



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

JANAINA BARROS LUZ

**ADIÇÃO DE EXTRATO DE AÇAÍ AO DILUENTE DE CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN DE TOUROS**

**BELÉM
2018**

JANAINA BARROS LUZ

**ADIÇÃO DE EXTRATO DE AÇAÍ AO DILUENTE DE CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN DE TOUROS**

Tese apresentada a Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do curso de doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, área de concentração: Sistemas de Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a Dr^a Kaliandra Souza Alves
Co-orientadores: Prof. Dr. Luis Rennan Sampaio
Oliveira e Luiz Fernando de Souza Rodrigues

**BELÉM
2018**

Luz, Janaina Barros

Adição de extrato de açaí ao diluente de criopreservação do sêmen de touros. / Janaina Barros Luz. – Belém, PA, 2018.

53 f.

Tese (Doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) –
Universidade Federal Rural da Amazônia.

Orientador: Profa. Dra. Kaliandra Souza Alves.

1. Touros – Criopreservação de Semên. 2. Extrato de Açaí. 3. Membrana Plasmática – Integridade Estrutural. 4. Alterações Espermáticas – Membrana Plasmática. 5. Reprodução Animal. I. Alves, Kaliandra Souza (orient.). II. Título.

CDD – 636.08926

JANAINA BARROS LUZ

**ADIÇÃO DE EXTRATO DE AÇAÍ AO DILUENTE DE CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN DE TOUROS**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do curso de doutorado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, área de concentração: Sistemas de Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Doutora.
Orientadora: Prof^a. Dra. Kaliandra Souza Alves

Aprovada em 16/10/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Kaliandra Souza Alves - Presidente

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dr^a. Daiany Íris Gomes – 1º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dr. Lucas Jacomini Abud

UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ

Dr. André Maciel Crespilho –3º Examinador

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Dr. Marcos Antonio Lemos de Oliveira – 4º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEDICO

À minha família

Pelo amor incondicional, por serem meu porto seguro e por sempre apoiar minhas escolhas.

Ao meu esposo

Rafael Campelo Silva, pelo amor, companheirismo dedicação e paciência.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sua misericórdia, ser meu guia em meio as dificuldades de cada fase e por ter me proporcionado chegar até aqui.

A minha família, em especial minha mãe **Marivalda Aguiar Barros**, pelo amor, zelo, torcida e incentivo para que eu nunca desistisse dos meus objetivos. Obrigada por apoiarem todas as minhas escolhas, por serem minha referência de amor incondicional, sabedoria e perseverança. Amo vocês.

Ao meu esposo, **Rafael Campelo Silva** pelo companheirismo, paciência e por partilhar comigo cada momento dessa caminhada, sempre torcendo e me incentivando, principalmente nos dias de cansaço e desânimo. A minha eterna “**pretinha**” que era minha calma quando eu chegava em casa, sempre me recebia com todo o amor do mundo. Obrigada por existido em nossas vidas, sempre te amaremos.

A minha orientadora **Kaliandra Souza Alves** pela amizade, ensinamentos e incentivo em todos os momentos. Obrigada por ser um exemplo de profissional, por ter o coração enorme e principalmente por acreditar em mim, quando nem eu acreditava. Minha gratidão!

Ao **Luis Rennan Sampaio Oliveira**, por ter aceito o desafio de ser meu co-orientador e por me abrir as portas do laboratório de reprodução. Obrigada por todos os ensinamentos e pelo auxílio para que cada etapa pudesse ser realizada. Obrigada por me acalmar nos meus momentos de desespero me dizendo que daria certo. “A gratidão é a memória do coração”.

Aos professores **Rafael Mezzomo e Daiany Íris**, por todo o apoio fornecido ao longo desses anos, por partilharem suas experiências e por estarem sempre disponíveis quando precisei. Muito obrigada pela ajuda e incentivo de vocês.

Ao professor **Luiz Fernando de Souza Rodrigues** que se colocou à disposição para me orientar no início do doutorado.

Ao professor **André Crespilho**, por toda contribuição fornecida para realização deste trabalho e por estar sempre disponível quando precisei. Muito obrigada.

Ao professor **Marcos Antonio Lemos**, pela colaboração na construção e correção dos artigos. Obrigada pelo conhecimento compartilhado. Ao **José Carlos Ferreira**, pela disponibilidade e vontade em ajudar. Obrigada por tudo.

A **equipe LABRAC** (Daniele, Aline, Viviane, Rafael, Raphael Morais, Mariana, Cláudia, Manoel, Lucas, Aller e Luam), por todo suporte durante a realização do projeto. Vocês foram essenciais e tornaram tudo mais fácil nos momentos de cansaço. Obrigada pela doação e bom humor durante o trabalho.

A **Ernestina Ribeiro dos Santos**, pela amizade, carinho, incentivo, e por sempre ter aquela palavra de conforto no momento exato. Obrigada por ser essa grande amiga.

A **Sandra de Sousa Barcelos**, pela amizade, disposição em ajudar independente da situação, e principalmente pelo entusiasmo e bom humor que contagiam. **Dayana Lima**, pela amizade, carinho e vontade em ajudar. Obrigada por tudo meninas!

Ao senhor **Rafael Saldanha**, pelo empréstimo dos **animais** que foram essenciais para o desenvolvimento do projeto.

A Secretaria Municipal de Produção Rural – SEMPROR, na pessoa do secretário **Eurival Martins**, pela liberação para que fosse possível a execução deste trabalho.

Aos antigos e novos **amigos** que conquistei durante essa caminhada. Obrigada pelo carinho de vocês.

À **Universidade Federal Rural da Amazônia**, Campus de Parauapebas por me acolher desde a graduação e pelo apoio durante a pós-graduação, e **ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia** pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Aos **servidores** da UFRA-Parauapebas, principalmente Júnior, Clodomir, Luciano e Chiquinho por estarem sempre disponíveis para ajudar.

A todos os **mestres** que partilharam seus conhecimentos durante essa jornada. Cada um de vocês foi fundamental na minha formação. Obrigada!

A **todos** aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Obrigada a todos!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

ADIÇÃO DE EXTRATO DE AÇAÍ AO DILUENTE DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE TOUROS

RESUMO

O processo de criopreservação das células espermáticas é uma biotécnica importante para a reprodução animal, pois garante a rápida difusão de material com elevado mérito genético. Porém, os espermatozoides são expostos a efeitos negativos em sua estrutura e funcionalidade, principalmente ocasionados pela produção em excesso de espécies reativas ao oxigênio durante a criopreservação. Adicionalmente, existem diferenças de sensibilidade a congelação das células espermáticas entre os indivíduos, devido os diferentes ejaculados não suportarem a mesma resistência a congelação. Assim, diversas substâncias com ação antioxidante têm sido adicionadas aos meios diluidores de congelação do sêmen. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da adição de extrato de açaí ao diluente de criopreservação do sêmen de touros sobre a morfologia, cinética e integridade da membrana plasmática das células espermáticas. Os ejaculados foram coletados de cinco touros que apresentavam baixa capacidade de congelação dos espermatozoides, sendo distribuídos nos grupos experimentais, controle (não recebeu extrato de açaí) e nos demais adicionou-se extrato de açaí nas proporções de, 5, 10, 15 ou 20 mg/mL de diluente de congelação. As alterações espermáticas apresentaram efeito linear decrescente com a adição do extrato de açaí. Quando avaliada por epifluorescência, a integridade da membrana plasmática foi superior após a adição do extrato de açaí ao diluente de criopreservação. O extrato de açaí não apresentou influência sobre a cinética dos espermatozoides. A adição do extrato de açaí ao diluente de congelação garante melhor preservação da integridade estrutural da membrana plasmática de espermatozoides no sêmen com baixa tolerância ao processo de criopreservação.

Palavras-chave: antioxidante, bovinos, congelação, *Euterpe oleracea Martius*, membrana.

ADDITION OF AÇAÍ EXTRACT TO BULL SEMEN CRYOPRESERVATION DILUENT

ABSTRACT

The cryopreservation process of sperm cells is a important biotechnology in the field of animal reproduction since it allows the fast spread from males of high genetic merit. Nevertheless, the spermatozoa are exposed to negative effects that affect on structure and functionality, mainly due to the excessive production of reactive oxygen species during the process. Moreover, there are sensitivity differences among individuals concerning the resistance of the cells, that is, they cannot resist to the same resistance to freezing. Therefore, several antioxidant substances have been added to the diluent media used in the preservation of semen. We evaluated the outcome of the addition of açaí extract to bull semen cryopreservation diluent with respect to kinetics, morphology and plasma membrane integrity of sperm cells. The sperm samples were collected from five bulls whose spermatozoa had a history of low tolerance to the cryopreservation process. The samples were distributed between the control subset (to which açaí extract was not added) and the rest, which were added with açaí extract in the proportions of 5, 10, 15 or 20 mg/mL of diluent during the freezing process. The sperm alterations presented a linear decreasing response to the addition of açaí extract. In the analysis by epifluorescence, the plasma membrane integrity was higher after the addition of açaí extract to the cryopreservation diluent. The açaí extract did not influence the kinetics of the spermatozoa. The addition of açaí extract to the freezing diluent allows a better preservation of the structural integrity of the plasma membrane of spermatozoa in semen with low tolerance to the cryopreservation process.

