



Potencial antioxidante dos ésteres de pequi (*Caryocar coriaceum*) na criopreservação de sêmen bovino e na fertilização *in vitro*

Antioxidant potential of pequi esters (*Caryocar coriaceum*) in bovine semen cryopreservation and *in vitro* fertilization

Micherlene da Silva Carneiro Lustosa¹, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco^{*2}, Raniel Lustosa de Moura¹, Marlon de Araújo Castelo Branco³, Isolda Márcia Rocha do Nascimento⁴, Jefferson Hallison Lustosa da Silva⁵, Geraldo Magela Cortes Carvalho⁶, Talita Soares Câmara⁷, Samara Dias Cardoso Rodrigues⁸, Bruna Farias Brito⁹, Francisco Cardoso Figueiredo⁴, José Adalmir Torres de Souza¹⁰

1 Instituto de Ensino Superior Múltiplo (IESM), Timon, Maranhão, Brasil.

2 Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Chapadinha, Maranhão, Brasil. [ROR](#)

3 Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Teresina, Piauí, Brasil.

4 Colégio Técnico de Teresina (CTT/UFPI), Teresina, Piauí, Brasil.

5 Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR), Teresina, Piauí, Brasil.

6 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA MEIO-NORTE), Teresina, Piauí, Brasil. [ROR](#)

7 Empresa Farmina Nordeste, Fortaleza, Ceará, Brasil.

8 Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas, Tocantins, Brasil. [ROR](#)

9 Centro Universitário Fametro, Fortaleza, Ceará, Brasil.

10 Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil. [ROR](#)

*Autor correspondente: yndyranayan1@hotmail.com

Recebido: 06 de agosto, 2024. Aceito: 11 de outubro, 2024. Publicado: 07 de fevereiro, 2025. Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: A criopreservação de sêmen bovino é um procedimento fundamental na reprodução animal, mas está associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos significativos aos espermatozoides. Esses danos estão relacionados à infertilidade e à diminuição da qualidade espermática. Nesse contexto, a utilização de diluidores seminais enriquecidos com antioxidantes representa uma estratégia promissora para minimizar ou até reverter esses efeitos deletérios. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ésteres de pequi (*Caryocar coriaceum*) como suplementação ao diluente de criopreservação de sêmen bovino. Foram coletados 42 ejaculados de seis touros, submetidos ao exame andrológico e considerados aptos. As amostras foram analisadas, diluídas em Tris-gema, suplementadas com ésteres de pequi (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mL/L), envasadas e criopreservadas. Os parâmetros espermáticos avaliados no sêmen pós-descongelamento incluíram o teste de termorresistência fisiológica (TTR), a funcionalidade da membrana plasmática (HOST), as taxas de clivagem e blastocisto, bem como a quantificação de glutatona reduzida e de malondialdeído (MDA). Os resultados mostraram que as concentrações de 1,0 e 1,5 mL/L de ésteres de pequi reduziram significativamente a concentração de malondialdeído no sêmen criopreservado. No entanto, não foram observados efeitos significativos dos ésteres de pequi nos parâmetros de motilidade, funcionalidade espermática, taxas de clivagem e blastocisto, ou



na quantificação da glutatona reduzida. Conclui-se que a suplementação com os ésteres de pequi (1,0 e 1,5 mL/L) na criopreservação de sêmen bovino pode ser benéfica para minimizar os efeitos da peroxidação lipídica dos espermatozoides, uma vez que houve redução na concentração de malondialdeído pós-descongelamento.

Palavras-chave: Currealeiro Pé Duro; espécies reativas de oxigênio; malondialdeído.

