 Valadares Filho, S.C., Machado, P.A.S., Chizzotti, M.L., 2016. CQBAL 3.0. Tabelas
624 Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos. Disponível em
625 <<http://www.ufv.br/cqbal>>.

626 Zubair, M., Ali, M., Ahmad, M., Sajid, S.M., Ahmad, I., Gul, S.T., 2015. Effect of
627 Selenium and Vitamin E on cryopreservation of semen and reproductive performance
628 of animals (a review). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 3, 82-86.

629

630 Tabela 1: Composição dos meios experimentais utilizados na congelação de sêmen
 631 bovino

Concentração de extrato da castanha-do-brasil (%)	Água (%)	Triladyl (%)	Gema de ovo (%)	Extrato de castanha (%)
0	60	20	20	0
25	60	20	15	5
50	60	20	10	10
75	60	20	5	15
100	60	20	0	20

632

633

634 Tabela 2: Composição química do extrato da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*),
 635 utilizado no meio diluidor na criopreservação de sêmen de touros Nelore

Componente	Extrato da Castanha-do-brasil
Umidade (%)	50,51%
Proteína Bruta (%)	42,95
Lipídios (%)	18,72
Matéria Mineral (%)	7,94
Selênio (mg/kg)	1,62

636 Médias obtidas em triplicatas;

637 Proteína (N x 5,46 conforme Severo, 2014).

638

639 Tabela 3: Composição em ácidos graxos das frações lipídicas obtidas a partir do extrato
 640 da castanha-do-brasil

Ácidos graxos	Código	%
Saturados		
Láurico	C12:0	0,01
Mirístico	C14:0	0,01
Palmítico	C16:0	0,73
Esteárico	C18:0	0,57
Insaturados		
Oleico	C18:1n9c	1,09
Linoleico	C18:2n6c	1,08
Total de Gordura Poli- insaturada	-	1,08
Total de Gorduras	-	2,20
Insaturadas		
Total de Gorduras Saturadas	-	1,37

641
 642

643 Tabela 4: Valores relativos à morfologia espermática e teste hiposmótico (HOST) de
 644 sêmen criopreservado de touros Nelore

Concentrações do extrato da Castanha-do-brasil								
Item	0%	25%	50%	75%	100%	CV	L*	Q**
Defeitos	6,38	6,6	8,08	8,80	14,98	76,32	0,0004	0,080
totais¹								
Defeitos	1,66	1,24	1,14	1,28	1,72	97,51	0,88	0,135
maiores								
Defeitos	4,72	5,36	6,94	7,52	13,2	87,53	0,0003	0,133
menores²								
HOST³	24,06	20,98	19,97	19,46	14,13	37,22	0,0006	0,578

645 CV= Coeficiente de variação;

646 * Efeito linear após a descongelação;

647 **Efeito quadrático após a descongelação;

648 ¹Y = 5,08 + 0,07X (R² = 0,12);

649 ²Y = 3,71+ 0,07X (R² = 0,13);

650 ³Y = 23,9 – 0,083X (R² = 0,13);

651

652 Tabela 5: Integridade da membrana plasmática avaliada pela análise de epifluorescência,
 653 de acordo com a concentração de extrato de castanha-do-brasil em substituição
 654 à gema de ovo.

Concentração de extrato da Castanha-do-brasil								
Membrana Plasmática	0%	25%	50%	75%	100%	CV	L*	Q*
Íntegra¹	24.88	27.48	23.78	29.44	20.54	33.48051	0.2109	0.0330
Lesada²	75.12	72.52	76.22	70.5	79.46	11.29	0.2109	0.0330

655 CV= Coeficiente de variação;

656 * Efeito linear após a descongelação;

657 **Efeito quadrático após a descongelação;

658 ¹Y = 24.62 + 0.13 X - 0.0015X² (R²= 0.04)

659 ² Y = 75.38 - 0.13 X + 0.0015X² (R²= 0.04)

660 Tabela 6: Correlação entre células espermáticas com membrana plasmática íntegra,
661 semilesados e lesada com o potencial de membrana mitocondrial

	Com potencial de MM	Sem potencial de MM
Com potencial de MM	1.00000	<.0001
Sem potencial de MM	<.0001	1.00000
MP lesada	0.3988	0.3988
MP semilesados	0.0900	0.0900
MP íntegra	0.0048	0.0048

662

663 Tabela 7: Motilidade espermática do sêmen de touros Nelore após diluição e durante o
 664 teste de termorresistência (TTR) após descongelação

Concentração ¹ (%)	Motilidade do sêmen Pós diluição (%)	Motilidade espermática (%) no TTR			
		0 hora*	1 hora*	2 horas**	3 horas
		CV:26,96	CV:37,14	CV: 71,40	CV:115,75
0	73,2	51,2	44,0	36,0	19,6
25	70,4	49,2	42,8	27,2	14,2
50	70,4	48,0	40,0	20,8	13,2
75	70,4	49,6	46,8	27,2	19,2
100	69,6	30,8	27,2	20,2	10,0

665 Valores obtidos por meio do teste estatístico contraste de regressão;

666 *Efeito quadrático;

667 **Efeito linear;

668 ¹Teor de substituição da gema de ovo pelo extrato da castanha-do-brasil;