Keywords: antioxidant, bovines, freezing, *Euterpe oleracea Martius*, membrane.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
BSPs	Proteína presentes no plasma seminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
TRIS	Trishidroximetil-aminometano
TES	N-tris-hidroximetil-aminometano ácido sulfônico
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH ⁻	Radical hidroxila
CAT	Catalase
SOD	Superóxido dismutase
Mg	Miligrama
g	Gramma
OH	Hidroxila
H ⁺	Hidrogênio
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazi
mL	Mililitro
CASA	Computer-assisted sperm analysis
ATP	Adenosina trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
rpm	Rotação por minuto
µL	Microlitro
C-FDA	Diacetato de 6- carboxifluoresceína
IP	Iodeto de propídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Phosphate buffered saline

nm	Nanômetro
ANOVA	Análise de Variância
LSD	Teste de Fisher
SAS	Statistical Analysis System
MOT	Motilidade Total
PROG	Motilidade Progressiva
VSL	Velocidade Retilínea
VAP	Velocidade do Trajeto
LIN	Linearidade
IMP	Integridade da Membrana Plasmática
µm	Micrômetro
s	Segundos
ROO°	Radical peroxil
ROOH	Hidroperóxido lipídico
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico

Sumário	
1 The use of açai as a potential antioxidant for bovine semen cryopreservation¹	15
Abstract	15
Resumo	16
1. Introduction	16
2. Bovine semen cryopreservation	17
2.1. General facts	17
2.2. Cryoprotectants in diluents	19
2.3. Oxidative stress	20
2.4 Antioxidants	21
2.5 Açai	24
Final Remarks	27
Conflict of Interest	28
References	28
A adição de extrato de açai ao diluente de criopreservação melhora a qualidade do sêmen de touros com baixa capacidade de congelamento espermática?¹	39
Resumo	39
Abstract	40
Introdução	41
Material e Métodos	42
Resultados	45
Discussão	46
Referências	48

The use of açai as a potential antioxidant for bovine semen cryopreservation¹
(O uso do açai como potencial antioxidante para a criopreservação de sêmen bovino)

Abstract

Semen cryopreservation is an important tool for animal reproduction due to its potential for fast dissemination of genetics from males with high genetic merit. However, cryopreservation protocols continue to provoke negative effects on sperm cell structure and function, thus leading to lower viability. This reduction in viability is correlated with excessive production of reactive oxygen species (ROS) that generate oxidative stress, which is responsible for lowering sperm motility, alteration in plasma membrane fluidity, and lipidic peroxidation. Due to these facts, it becomes necessary to add substances with the antioxidant potential for semen cryopreservation to confer additional protection to sperm cells. A variety of compounds from plants and fruits have been incorporated to such media due to their antioxidant potential. In such context, açai has gained attention by researchers due to its substantial antioxidant capacity, particularly attributed to its polyphenolic fraction, which is rich in anthocyanins. Moreover, it also contains resveratrol and quercetin in its composition, which has activity against free radicals. In general terms, the antioxidant of natural sources (i.e., açai) deserves special attention since it contributes to the preservation of the national flora, also displays a significant potential to improve the quality of frozen-thawed bovine semen.

Keywords: Bull; *Euterpe oleracea Martius*; freezing; spermatozoa; membrane.

¹Este artigo foi aceito para publicação na Revista Medicina Veterinária (UFRPE) e segue suas normas de apresentação.

Resumo

A criopreservação do sêmen é uma ferramenta importante para a reprodução animal devido propiciar rápida disseminação de reprodutores com elevado mérito genético. Entretanto, os protocolos de criopreservação ainda provocam efeitos negativos a estrutura e a funcionalidade das células espermáticas, com conseqüente redução de sua viabilidade. Essa redução, está relacionada com a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs) que geram o estresse oxidativo, responsável pela redução da motilidade espermática, alteração na fluidez da membrana plasmática e peroxidação lipídica. Diante disso, é necessário adicionar substâncias com ação antioxidante aos meios diluidores de congelamento do sêmen para garantir proteção adicional aos espermatozoides. Uma variedade de compostos oriundos de plantas e frutos têm sido incorporados a esses meios por possuírem potencial antioxidante. Nesse contexto, o açaí tem despertado interesse de pesquisadores por possuir expressiva capacidade antioxidante, especialmente atribuída à sua fração polifenólica, rica em antocianinas, além de possuir, em sua composição, quercetina e resveratrol que também apresentam ação contra radicais livres. De modo geral, os antioxidantes de origem natural, como o açaí, merecem atenção especial tendo em vista que, além de contribuir para preservação da flora nacional, apresentam significativo potencial para a melhoria da qualidade do sêmen bovino criopreservado.

Palavras-chave: Congelamento; espermatozoides; *Euterpe oleracea Martius*; membrana; touros.

1. Introduction

Semen cryopreservation was initially described during the fifties since it was found that glycerol displays cryoprotectant potential for sperm cells (Holt, 2000; Kaka et al., 2015). This biotechnology is important for animal production because it contributes to the rapid dissemination of genetic material of high genetic merit to increase milk and meat productions. Additionally, it favors the global commercialization of animals of high genetic merit and further allows the establishment of crossbreeding zebu cows with taurine bulls by artificial

insemination programs using frozen-thawed semen. Furthermore, it allowed the usage of animals that could not be used under natural mating conditions (Artmann et al., 2015; Moore e Hasler, 2017) due to acquired lesions without genetic compromise (Sousa et al., 2012).

Despite the fact that cryopreservation is a routine for bovine reproduction, the advances in the cryopreservation process of bovine semen during the last few decades have been slow (Layek et al., 2016). The currently used protocols continue to provoke structural and functional damage to sperm cells, such as alterations on semen homeostasis, reduction in sperm motility and plasma membrane integrity after cryopreservation (Celeghini et al., 2008).

The reduction of sperm viability during cryopreservation is related to the excessive production of reactive oxygen species (ROS) that generate oxidative stress (Büyükleblebici et al., 2014). The oxidative stress diminishes sperm fertilizing-ability because motility is reduced and further provokes alterations in both plasma membrane fluidity and integrity. Moreover, it also leads to DNA damage and lipidic peroxidation (Cocchia et al., 2011).

With the aim to minimize the impact of such effects on sperm cells, antioxidants have been added to the semen cryopreservation media. More recently, a variety of compounds derived from plants and fruits (Bucak et al., 2015; Sapanidou et al., 2015; Sobeh et al., 2017) have been added to such media due to their antioxidant potential. For these reasons, the aim was to describe the antioxidant potential of açai (*Euterpe oleracea* Martius) for bovine semen cryopreservation.

2. Bovine semen cryopreservation

2.1. General facts

The principle of cryopreservation is to block the metabolic processes in sperm cells and maintain its properties for long periods of time under low temperatures (Vishwanath and Shannon, 2000). However, the currently used protocols still allow the occurrence of both

structural and functional damage to sperm cells, with diminished motility and plasma membrane integrity after cryopreservation (Celeghini et al., 2008).

The cryopreservation protocols for bovine semen include the cooling step, in which the temperature is lowered to 4 - 5 °C, followed by a stabilization period that is necessary for sperm membrane adaptation to low temperatures. Depending upon diluent choice, this period (also known as equilibrium period) may vary from 30 minutes to 72 hours (Leite et al., 2010; Fleisch et al., 2017). The cooling step induces the onset of the thermal stress, also described as a thermal shock (Watson, 2000).

The heat shock is the result of thermal stress that occurs during cryopreservation and generally provokes alterations in plasma membrane permeability due to phospholipids' rearrangements. These molecules transit from the clear liquid state to a gel state, thus reducing cellular metabolism, causing loss of intracellular components, loss of sperm motility, and diminished fertilizing-ability (Watson, 2000; Patel et al., 2016).

The ideal conditions are those that allow sufficient cellular dehydration but not excessively, thus avoiding the formation of intracellular ice crystals. Moreover, the freezing curve must be fast enough to reduce the exposure of sperm cells to hyperosmotic conditions, minimizing osmotic stress and thus proportionate good conditions for survival of sperm cells after thawing (Mazur, 1970; Medeiros et al., 2002; Peña et al., 2011).

The success of cryopreservation depends on the bull-dependent sensibility of sperm cells to cryopreservation (Gürler et al., 2015). Studies in horses (Hartwig et al., 2014; Ramires Neto et al., 2014; Ferreira et al. 2018; Ferreira-Silva et al., 2018ab) and swine (Yeste et al., 2013; Yeste, 2016) have demonstrated the actual response to cryopreservation varies among animals of the same species. For this reason, males with the semen of high and low tolerance to cryopreservation, vary in the lipidic composition of the sperm plasma membrane, their diet or breed (García et al., 2011; Gürler et al., 2015; Yeste, 2016).

Under such context, many additives that do not show improvements for semen freezing from bulls of high tolerance to cryopreservation, within the requirements preconized by CBRA (2013), may be beneficial for semen of bulls of low tolerance to cryopreservation. Such additives that may play important roles to allow the usage of such bulls of low freezing potential but with high genetic merit.