Abstract: Bovine semen cryopreservation is a fundamental procedure in animal reproduction. However, it is associated with the production of reactive oxygen species (ROS), which can cause significant damage to spermatozoa, leading to infertility and reduced sperm quality. In this context, using seminal diluents enriched with antioxidants presents a promising strategy for minimizing or even reversing these harmful effects. This study aimed to evaluate the effects of different concentrations of pequi (*Caryocar coriaceum*) esters as a supplement to bovine semen cryopreservation diluents. Forty-two ejaculates were collected from six bulls that had undergone an andrological examination and were deemed suitable. The samples were analyzed, diluted in Tris-egg yolk medium, supplemented with pequi esters (0.0, 0.5, 1.0, and 1.5 mL/L), packaged, and cryopreserved. The sperm parameters evaluated in the post-thaw semen included the thermoresistance, plasma membrane functionality, cleavage and blastocyst rates, and quantification of reduced glutathione and malondialdehyde. The results showed that the concentrations of 1.0 and 1.5 mL/L of pequi esters significantly reduced malondialdehyde levels in cryopreserved semen. However, no significant effects of pequi esters were observed on motility parameters, sperm functionality, cleavage and blastocyst rates, or on the quantification of reduced glutathione. Supplementation with pequi ester (1.0 and 1.5 mL/L) in the cryopreservation of bovine semen may be beneficial in minimizing lipid peroxidation effects, as evidenced by the reduction in malondialdehyde concentration after thawing.

1. Introdução

A criopreservação de sêmen bovino é um processo que, embora essencial para a reprodução assistida, gera um estresse oxidativo significativo, resultando em desequilíbrio entre a produção de espécies oxidativas e as defesas celulares antioxidativas. Esse estresse pode comprometer a fisiologia espermática, levando a casos de infertilidade ou subfertilidade em touros ⁽¹⁾. Radicais livres, presentes sob condições fisiológicas, desempenham papéis cruciais em diversas etapas da reprodução, como espermatogênese e fecundação ⁽²⁾. Assim, para mitigar os danos causados pela criopreservação, a suplementação com antioxidantes no diluidor seminal é uma estratégia promissora, visando preservar a qualidade do sêmen e a capacidade reprodutiva dos espermatozoides ^(1,3,4).

Neste contexto, o óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) surge como um potencial antioxidante, devido à sua composição rica em ácidos graxos insaturados e a presença de compostos como o ácido gálico, conhecido por sua capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio ^(5,6). Estudos anteriores indicam que o óleo de pequi é eficaz na redução de lesões oxidativas em células, bem como na proteção contra a peroxidação lipídica e danos ao DNA ⁽⁷⁾. Considerando essas propriedades, o presente estudo tem como objetivo avaliar os ésteres de pequi como antioxidante na criopreservação de sêmen bovino, analisando sua influência em

parâmetros cruciais de qualidade espermática, como teste de termorresistência fisiológica (TTR), funcionalidade da membrana plasmática (HOST), taxas de clivagem e formação de blastocistos, além da quantificação de glutatona reduzida e malondialdeído.

Assim, ao investigar a aplicação dos ésteres de pequi na criopreservação espermática, o estudo não apenas busca preencher uma lacuna na literatura científica, mas também propõe uma alternativa viável para a melhoria da eficiência reprodutiva em touros, evidenciando a intersecção entre a biotecnologia reprodutiva e a utilização de recursos naturais com propriedades antioxidantes.

2. Material e métodos

Todos os procedimentos realizados com os animais estavam de acordo com a legislação europeia para experimentação animal (Diretiva 2010/63/UE) e com a legislação brasileira sobre pesquisa animal (Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008). O procedimento descrito no presente artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EMBRAPA MEIO-NORTE, sob Protocolo N° 001/2016.

O óleo de pequi foi obtido na usina escola governador Alberto Silva da Universidade Federal do Piauí, por reação de transesterificação. Para o processo foi utilizado 10 g de óleo de pequi refinado, 2 g de metanol e 0,05 g de NaOH. A mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente por um período de 30 min. A ocorrência da reação foi monitorada através da mudança de cor da mistura reacional, de acordo com o método Soxhlet descrito pela AOCS Bc 3-49⁽⁸⁾, expresso em porcentagem. Esta mistura foi transferida para um funil de separação de 250 mL, para separação dos ésteres (fase superior) da glicerina (fase inferior). A fase superior foi lavada com várias porções de 50 mL de água destilada para retirada das impurezas e posteriormente aquecida à 110 °C para secagem dos ésteres (biodiesel).