669 Efeito dos tratamentos na hora 0: $Y = 49,44 + 0,19X - 0,0035X^2$ ($R^2 = 0,20$);

670 Efeito dos tratamentos na hora 1: $Y = 42,19 + 0,19X - 0,0031X^2$ ($R^2 = 0,09$);

671 Efeito dos tratamentos na hora 2: $Y = 32,60 - 0,13X$ ($R^2 = 0,05$);

672

673 Tabela 8: Vigor (escala de 0-5) de espermatozoides de touros Nelore após diluição e
 674 durante o teste de termorresistência rápido (TTR)

Vigor do (%) ¹	Vigor do sêmen	Vigor espermático (%) no TTR			
		0 hora	1 hora	2 horas ²	3 horas
Pós diluição					
0	3,1	2,5	2,1	1,9 ^a	1,2
25	3,1	2,4	2,0	1,3 ^b	0,8
50	3,2	2,4	2,0	1,0 ^b	0,6
75	3,1	2,5	2,3	1,6 ^{ab}	0,9
100	3,0	2,1	2,8	1,4 ^b	0,8

675 Valores obtidos por meio do teste estatístico Kruskal wallis; Letras diferentes na
 676 mesma coluna indica diferença estatística;

677 ¹Teor de substituição da gema de ovo pelo extrato da castanha-do-brasil;

678 4 Diferença estatística (P<0,05).

679

680 5 Tabela 9: Coeficiente de variação dos parâmetros da cinética espermática obtidos pelo
 681 sistema de análise computadorizada da motilidade espermática no sêmen de touros da
 682 raça Nelore

Parâmetro	Teor de extrato da castanha-do-brasil					CV*	L**	Q***
	0%	25%	50%	75%	100%			
MT (%) ¹	4,52	1,60	0,72	0,80	0,40	173,28	< .0001	0,0048
MP (%) ²	1,48	0,40	0,20	0,20	0,08	245,85	< .0001	0,01
VAP	52,43	39,16	47,34	44,87	34,17	61,53	0,07	0,78
VSL ³	36,80	27,06	29,59	31,57	22,50	57,88	0,02	0,95
VCL	107,44	77,92	94,12	87,96	79,19	62,57	0,19	0,64
ALH ⁴	5,58	2,67	2,21	3,23	1,30	113,36	0,0003	0,18
BCF ⁵	24,92	22,68	19,44	18,54	14,58	66,71	0,004	0,91
STR ⁶	67,60	50,88	50,48	46,84	43,32	54,18	0,003	0,27
LIN ⁷	35,68	29,92	27,12	26,00	20,28	63,20	0,002	0,89

683 6 0%: Controle; 25%: substituição de 25% da gema de ovo pelo extrato da castanha-
 684 do-brasil; 50%: substituição de 50% da gema de ovo pelo extrato da castanha-do-
 685 brasil;75%: substituição de 75% da gema de ovo pelo extrato da castanha-do-brasil;
 686 100%: sêmen criopreservado apenas com o extrato da castanha-do-brasil;

687 7 *Coeficiente de variação;

688 8 **Efeito linear após a descongelação;

689 9 ***Efeito quadrático após a descongelação;

690 10 ¹ $Y = 4,27 - 0,10X + 0,0006x^2$ ($R^2 = 0,20$);

691 11 ² $Y = 1,37 - 0,03X + 0,0002x^2$ ($R^2 = 0,14$);

692 12 ³ $Y = 34,32 - 0,09X$ ($R^2 = 0,29$);

693 13 ⁴ $Y = 4,59 - 0,03X$ ($R^2 = 0,08$);

694 14 ⁵ $Y = 24,99 - 0,09X$ ($R^2 = 0,06$);

695 15 ⁶ $Y = 62,34 - 0,2X$ ($R^2 = 0,05$);

696 16 ⁷ $Y = 34,74 - 0,13X$ ($R^2 = 0,06$);

697

698 Tabela 10: Média da taxa de clivagem obtida na fertilização in vitro utilizando sêmen
 699 criopreservado com e sem extrato de castanha-do-brasil

Tratamento	Taxa de clivagem (%)	CV*	L**	Q***
0%	70.33			
25%	70.00			
50%	37.29			
75%	54.66	15.81	0.0009	0.0123
100%	51.66			

700 *Coeficiente de variação

701 **Efeito linear após o descongelamento

702 ***Efeito quadrático após o descongelamento

703 $Y = 73.73700759 - 0.7274500X + 0.00516802X^2$ ($R^2 = 0.28$)

704

ANEXO

ANEXO A. Solução para avaliação da integridade de membrana plasmática

A.1 Solução estoque de IP (0,75nM) – Solução I

- IP10 mg
- Solução salina 0,9%20 mL

Obs: aliquotar em volumes de 10 µL e conservar a -20 °C protegido da luz

A.2 Solução estoque de C-FDA – Solução II

- C-FDA 9,2 mg
- DMSO 20 mL

A.3 Solução estoque de formaldeído – Solução III

- Formaldeído 40%4 mL
- Solução Salina 0,9% 96 mL

A.3 Solução estoque de citrato de sódio 3% - Solução IV

- Citrato de sódio3 g
- Solução salina 0,9%100 mL

A.4 Solução de trabalho de C-FDA

- Solução I 2 %
- Solução II 1 %
- Solução III 1 %
- Solução IV96 %

Obs: preparar diariamente e estocar a 4 °C, protegido da luz.