2.2. Cryoprotectants in diluents

There is a variety of diluents that exert influence on the survival of sperm cells during cryopreservation since those reagents play important roles by minimizing the deleterious effects on sperm cells provoked by freezing. However, it is necessary to address the interaction of media composition and freezing/cooling rates to ensure a greater viability of sperm cells after cryopreservation (Chaveiro et al., 2006).

The components used in freezing diluents are used for the maintenance of its own osmolarity and pH and avoidance of the growth of microorganisms by addition of antibiotics. Sources of lipoproteins or high molecule weight compounds are added to diluents to prevent thermal shock, and the addition of glucose and fructose as energy sources. Moreover, there are also cryoprotectants and antioxidants in its composition (Oliveira et al., 2013; Souza et al., 2017).

The cryoprotectants are added to diluents can be classified as non-penetrating (extracellular) or penetrating (intracellular), based on their mechanisms of action. The extracellular cryoprotectants are represented by high molecular weight macromolecules, such as sugars, the egg-yolk lipoprotein, milk proteins, and aminoacids (Lima-Verde et al., 2017). Such substances act via the osmotic effects by increasing the exit of water from cells and thus preventing intracellular ice crystal formation and further promote greater plasmatic membrane stability (Avila-Portillo et al., 2006).

On the other hand, penetrating cryoprotectants are of low molecular weight compounds, high solubility in aqueous solution, and cellular toxicity (Nash, 1966). In general terms, these cryoprotectants mechanistically act by their properties to connect with water molecules that modify the orientation of intracellular ice crystals and generate a less toxic environment for sperm cells (Nash, 1966; Holt, 2000).

2.3. Oxidative stress

During semen cryopreservation, several deleterious effects are observed in sperm cells, such as reduction of motility and mitochondrial activity. Moreover, damage to the plasmic membrane can be detected, thus resulting in diminished fertilizing-ability (Hu et al., 2010). One of the main factors associated with lowered sperm viability during cryopreservation is the ROS production (Büyükleblebici et al., 2014).

In bovine semen, ROS can be generated by physiological sperm metabolism and by the presence of dead and immature cells (Sariözkan et al., 2009). According to Bansal and Bilaspuri (2011), the ROS with a greater effect on sperm cells are superoxide anions (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2).

ROS produced in small quantities are physiologically important for their importance in sperm capacitation, acrosome reaction, and maintenance of fertilizing-ability (Burnaugh et al., 2010). Therefore, minimum ROS concentrations are indispensable for maintaining normal cellular function (Cocchia et al., 2011). However, when ROS production exceeds the defense mechanism by antioxidant systems that are naturally found in seminal plasma and on diluents used for cryopreservation then occurs oxidative stress (Andrade et al., 2010).

The oxidative stress diminishes the sperm fertilizing-ability because it reduces sperm motility, provokes deleterious alterations in both plasma membrane integrity and fluidity, thus

resulting sperm DNA damage and lipidic peroxidation (Tuncer et al., 2010; Cocchia et al., 2011).

The lipidic peroxidation occurs due to the high quantities of polyunsaturated fatty acids found in sperm plasma membrane (Cocchia et al., 2011). The ROS react with sperm membrane-bound polyunsaturated fatty acids and reduces membrane permeability that ultimately leads to the loss of sperm function (Aitken and Krausz, 2001).

Sperm cells do not display an efficient antioxidant system that could be capable to protect them from excessive ROS production. This limitation is due to the small cytoplasm volume, which holds limited endogenous antioxidant capacity (DuPlessis et al., 2008). The main enzymes found in seminal plasma with the capacity to naturally protect sperm cells against ROS are catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (Bansal and Bilaspuri, 2011).

The dilution step during the semen cryopreservation process leads to lower protective capacity to sperm cells. Due to the high concentration of polyunsaturated fatty acids, sperm cells can be inefficient in preventing lipidic peroxidation, due to its limited antioxidant system (Sapanidou et al., 2015). Moreover, ROS production and oxidative stress are inevitable during both freezing and thawing steps. For this reason, it becomes necessary to promote an additional protection additional during semen cryopreservation. This additional protection can be accomplished by adding substances with antioxidant activity to diluents (Souza et al., 2017).

2.4 Antioxidants

The process of cryopreservation reduces the viability of sperm cells due to the changes in temperature that provoke the thermal shock, determining alterations in plasma membrane permeability, loss of intracellular components, and motility reduction. Semen cryopreservation also contributes to increased ROS production that favors the occurrence of both lipidic peroxidation and diminished sperm cell quality (Patel et al., 2015).

The research on semen cryopreservation continues to be carried out to validate new cryoprotectants or other substances to be added to diluents to further reduce the cryoinjuries to sperm cells (Moraes et al., 2010; Takahashi et al., 2012; Kandelousi et al., 2013; Mocé et al., 2014; Kaka et al., 2015; Patel et al., 2016). However, recent studies have focused on the search for substances with antioxidant potential for minimizing the oxidative stress (Patel et al., 2016).

As previously described, sperm cells are vulnerable to oxidative stress during cryopreservation due to their limited antioxidant capacity (Du Plessis et al., 2008). In light of these facts, various strategies have been developed for reducing this damage and to improve semen quality after thawing. Therefore, it is important to supplement diluents with substances that carry antioxidant potential, such as enzymes, vitamins, and minerals (Shah et al., 2017). In general terms, these antioxidants can be added directly to cryopreservation diluents or be included in the diet of the animals before semen collection (Maia and Bicudo, 2009; Sobeh et al., 2017).

Antioxidants are classified by their enzymatic activity (enzymatic or non-enzymatic) and source (produced by the organism or not), according to Barreiros et al. (2006). Within antioxidants produced by the body, three are more prominent, the enzymatic superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Among the non-enzymatic antioxidants, the reduced glutathione (GSH), histidine peptides, iron-conjugated proteins (transferrin and ferritin), dihydrolipoic acid, and coenzyme q10 (CoQH) can be highlighted (Barreiros et al., 2006). The non enzymatic antioxidants that can be obtained from the diet are efficient against ROS production, such as α -tocopherol (vitamin E), β -carotene (vitamin A precursor), ascorbic acid (vitamin C) and phenolic compounds (Barreiros et al., 2006; Vasconcelos et al., 2007), among others.

Plants synthesize hundreds of phenolic compounds, which exert various functions and are distinguished as the most abundant and potent antioxidants found in the diet (Cerqueira et

al., 2007; Maia and Bicudo, 2009; Sobeh et al., 2017). The antioxidant activity of such compounds is primarily due to their oxide-reductive properties, a fact that allows absorbing and neutralizing ROS, to chelate triplet and singleton oxygen, and further decomposing peroxides (Degáspari and Waszczyński, 2004).

The phenolic compounds obtained from plants can be divided into two groups: flavonoids and non-flavonoids, where both classes are secondary metabolites (Degáspari and Waszczyński, 2004). The capacity of plant polyphenols to act as antioxidants in biological systems was discovered in the thirties (Bentham et al., 1936). However, the consumption of polyphenol-rich foods, their bioavailability, and other interfering factors are being largely investigated in more recent times (Fiorani et al., 2002; Behling et al., 2004).

The flavonoids are a class of natural compounds of considerable scientific and therapeutic interests (Behling et al., 2004). Among almost 4,000 members already described, the major classes are flavonoids, catechins or flavones, and isoflavones, which display great structural variation, depending on the molecule hydrogenation, hydroxylation, methylation, and sulfonation levels. Despite these facts, flavonoids hold ideal structures (C₆-C₃-C₆), composed of hydroxyl groups (-OH) bound to two aromatic rings by an oxygenated heterocyclic (Cerqueira et al., 2007).

The chemical structure of flavonoids allows an efficient activity against ROS, in a more effective manner than both C and E vitamins. The number and position of -OH groups and by glycosylation sites (Barreiros et al., 2006; Cerqueira et al., 2007) influence its antioxidant capacity. This fact is due to its intrinsic capacity for electron transfer, the stability of flavonoid radical formation, and its reactivity compared to other antioxidants. Moreover, these compounds also carry chelating capacity, solubility and cellular membrane interacting-capacity (Barreiros et al., 2006). Under this context, flavonoids notoriously act upon -OH and superoxide

anions (O₂⁻), which are considered two reactive species involved in the initiation of lipidic peroxidation (Behling et al., 2004).

Katequines are flavonoids that are highlighted by their biological activities, including antioxidant activity, anti-inflammatory roles, anti-carcinogenic, lipolytic activities, and DNA damage inhibition, when these processes are caused or mediated by ROS production (Guaratini et al., 2007). These compounds are abundant in green tea, which account for 90 % of the polyphenolic fraction (Belitz and Grosch, 2004). Due to these beneficial effects and no record of potentially damaging effects, Katequines have been used in treatments several pathologies (Vaccari et al., 2009) and for testicular hyper-thermal damage recovery (Abshenas et al., 2011).

Plant-derived substances with antioxidant potential, such as carotenoid crocin, have been associated with reductions in intracellular ROS levels with a significant increase in sperm fertilizing-ability. These findings were attributed to crocin activity that may lead to free radical removal, which may ultimately lead to greater protection against lipidic peroxidation (Sapanidou et al., 2015).

Lycopene is a carotenoid found in tomatoes and red fruits, while resveratrol is a polyphenol mainly found in grapes. Both compounds have been added to bull sperm cryopreservation media, due to their antioxidant potential (Bucak et al., 2015). These substances have been linked to free radical removal thus possibly conferring greater protection to sperm cells against oxidative stress during cryopreservation (Bucak et al., 2015).

2.5 Açaí

The açaí (*Euterpe oleracea Martius*) has gained interest in animal reproduction due to its chemical composition, mainly associated with its polyphenolic fraction that confers antioxidant protection (De Lima Yamaguchi et al., 2015). The açaí is a palm tree found throughout the North of Brazil, where it holds a relevant economic importance. The fruits have dark violet coloring and are found in bunches (Sun et al., 2010; Dias-Souza et al., 2018).

From a commercial standpoint, the açai-based industry has been significantly expanded (Heinrich et al., 2011). This expansion is attributed mainly to the food industry that relies on the açai fruit for energy drinks. This growth in interest in açai-derived products is due to its known benefits for human health. Açai has been characterized as a functional food since it contains sugars, fatty acids, and especially polyphenols that act as excellent antioxidants (Bonomo et al., 2014).

From a bromatological standpoint, açai contains proteins (8.1 g/ 100 g), total lipids (32.5 g/ 100 g), cholesterol (13.5 mg / 100 g), sugars (7.93 g / 100 g), carbohydrates (52.2 g / 100 g), vitamins (A, C, and E), beta-carotene, ferulic acid, gallic acid, catechins, and fibers. The most abundant sugars in açai are glucose and fructose, fatty acids [saturated (26.0 %), monounsaturated (60.2 %), polyunsaturated (13.3 %)], mainly linoleic and linolenic. The açai also contains flavonoids, phenolic, polyphenolic, and lignoid compounds (Schauss et al., 2006b; Rufino et al., 2011; Yuyama et al., 2011).

The most abundant polyphenols in açai are anthocyanins, and most notably, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside. Moreover, there is also quercetin and resveratrol in the açai composition (Del Pozo-Insfran et al., 2004; Schauss et al., 2006b).

The anthocyanins are a sub-group of flavonoids that are responsible for determining fruit and vegetable coloring (e.g., açai), and further carry antioxidant activity (Del Pozo-Insfran et al., 2004). The antioxidant protection conferred by anthocyanins is directly linked to the number of hydroxyl groups found in its chemical structure. This fact allows the transfer of electrons or hydrogen atoms to neutralize ROS (Volp et al., 2008). Therefore, the increasing number of OH in flavonoids is proportional to its capacity for both electron and H⁺ transfer (Barreiros et al., 2006).

The antioxidant activity of açai can also be conferred due to the presence of other flavonoids, such as quercetin, which is a natural antioxidant capable of reacting to free radicals

(superoxide and hydroxyl), and thus acts as a metallic ion chelator and blocks lipidic peroxidation. This protection is due to the lipophilic potential of such flavonoids, which are capable of interacting with the plasmatic membrane lipid bilayers. This fact further allows both H⁺ and electron transfers to free radicals, further promoting the stabilization of such radicals, and thus impeding the continuity of the chain reaction (Barreiros et al., 2006; Rufino et al., 2011).

The resveratrol, found in açai, has been used in animal semen cryopreservation media. Some reports have shown that this compound play role as a free radical remover, has effects on lipidic peroxidation, and diminishes DNA damage (Bucak et al., 2015; Longobardi et al., 2017). The açai contains other components that can be linked to their antioxidant potentials, such as C and E vitamins, ferulic acid, gallic acid, and beta-carotene. There are encouraging results from adding some of these compounds for semen cooling and freezing (Hu et al., 2011; Kutluyer et al., 2014; Affonso et al., 2017).

The antioxidant activity of açai was confirmed by *in vitro* studies. These reports found antioxidant activity against peroxy radicals, peroxide-nitrite, superoxide, and hydroxyl (Lichtenthäler et al., 2005; Schuss et al., 2006a). Moreover, these studies also found activities against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, and further demonstrated ROS removal activity in a similar fashion to the mechanisms of both superoxide dismutase and catalase (Spada et al., 2008). The antioxidant potential of açai was also investigated in isolated tissue from rat brain cortex, hippocampus, and cerebellum, and collectively showed the oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lipids and proteins (Spada et al., 2009).

The supplementation with extra-aqueous açai extracts increased the resistance of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) to both oxidative and osmotic stresses by a decrease in ROS production and pathway activation that is connected to antioxidant enzyme expression (Bonomo et al., 2014). The anthocyanins-enriched açai extract promoted greater resistance to

oxidative stress in *C. elegans* and also modulated stress-response gene expression, demonstrating antioxidant and anti-aging activities (Peixoto et al., 2016).

In humans, the consumption of açai increased the total antioxidant capacity, suggesting that it's a functional food that can promote protection against degenerative diseases that are associated to oxidative stress (Pala et al., 2018). The consumption of açai pulp also increased catalase activity, overall antioxidant capacity, and reduced ROS production in polymorphonuclear cells (Barbosa et al., 2016). These authors further concluded that açai can be considered a functional food that contributes to disease prevention, such as cancer. The use of anthocyanins-rich açai extracts displayed increased anti-proliferative capacity in a brain glioma cell line (i.e., C6), possibly due to induction of apoptosis in such cells. However, no effect of the açai extract was found on breast cancer cells (Hogan et al., 2010).

The açai also displays polyunsaturated fatty acids in its composition. These compounds can be used in semen cryopreservation media due to the potential to incorporate these acids into sperm plasma membrane and confer greater protection during the process of cryopreservation (Nasiri et al., 2012).

Final Remarks

Semen cryopreservation is an important tool both for the dissemination of genetic material of bulls of high genetic merit and for the maintenance of germplasm banks. However, the oxidative stress continues to be a limiting factor in increasing cryopreservation efficiency. In such context, antioxidants of natural sources such as the açai deserve special attention due to the potential to preserve of the national flora and due to its potential for improving the quality of bovine frozen-thawed semen.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abshenas, J.; Babaei, H.; Zare, M.H.; Allahbakhshi, A.; Sharififar, F. The effects of green tea (*Camellia sinensis*) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress. **Veterinary Research Forum**, 2(4): 242-247, 2011.
- Affonso, F.J.; Carvalho, H.F.; Lançoni, R.; Lemes, K.M.; Leite, T.G.; Oliveira, L.Z.; De Arruda, R.P. Addition of Antioxidants Myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on Sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, 59: 57-63, 2017.
- Aitken, R.J.; Krausz, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, 122(4): 497-506, 2001.
- Andrade, E.R.; Melo-Sterza, F.A.; Seneda, M.M.; Alfieri, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 34(2): 79-85, 2010.
- Artmann, T.; Toma, H.; Pinheiro, J.; Romero, J.; Carvalho, A.; Toma, C.M. Melhoramento genético de bovinos ½ sangue taurino x ½ sangue zebuino no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 22(1): 1-20, 2015.
- Ávila-Portillo, L.M.; Madero, J.I.; López, C.; León, M.F.; Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L.G.; Gómez, C.; Lozano, J.M.; Reguero, M.T. Basic points in cryopreservation. **Revistacolombiana de obstetricia y ginecología**, 57(4): 291-300, 2006.
- Bansal, A.K.; Bilaspuri, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, 2011: 1-7, 2011.
- Barbosa, P.O.; Pala, D.; Silva, C.T.; De Souza, M.O.; Do Amaral, J.F.; Vieira, R.A.L.; De Freitas, R.N. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular

- antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, 32(6): 674-680, 2016.
- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P.L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29: 113-123, 2006.
- Behling, E.B.; Sendão, M.C.; Francescato, H.D.C.L.; Antunes, M.G.; Bianchi, M.L.P. Flavonóidequercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, 15(3): 285-292, 2004.
- Belitz, H.D.; Grosch, W. **Food chemistry**. New York: Springer Verlag, 2004. 774 p.
- Benthath, A.; Rusznyak, S.; Szent-György, A. Vitamin nature of flavone. In: **Flavonoids in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1936. p.137-161.
- Bonomo, L.F.; Silva, D.N.; Boasquivis, P.F.; Paiva, J.F.C.; Martins, T.A.F.; Torres, A.G.J.; Paula, I.T.B.R.; Caneschi, W.L.; Jacolat, P.; Grossin, N.; Tessier, F.J.; Boulange, E.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditiselegans* by direct and indirect mechanisms. **PloS One**, 9(3): e89933, 2014.
- Bucak, M.N.; Ataman, M.B.; Başpınar, N.; Uysal, O.; Taşpınar, M.; Bilgili, A.; Akal, E. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, 47(5): 545-552, 2015.
- Burnaugh, L.; Ball, B.A.; Sabeur, K.; Thomas, A.D; Meyers, S.A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**, 117(2-4): 249-260, 2010.
- Büyükblebici, S.; Tuncer, P.B.; Bucak, M.N.; Eken, A.; Sariözkan, S.; Taşdemir, U.; Endirlik, B.Ü. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science**, 150(3-4): 77-83, 2014.

- CBRA - Colégio Brasileiro Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3nd ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- Celeghini, E.C.C; Arruda R.P; Andrade, A.F.C; Nascimento J.; Raphael C.F; Rodrigues P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, 104(2): 119-31, 2008.
- Cerqueira, F.M.; Medeiros, M.H.G.; Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, 30(2): 441-449, 2007.
- Chaveiro, A.; Machado, L.; Frijters, A.; Engel, B.; Woelders, H. Supports. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic. **Theriogenology**, 65:1875-1890, 2006.
- Cocchia, N.; Pasolini, M.P.; Mancini, R.; Petrazzuolo O.; Cristofaro, I.; Rosapane, I.; Sica, A.; Tortora, G.; Lorizio, R.; Paraggio, G.; Mancini, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 75(7): 1201-1210, 2011.
- De Lima Yamaguchi, K.K.; Pereira, L.F.R.; Lamarão, C.V., Lima, E.S.; Da Veiga-Junior, V.F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food chemistry**, 179: 137-151, 2015.
- Degáspari, C.H.; Waszczyński, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, 5(1): 33-40, 2004.
- Del Pozo-Insfran, D.; Brenes, C.H.; Talcott, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(6): 1539-1545, 2004.
- Dias-Souza, M.V.; Dos Santos, R.M.; Cerávolo, I.P.; Cosenza, G.; Marçal, P.H.F. *Euterpe oleracea* pulp extract: Chemical analyses, antibiofilm activity against *Staphylococcus*

- aureus, cytotoxicity and interference on the activity of antimicrobial drugs. **Microbial Pathogenesis**, 114: 29-35, 2018.
- Du Plessis, S.S.; Makker, K.; Desai, N.R.; Agarwal, A. Impact of oxidative stress on IVF. **Expert Review of Obstetrics & Gynecology**, 3(4): 539-554, 2008.
- Ferreira, H.N.; Ferreira-Silva, J.C.; Rocha, J.M.; Farrás, M.C.; Calixto, M.; Moura, M.T.; Alvarenga, M.A.; Oliveira, M.A.L. Variable inter-assay estimation of sperm DNA fragmentation in stallions classified as good and bad semen freezers. **Cryoleters**, 39: 67-71, 2018.
- Ferreira-Silva, J.C.; Basto, S.R.L.; Moura, M.T.; Rocha, J.M.; Freitas Neto, L.M.; Santos Filho, J.P.; Silva Filho, M.L.; Oliveira, M.A.L. Freezing of stallion semen: 2. in vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved using different semen extenders. **Biopreservation and Biobanking**, Accepted, 2018a.
- Ferreira-Silva, J.C.; Rocha, J.M.; Basto, S.R.L.; Ferreira, H.N.; Souza, H.M.; Freitas Neto, L.M.; Moura, M.T.; Oliveira, M.C.C.; Oliveira, M.A.L. Freezing of stallion semen: I - In vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved under different glycerol concentrations. **Pferdeheilkunde**, 34(1): 51-56, 2018b.
- Fiorani, M.; Sanctis, R.; Bellis, R.; Dachà, M. Intracellular flavonoids as electron donors for extra-cellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, 32(1): 64-72, 2002.
- Fleisch, A.; Malama, E.; Witschi, U.; Leiding, C.; Siuda, M.; Janett, F.; Bollwein, H. Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, 89: 255-262, 2017.
- García, B.M.L.; Fernández, G.; Ferrusola, C.O.; Rodríguez, A.M.; Bolañosa, J.M.; Martínez, J.A.; Tapia, J.A.; Morcuendea, D.; Peña, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the

- phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 75(5): 811-818, 2011.
- Guaratini, T.; Medeiros, M.H.G.; Colepicolo, P. Antioxidante na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, 30(1): 206- 213, 2007.
- Gürler, H.; Calisici, O.; Calisici, D.;Bollwein, H. Effects of feeding omega-3-fatty acids on fatty acid composition and quality of bovine sperm and on antioxidative capacity of bovine seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, 160: 97-104, 2015.
- Hartwig, F.P.; Lisboa, F.P. Hartwig, F.P.; Monteiro, G.A.; Maziero, R.R.D.; Freitas-Dell'aqua, C.P; Alvarenga, M.A.; Papa, F.O. Papa; Dell'aqua Jr., J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, 81(2): 340-346, 2014.
- Heinrich, M.; Dhanji, T.; Casselman, I. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) —A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, 4(1): 10-21, 2011.
- Hogan, S.; Chung, H.; Zhang, L.; Li, J., Lee, Y.; Dai, Y.; Zhou, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, 118(2): 208-214, 2010.
- Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, 62: 3–22, 2000.
- Hu, J.H.; Jiang, Z.L.; Rui, K.L.; Li, Q.W.; Zhang, S.S.; Zan, L.S.; Li, Y.K.; Xin, L. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, 62(1): 83-87, 2011.
- Hu, J.H.; Li, Q.W.; Zan, L.S.; Jiang, Z.L.; Na, J.H.; Wang, L.Q.; Jia, Y.H. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. **Animal Reproduction Science**, 117(1): 11-17, 2010.

- Kaka, A.; Wahida, H.; Rosnina, Y.; Yimer, N.; Khumrana, A.M.; Sarsaifia, K.; Behanb, A.A.; Kaka, U.;Ebrahimi, M. Improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. **Animal Reproduction Science**, 153: 1-7, 2015.
- Kandelousi, M.S.; Arshami, J.A.V.A.D.; Naserian, A.A.; Abavisani, A. The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. **Open Veterinary Journal**, 3(1): 47-52, 2013.
- Kutluyer, F.; Kayim, M.; Öğretmen, F.; Büyükleblebici, S.; Tuncer, P.B. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. **Cryobiology**, 69(3): 462-466, 2014.
- 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.
- Leite, T.G.; Vale Filho, V.R; Arruda, R.P; Andrade, A.F.C; Emerick, L.L; Zaffalon, F.G; Martins, J.A.M; Andrade, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, 120(1-4): 31-38, 2010.
- Lichtenthäler, R.; Rodrigues, R.B.; Maia, J.G.S.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F.Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart.(Acai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 56(1): 53-64, 2005.
- Lima-Verde, I.B.; Johannisson, A.; Ntallaris, T.; Ai-Essawe, E.; Al-Kass, Z.; Nongbua, T.; Dórea, F.; Lundeheim, N.; Kupisiewicz, K.; Edman, A.; Morrell, J.M. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, 53(1): 2017.

- Longobardi, V.; Zullo, G.; Salzano, A.; De Canditiis, C.; Cammarano, A., De Luise, L.; Gasparrini, B. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. **Theriogenology**, 88: 1-8, 2017.
- Maia, M.S.; Bicudo, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 33(4): 183-193, 2009.
- Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, 168(3934): 939-49, 1970.
- Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, A.T.D.; Rodrigues, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, 57(1): 327-344, 2002.
- Mocé, E.; Tomás, C.; Blanch, E.; Grahm, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. **Animal**, 8(5): 771-776, 2014.
- Moore, S.G.; Hasler, J.F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, 100(12): 10314-10331, 2017.
- Moraes, E.A.; Graham, J.K.; Torres, C.A.A.; Meyers, M.; Spizziri, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, 118(2-4): 148-154, 2010.
- Nash, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. **Cryobiology**, 46: 179-211, 1966.
- Nasiri, A.H.; Towhidi, A.; Zeinoaldini, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, 44(s1): 550-555, 2012.
- Oliveira, G.C.; Celeghini, E.C.C.; Fernandes, C.B.; Mattos, C.B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, 37(1): 23-28, 2013.
- Pala, D.; Barbosa, P.O.; Silva, C.T.; De Souza, M.O.; Freitas, F.R.; Volp, A.C.P.; De Freitas, R.N. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins,

- cholesterylestertransferto high-densitylipoproteinand redox metabolism: A prospectivestudy in women. **Clinical Nutrition**, 37(2): 618-23, 2018.
- Patel, A.; Saxena, A.; Swain, D.K.; Yadav, D.; Yadav, S.S.; Kumar, A.; Kumar, A. Effect of supplementation of butylated hydroxytoluene on post-thaw sperm viability, motility and membrane integrity of Haryana bulls. **Veterinary World**, 8(6): 808, 2015.
- Patel, M.K.; Cheema, R.S.; Bansal, A.K.; Gandotra, V. KA 31-kDa seminal plasma heparin-binding protein reduces cold shock stress during cryopreservation of cross-bred cattle bull semen. **Theriogenology**, 86(6): 1599-1606, 2016.
- Peixoto, H.; Roxo, M.; Krstin, S.; RöHrig, T.; Richling, E.; Wink, M. An anthocyanin-rich extract of acai (*Euterpe precatoria* Mart.) increases stress resistance and retards aging-related markers in *Caenorhabditiselegans*. **Journal of agricultural and food Chemistry**, 64(6): 1283-1290, 2016.
- Peña, F.J.; García, M.B.; Samper, J.C.; Aparicio, I.M.; Tapia, J.A.; Ferrusola, C.O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, 76(7): 1177-1186, 2011.
- Ramires Neto, C.R.; Monteiro, G.A.; Sancler-Silva, Y.F.R., Papa, P.; Guasti, P.N.; Resende, H.L; Papa, F.O.; Dell' Aqua Jr. J.A.; Alvarenga, M.A. Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. **Journal of Equine Veterinary Science**, 34(1): 58-60, 2014.
- Rufino, M.S.M.; Pérez-Jiménez, J.; Arranz, S.; Alves, R.E. Brito, E.S.; Oliveira, M.S.P.; Saura-Calixto, F. Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, 44(7): 2100-2106, 2011.

- Sapanidou, V.; Taitzoglou, I.; Tsakmakidis, I.; Ourtzelis, I.; Fletouris, D.; Theodoridis, A.; Tsantarliotou, M. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. **Theriogenology**, 84(8): 1273-1282, 2015.
- Sariözkan, S.; Bucak, M.N.; Tuncer, P.B.; Ulutaş, P.A.; Bilgen, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, 58(2): 134-138, 2009.
- Schauss, A.G.; Wu, X.; Prior, R.L.; Ou, B.; Huang, D.; Owens, J.; Shanbrom, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(22): 8604-8610, 2006a.
- Schauss, A.G.; Wu, X.; Prior, R.L.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J.P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(22): 8598-8603, 2006b.
- Shah, N.; Singh, V.; Yadav, H.P.; Verma, M.; Chauhan, D.S.; Saxena, A.; Swain, D.K. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 182: 111-122, 2017.
- Sobeh, M.; Hassan, S.A.; El Raey, M.A.; Khalil, W.A.; Hassan, M.A.; Wink, M. Polyphenolics from *Albizia harveyi* Exhibit Antioxidant Activities and Counteract Oxidative Damage and Ultra-Structural Changes of Cryopreserved Bull Semen. **Molecules**, 22(11): 1993, 2017.
- Sousa, G.G.T.; Magalhães, N.A.; Gomes, L.A.; Correia, H.S.; Sousa Júnior, S.C.; Santos, K.R.; Guimarães, J.E.C. Monta natural versus inseminação artificial em bovinos. **PUBVET**, 6(35): Art-1472, 2012.
- Souza W.L.; Moraes, E.A.; Toniolli R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37: 471-478, 2017.

- Spada, P.D.; Dani, C.; Bortolini, G.V.; Funchal, C.; Henriques, J.A.; Salvador, M. Frozenfruitpulpof *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. **Journal of Medicinal Food**, 12(5): 1084-1088, 2009.
- Spada, P.D.; De Souza, G.G.N.; Bortolini, G.V.; Henriques, J.A.; Salvador, M.L. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medicinal Food**, 11(1): 144-151, 2008.
- Sun, X.; Seeberger, J.; Alberico, T.; Wang, C.; Wheeler, C.T.; Schauss, A.G.; Zou, S. Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. **Experimental Gerontology**, 45(3): 243-251, 2010.
- Takahashi, T.; Itoh, R.; Nishinomiya, H.; Katoh, M.; Manabe, N. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, 47(1): 92-97, 2012.
- Tuncer, P.B.; Bucak, M.N.; Büyükleblebici, S.; Sariözkan, S.; Yeni, D.; Eken, A.; Gündoğan, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, 61(3): 303-307, 2010.
- Vaccari, N.F.S.; Soccol, M.C.H.; Ide, G.M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 8(1): 71-83, 2009.
- Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 30(5): 1323-1338, 2007.
- Vishwanath, R.; Shannon, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, 62(1-3): 23-53, 2000.

- Volp, A.C.; Renhe, I.R.; Barra, K.; Stringueta, P.C. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, 23(2): 141-149, 2008.
- Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60: 481-492, 2000.
- Yeste, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, 85(1): 47-64, 2016.
- Yeste, M.; Estrada, E.; Casas, I.; Bonet, S.; Rodriguez-Gil, J.E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**, 79(6): 929-939, 2013.
- Yuyama, L.K.O.; Aguiar, J.P.L.; Silva Filho, D.F.; Yuyama, K.; Varejão, M.D.J.; Fávoro, D.I.T.; Caruso, M.S.F. Caracterização físico-química do suco de açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazônica**, 41(4): 545-552, 2011.

A adição de extrato de açaí ao diluente de criopreservação melhora a qualidade do sêmen de touros com baixa capacidade de congelação espermática?¹

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da incorporação do extrato de açaí ao diluente de criopreservação do sêmen sobre a morfologia, cinética e integridade da membrana plasmática das células espermáticas. Os ejaculados, obtidos de cinco touros com sêmen de baixa capacidade de congelação, foram fracionados e distribuídos conforme o grupo experimental. O Controle não recebeu o extrato de açaí e, nos demais, adicionou-se ao diluente, 5, 10, 15 ou 20 mg/mL do extrato de açaí. A morfologia espermática foi avaliada com a solução de formol-salina-tamponada. A integridade da membrana plasmática foi avaliada pelos testes epifluorescência e hiposmótico e a cinética celular pela análise computadorizada do movimento espermático. As alterações espermáticas apresentaram efeito linear decrescente ($P < 0,05$) com a adição de diferentes concentrações do extrato de açaí. Não foi observada nenhuma influência ($P > 0,05$) das diferentes concentrações do extrato de açaí sobre a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides avaliada pelo teste hiposmótico. A integridade da membrana plasmática avaliada por epifluorescência, foi superior ($P < 0,05$) após a adição do extrato de açaí ao diluente de criopreservação. Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) da adição de extrato de açaí sobre a cinética dos espermatozoides. Pode-se concluir que a adição do extrato de açaí ao diluente de congelação garante melhor preservação da integridade estrutural da membrana plasmática de espermatozoides no sêmen com baixa tolerância ao processo de criopreservação.

Palavras-chave: Bovinos, congelação, *Euterpe oleracea Martius*, membrana

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of the incorporation of açai extract into semen cryopreservation diluent on the morphology, kinetics and integrity of the plasma membrane of sperm cells. The ejaculates, obtained from five bulls with semen of low freezing performance, were fractionated and distributed according to the experimental group. The control ejaculate did not receive açai extract, and for the others, 5, 10, 15 or 20 mg/mL of açai extract was added to the diluent. Sperm morphology was evaluated with formalin-saline-buffered solution. The integrity of the plasma membrane was evaluated by the hyposmotic and epifluorescent tests and the cellular kinetics by the computerized analysis of the spermatic movement. Sperm alterations presented a linear decreasing effect ($P < 0.05$) with the addition of different concentrations of açai extract. No influence ($P > 0.05$) of the different concentrations of açai extract on the functional integrity of the sperm plasma membrane evaluated by the hyposmotic test was observed. The integrity of the plasma membrane evaluated by epifluorescence was higher ($P < 0.05$) after the addition of açai extract to the cryopreservation diluent. There was no significant effect ($P > 0.05$) of the addition of açai extract on the kinetics of spermatozoa. It can be concluded that the addition of açai extract to the freezing diluent guarantees better preservation of the structural integrity of the sperm plasma membrane in the semen with low tolerance to the cryopreservation process.

Keywords: bovine, freezing, *Euterpe oleracea Martius*, plasma membrane

Introdução

A criopreservação do sêmen possui grande importância para a produção animal por permitir o aproveitamento e a rápida difusão do material genético de animais com elevado mérito genético (Moore e Hasler, 2017). Entretanto, durante o processo de criopreservação do sêmen, as células espermáticas são submetidas a situações de estresse que comprometem a integridade da membrana plasmática e a viabilidade espermática, reduzindo a motilidade e a atividade mitocondrial dessas células (Hu et al., 2010), especialmente no sêmen de reprodutores classificados como sendo de baixa capacidade de criopreservação.

A redução da viabilidade espermática durante a criopreservação está relacionada com a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs) que geram o estresse oxidativo (Büyükleblebici et al., 2014). Esse estresse oxidativo compromete a capacidade fecundante em decorrência dos danos causados ao DNA dos espermatozoides, e também pela peroxidação lipídica (Cocchia et al., 2011).

Para inibir ou minimizar a geração de EROs é necessário adicionar aos meios diluidores de sêmen, substâncias com ação antioxidante (Souza et al., 2017), preferencialmente de origem natural. A origem dessas substâncias é importante porque a indústria animal moderna deve atender as exigências de um mercado cada vez mais preocupado com a segurança sanitária dos produtos (Basto et al., 2016). Considerando esses aspectos, existe uma variedade de compostos derivados de plantas e frutos que podem ser adicionados aos meios diluidores por apresentarem potencial antioxidante (Sobeh et al., 2017; Bucak et al., 2015; Saponidou et al., 2015).

O açáí (*Euterpe oleracea Martius*) possui capacidade antioxidante atribuída à sua fração polifenólica, rica em antocianinas, as quais atuam sobre o radical difenilpicrilhidrazil (DPPH), bem como nos radicais superóxido e hidroxila (Hogan et al., 2010; Rufino et al., 2011; Lima Yamaguchi et al. 2015). Além disso, esse fruto é constituído por açúcares, glicose e frutose,

bem como por ácidos, ferúlico, gálico, linoleico, linolênico e palmítico (Schauss et al., 2006; Rufino et al., 2011; Yuyama et al., 2011). É também constituído por resveratrol, quercetina e tocoferóis (Costa et al., 2010; Lima Yamaguchi et al., 2015).

Todavia, até o presente momento não existem informações sobre o uso do extrato de açaí como fonte natural de antioxidantes para congelação de sêmen de touros que apresentem baixa resistência ao processo de criopreservação das células espermáticas. Por esse motivo, objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do extrato de açaí ao diluente de congelação do sêmen de bovinos com sêmen de baixa congelabilidade sobre a cinética, morfologia e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Parauapebas-PA que apresenta, como coordenadas geográficas, latitude 06°04'16,4"S e longitude 049°49'8,3".

Os animais foram inicialmente submetidos a exame andrológico, sendo considerados os parâmetros de normalidade sugeridos por Henry et al. (2013). As amostras de sêmen, obtidas com eletroejaculador (Autojac[®], Neovet, Uberaba/MG -BR), foram avaliadas em microscópio óptico (CX21, Olympus - Japão) contendo platina aquecedora e a concentração espermática foi determinada utilizando a câmara de Neubauer.

A inclusão dos reprodutores nessa pesquisa foi efetuada após o teste de congelação, sendo selecionados apenas aqueles que o sêmen apresentava, após descongelação, motilidade progressiva e total inferiores, respectivamente, a 30% e 50%, conforme proposição de Crespilho et al. (2012) e Henry et al. (2013).

Utilizou-se cinco reprodutores da raça Senepol (*Bos taurus taurus*), com idade entre 24 e 30 meses e peso médio de 600 ± 12,74 kg. Esses animais, foram adaptados às condições do

experimento durante 15 dias, antes do início da pesquisa. Tanto na fase de adaptação quanto de execução do experimento, os reprodutores foram mantidos em piquetes formados por capim Braquiária (*Brachiaria brizanta*), com acesso à água e a suplementação mineral *ad libitum*.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, considerando o touro como bloco, em que todos os tratamentos foram repetidos em todos touros o mesmo número de vezes. No período experimental, cada reprodutor foi submetido a cinco coletas de sêmen, totalizando 25 repetições por tratamento.

O sêmen foi avaliado conforme sugerido por Henry et al. (2013). Para a criopreservação do sêmen, cada ejaculado foi fracionado em 5 alíquotas, as quais foram distribuídas no diluente Triladyl® (Minitub, Tiefenbach - DE), de acordo com o grupo experimental.

A obtenção do extrato ocorreu a partir da diluição do açaí liofilizado em água destilada de acordo com cada grupo experimental. Após a primeira centrifugação, que ocorreu a 1.790 g durante dez minutos, o sobrenadante foi depositado em tubo graduado de 15 mL para em seguida ser realizada mais uma centrifugação por 20 minutos a 1.790 g. Posteriormente, o sobrenadante foi submetido a dupla filtragem em papel filtro qualitativo.

As amostras do sêmen foram envasadas em palhetas de 0,25 mL (Minitub, Tiefenbach - DE) na concentração final de 24×10^6 espermatozoides/dose. A criopreservação foi realizada em equipamento de congelação TK 3000 Compacta SE® (TK Equipamentos para Reprodução, Uberaba/MG - BR) seguindo-se a curva padrão preconizada pelo fabricante e validada em estudos anteriores Abud et al. (2014).

As amostras de sêmen permaneceram congeladas por um período mínimo de 30 dias antes das avaliações efetuadas após a descongelação. Para avaliar o efeito da adição do extrato de açaí ao diluente de congelação, as amostras de sêmen foram descongeladas em banho maria a 37 °C por 30 segundos e depositadas em microtubos plásticos de 1,5 mL (Eppendorf®, São Paulo/SP-BR) pré-aquecidos a 37°C, temperatura mantida até a realização das análises.

A morfologia espermática foi avaliada utilizando-se 1 mL de solução formol-salina-tamponada pré-aquecida à 37 °C e 20 µL de sêmen. Nesta avaliação foi empregada a técnica de câmara úmida, contabilizando-se 200 células para identificação de alterações morfológicas. As porcentagens de diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas de acordo com Henry et al. (2013).

A integridade funcional e estrutural da membrana plasmática foi avaliada pelos testes hiposmótico e epifluorescência. O teste hiposmótico foi realizado de acordo com Martins et al. (2011). Utilizou-se a solução de frutose com 100 mOsm e adicionou-se 20 µL de sêmen em 1,0 mL dessa solução. As amostras foram incubadas em banho-maria à 37°C durante 60 minutos e posteriormente adicionou-se 500 µL de formol. Após a incubação, realizou-se a contagem de 100 células, sendo considerados reativos ao teste, aqueles espermatozoides que dobraram ou enrolaram a cauda.

A avaliação da integridade da membrana plasmática também foi realizada pela associação de sondas fluorescentes diacetato de 6- carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) (Sigma-aldrich®, SP - BR), conforme proposto por Harrison e Vickers (1990). Após 10 minutos de incubação a 37 °C, as amostras foram avaliadas sob lâmina e lamínula em microscopia de epifluorescência (ISAS V1.3, Proiser, Valência - ES) por meio da utilização de filtro fluorescente com excitação de 540-580 nm e emissão de 600-660 nm. Foram avaliados 200 espermatozoides em cada amostra, sendo classificados de acordo com o padrão de fluorescência emitido. Quando o espermatozoide apresentou coloração verde, a membrana plasmática foi classificada como íntegra e ao evidenciar coloração avermelhada foi classificada como lesada.

A cinética espermática foi avaliada pela técnica de análise computadorizada do movimento espermático (CASA, ISAS V1.3, Proiser, Valência, Espanha). As amostras foram homogeneizadas e alíquotas de 5 µL de sêmen foram depositadas em câmara de Spermtrack® (Proiser, Valência, Espanha) com altura de 20 µm, pré-aquecida a 37°C. Foram avaliados cinco

campos aleatórios contendo o número mínimo de 300 espermatozoides/campo. Os parâmetros considerados foram a motilidade espermática progressiva (%) e total (%), linearidade (%), velocidade média da trajetória ($\mu\text{m/s}$) e velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$).

O delineamento experimental foi executado em blocos casualizados, considerando-se cada reprodutor como bloco. Os resultados gerados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de regressão, avaliando os modelos linear e quadrático por intermédio do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). O valor de P foi considerado significativo quando $<0,05$. O modelo estatístico adotado foi:

$Y_{ij} = \mu + A_i + T_j + \varepsilon_{ij}$ em que: Y_{ij} é a variável mensurada; μ é a constante geral; A_i é o efeito aleatório do bloco (animal) i ; T_j é o efeito do tratamento j e ε_{ij} é o erro experimental.

Resultados

O total de defeitos espermáticos apresentaram efeito linear decrescente ($P<0,05$) pela adição de diferentes concentrações de extrato de açaí ao diluente utilizado na criopreservação do sêmen (Tabela 1).

Não foi observado, nenhuma influência ($P>0,05$) das diferentes concentrações do extrato de açaí sobre a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides após a descongelação. Entretanto, quando avaliada por epifluorescência, a integridade da membrana foi superior ($P<0,05$) após a adição do extrato de açaí ao diluente de criopreservação (Tabela 1).

Os parâmetros motilidade total e progressiva, velocidade da trajetória, velocidade retilínea e linearidade não foram influenciados ($P>0,05$) pela incorporação de diferentes concentrações de extrato de açaí ao diluente utilizado na criopreservação do sêmen de bovinos (Tabela 2).

Discussão

As diferenças de sensibilidade à congelação das células espermáticas entre os indivíduos é um fator limitante no processo de criopreservação em decorrência dos diferentes ejaculados não apresentarem a mesma resistência para suportar procedimentos de congelação-descongelação (Yest, 2016). Por essa razão, foi inicialmente hipotetizado que a adição do extrato do açaí ao diluente de congelação poderia minimizar os danos da criopreservação aos espermatozoides do sêmen de bovinos com baixa tolerância ao processo. O resultado aqui obtido corroborou essa hipótese ao se constatar que a integridade da membrana plasmática foi protegida de forma mais efetiva. Diante desse resultado é possível sugerir a utilização do extrato de açaí no diluente do sêmen de animais com mérito genético diferenciado que apresentem espermatozoides com baixa tolerância à criopreservação.

A maior preservação da integridade da membrana pode ser atribuída a presença de ácidos graxos, linoleico e linolênico contidos no extrato de açaí, fato que pode ter contribuído para aumentar a quantidade desses ácidos na membrana dos espermatozoides e na preservação de sua integridade (Nasiri et al., 2012; Lima Yamaguchi et al., 2015). A maior integridade da membrana plasmática com a utilização de extrato de açaí também pode ser associada a presença de substâncias com potencial antioxidante, como as antocianinas, resveratrol, quercetina e vitamina E (Rufino et al., 2011).

A proteção antioxidante conferida pelas antocianinas está diretamente relacionada com a quantidade de grupamentos hidroxilas presentes em sua estrutura química. Esse fato permite a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio para os radicais livres que são responsáveis por promover maior estabilização (Volp et al., 2008). As principais antocianinas presentes no açaí correspondem à cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo que podem atuar contra o peróxido nítrico e evitar danos a membrana plasmática (Wycoff et al., 2015; Peixoto et al., 2016) por prevenir a interação deletéria das espécies reativas ao oxigênio com os componentes estruturais dos espermatozoides. Esse fato pode justificar a maior integridade da membrana

plasmática dos espermatozoides criopreservados com o diluente acrescido do extrato de açaí, uma vez que a quantidade de antocianina presente no extrato de açaí utilizado na pesquisa foi de 0,0177; 0,0354; 0,0531 e 0,0708 mg/mL, para os grupos experimentais com 5, 10, 15 e 20 mg de extrato de açaí, respectivamente.

A maior preservação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides pode ser também justificada pela presença de resveratrol no extrato de açaí. Esse polifenol atua eliminando radicais livres (superóxido, radical hidroxila) e contra a peroxidação lipídica (Bucak et al., 2015; Longobardi et al., 2017), o que pode ter garantido maior proteção da membrana plasmática dos espermatozoides, pois o extrato de açaí utilizado disponibilizou 0,165, 0,33, 0,49 e 0,66 mg/mL de polifenóis aos espermatozoides dos grupos experimentais com 5, 10, 15 e 20 mg/mL de extrato, respectivamente, quando comparado ao controle.

Além disso, a maior integridade pode ter sido conferida pela presença de quercetina, antioxidante capaz de reagir com radicais livres, atuar como quelante de íons metálicos e interromper a peroxidação lipídica. Essa proteção está relacionada ao caráter lipofílico desses flavonoides que são capazes de interagir com a bicamada lipídica da membrana plasmática. Com isso, permite a doação direta de H⁺ e elétrons aos radicais livres, promove a estabilização desses radicais e impede a continuidade da reação em cadeia (Barreiros et al., 2006; Rufino et al., 2011), resultando em maior integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.

A adição do extrato de açaí também proporcionou redução significativa dos defeitos morfológicos totais dos espermatozoides após a descongelação. Esse resultado pode ter sido reflexo da maior ação antioxidante conferida pelo extrato de açaí durante a criopreservação que protegeu a membrana plasmática dos espermatozoides. Resultado semelhante foi verificado por Sobeh et al. (2017), quando adicionaram extrato de *Albizia* (*Albizia harveyi*) no diluidor de criopreservação do sêmen de bovinos. A redução na porcentagem de defeitos morfológicos

pode ser atribuída a presença de antioxidantes, como a quercetina, ácido ferúlico e gálico, presentes no açáí.

Os resultados permitem concluir que a adição do extrato de açáí ao diluente de congelamento aumenta a preservação da integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides no sêmen de bovinos com baixa tolerância ao processo de criopreservação.

Comitê de Ética

Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UFRA sob o protocolo número 006/2017.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

Referências

- Abud, C. O. G., Abud, L. J., Neto, J. D. O. C., Dode, M. A. N., Sereno, J. R. B., & Martins, C. F. (2014). Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. *Ciência Animal Brasileira*, 15(1), 32-37. *doi:10.5216/cab.v15i1.12233*
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. L. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29(1), 113-123.
- Basto, S. R. L., Ferreira-Silva, J. C., Silva, F. L. A., Aleixo, G. A. S., Stamford, T. C. M., Silva, M. V., & Correia, M. T. S. (2016). Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada de fármacos no tratamento veterinário. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 10(1-4), 25-33.
- Bucak, M. N., Ataman, M. B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., & Akal, E. (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47(5), 545-552. *doi:10.1111/and.12301*

- Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Endirlik, B. Ü. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, 150(3-4), 77-83. *doi:10.1016/j.anireprosci.2014.09.006*
- Cocchia, N., Pasolini, M. P., Mancini, R., Petrazzuolo, O., Cristofaro, I., Rosapane, I. Sica, A., Tortora, G., Lorizio, R., Paraggio, G., & Mancini, A. (2011). Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75(7), 1201-1210. *doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.031*
- Costa, P. A., Ballus, C. A., Teixeira-Filho, J., & Godoy, H. T. (2010). Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, 43(6), 1603-1606. *doi:10.1016/j.foodres.2010.04.025*
- Crespilho, A. M., Sá Filho, M. F., Dell'Aqua Jr, J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Martins, A., & Papa, F. O. (2012). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*, 149(1-2), 1-6. *doi:10.1016/j.livsci.2012.05.011*
- Harrison, R. A. P., & Vickers, S. E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(1), 343-352.
- Henry, M., Neves J. P., & Jobim, M. I. M. (2013). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal/Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*. (3rd ed.). Belo Horizonte, MG. 104 p.

- Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y., Dai, Y., & Zhou, K. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, 118(2), 208-214. *doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.099*
- Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., & Jia, Y. H. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. *Animal reproduction science*, 117(1-2), 11-17. *doi:10.1016/j.anireprosci.2009.04.001*
- Lima Yamaguchi, K. K., Pereira, L. F. R., Lamarão, C. V., Lima, E. S., & da Veiga-Junior, V. F. (2015). Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food chemistry*, 179, 137-151. *doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.055*
- Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., De Canditiis, C., Cammarano, A., De Luise, L., & Gasparri, B. (2017). Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*, 88, 1-8. *doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.046*
- Martins, C. F., Dode, M. A. N., Silva, A. E. D. F. (2016). Avaliação espermática laboratorial. In: *Atlas de morfologia espermática bovina*. Brasília: Embrapa. p. 19-32.
- Martins, L. F., Pinho, R. O., Paraizo, R. M., Oliveira, R. R., Castilho, E. F., & Guimarães, J. D. (2011). Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(7), 1519-1525.
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-year review: reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science*, 100(12), 10314-10331. *doi:10.3168/jds.2017-13138*
- Nasiri, A. H., Towhidi, A., & Zeinoaldini, S. (2012). Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics

and fatty acid composition. *Andrologia*, 44, 550-555. doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01225.x

Peixoto, H., Roxo, M., Krstin, S., Röhrig, T., Richling, E., & Wink, M. (2016). An anthocyanin-rich extract of acai (*Euterpe precatoria* Mart.) increases stress resistance and retards aging-related markers in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(6), 1283-1290. doi:10.1021/acs.jafc.5b05812

Rufino, M. S. M., Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R. E., Brito, E. S., Oliveira, M. S. P., & Saura-Calixto, F. (2011). Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, 44(7), 2100-2106. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.011

Sapanidou, V., Taitzoglou, I., Tsakmakidis, I., Kourtzelis, I., Fletouris, D., Theodoridis, A., Zervos, I., & Tsantarliotou, M. (2015). Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 84(8), 1273-1282. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.005

Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Huang, D., Owens, J., ... & Shanbrom, E. (2006). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart.(acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8604-8610. doi:10.1021/jf0609779

Sobeh, M., Hassan, S. A., El Raey, M. A., Khalil, W. A., Hassan, M. A., & Wink, M. (2017). Polyphenolics from *Albizia harveyi* exhibit antioxidant activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved bull semen. *Molecules*, 22(11), 1993. doi:10.3390/molecules22111993

Souza, W. L., Moraes, E. A., & Toniolli, R. (2018). Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(5), 471-478. doi:10.1590/s0100-736x2017000500008

- VOLP, A. C., Renhe, I. R., Barra, K., & Stringueta, P. C. (2008). Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista brasileira de nutrição clínica*, 23(2), 141-149.
- Wycoff, W., Luo, R., Schauss, A. G., Neal-Kababick, J., Sabaa-Srur, A. U., Maia, J. G. S., ... & Smith, R. E. (2015). Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 181-187.
doi:10.1016/j.jfca.2015.01.021
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47-64.*doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.047*
- Yuyama, L. K. O., Aguiar, J. P. L., Silva Filho, D. F., Yuyama, K., Varejão, M. D. J., Fávoro, D. I. T., ... & Caruso, M. S. F. (2011). Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. *Acta Amazonica*, 41(4), 545-552.

Material suplementar

Tabela 1. Morfologia espermática (total de defeitos) e integridade da membrana plasmática (teste hiposmótico e epifluorescência) de espermatozoides criopreservados com extrato de açaí

Parâmetro (%)	Extrato de açaí (mg/mL)					Valor-p ^a	
	0	5	10	15	20	L	Q
Total dedefeitos ^b	15,44±0,79	14,5±0,79	13,67±0,81	13,47±0,81	11,8±0,83	0,001	0,800
Teste Hiposmótico	42,88±1,97	44,42±2,04	45,48±1,86	46,78±1,96	45,4±2,01	0,239	0,744
Epifluorescência ^c	34,52±1,45	36,00±1,45	42,04±1,45	39,17±1,38	39,63±1,50	0,005	0,282

^aContraste linear (L) e quadrático (Q)

^by = 15,713 – 0,172x (r² = 0,33)

^cy = 36,962 + 0,270x (r² = 0,05)

Tabela 2. Cinética dos espermatozoides criopreservados com extrato de açaí

Parâmetro (%)	Extrato de açaí (mg/mL)					Valor-p ^a	
	0	5	10	15	20	L	Q
MT (%)	20,3±1,43	21,39±1,45	21,7±1,42	20,42±1,52	21,56±1,53	0,609	0,44
MP (%)	2,83±0,52	4,23±0,49	4,34±0,52	3,59±0,47	3,82±0,50	0,839	0,893
VR (µm/s)	13,53±0,78	16,68±0,76	16,1±0,78	14,6±0,78	16,16±0,78	0,200	0,414
VT (µm/s)	26,55±0,85	29,77±0,84	28,38±0,85	27,28±0,84	29,53±0,87	0,202	0,609
LIN (%)	27,79±0,89	30,41±0,89	28,3±0,92	28,78±0,90	30,87±0,94	0,120	0,414

^aContraste linear (L) e quadrático (Q)

MT = Motilidade Total; MP = Motilidade Progressiva; VR = Velocidade Retilínea; VT = Velocidade do Trajeto; LIN = Linearidade.