Os constituintes voláteis foram analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). O equipamento trace GC Ultra da Thermo Scientific com detector de ionização por chama (DIC) modelo ISQ, marca Thermo Scientific SHIMADZU GC-17A acoplado a um espectrômetro de massas QP5050A ISQ Thermo Scientific equipado com uma coluna capilar HP- 5MS da AgilentDB-5 HT.

O diluente Tris-gema de ovo composto por 3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido cítrico, 1,488 g de frutose, 25 mg de gentamicina, 50.000 UI de penicilina, 100 mL de água destilada, 20 % de gema de ovo e 5 % de glicerol, com osmolalidade ~350 mOsm e pH 6,8, foi preparado no Laboratório de biotecnologia da Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí, e utilizado para diluir e congelar o sêmen. Foram preparados quatro diluentes experimentais diferentes: (0; 0,5; 1,0 e 1,5 ml/L de ésteres de pequi (EP) adicionado ao diluente Tris-Gema).

Foram utilizados seis touros da raça Curraleiro Pé-Duro provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Meio Norte, localizada na cidade de Campo Maior, Piauí, Brasil (04°49'40" latitude Sul e à 42°10'07" longitude Oeste), com idade média de 5 anos, peso entre 310 e 365 kg e escore de condição corporal de 3 a 4 (escala de 1 a 5).

Os touros tinham histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto à saúde geral, integridade dos órgãos reprodutivos e qualidade do sêmen. Durante o experimento, os touros foram mantidos em sistema extensivo, com livre acesso a piquetes de *Panicum maximum*, água e sal mineral.

Amostras de sêmen foram coletadas uma vez por semana durante sete semanas, totalizando 42 ejaculados, via eletroejaculação (Biocon®, Uberaba, Minas Gerais, Brasil) utilizando-se tubo de ensaio graduado estéril de 15 mL, devidamente protegido com folha de papel alumínio para evitar a exposição do sêmen à luz. Os ejaculados foram transportados em caixa isolada a 37 °C até o laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental da EMBRAPA, Campo Maior, para avaliação. Imediatamente após chegar ao laboratório, as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho-maria a 37 °C e avaliadas separadamente quanto à cor, aparência, volume, motilidade total e vigor, sob microscópio de contraste de fase (Olympus). Ltd., Tóquio, Japão), seguindo recomendações descritas no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal ⁽⁹⁾. A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer na diluição 1:200 em solução de citrato de sódio em formaldeído a 4 %. O método de câmara úmida foi utilizado para analisar a morfologia espermática seguindo recomendações descritas no Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal ⁽⁹⁾. Somente ejaculados com motilidade total ≥ 80 %; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e patologias espermáticas ≤ 20 % foram utilizadas no estudo. Quando aprovadas, amostras dos seis ejaculados foram misturadas para formar um *pool* para aumentar o volume de sêmen e eliminar a variabilidade entre as amostras estudadas. Logo após a formação do *pool*, este foi dividido em quatro alíquotas, mantidas a 37 °C em banho-maria antes da diluição nos diluentes experimentais.

Quatro alíquotas de sêmen previamente avaliadas e aprovadas foram diluídas em meio de Tris-gema (37 °C) contendo éster de pequi (0,5; 1,0 e 1,5mL/L), enquanto uma alíquota sem qualquer suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi colocado em palhetas de 0,25 mL, com concentração final de 160×10^6 espermatozoides/mL, e congelado em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, MG, Brasil). A curva foi programada para realizar a refrigeração do sêmen a 0,25 °C/min até 5 °C, temperatura na qual as palhetas foram mantidas por 4 h. Para o congelamento, foi utilizada curva com velocidade -20 °C/min até chegar à temperatura de -120 °C. Imediatamente após, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, organizadas em racks e armazenadas em cilindro criogênico a -196 °C até descongelamento. As análises pós-criopreservação foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, onde as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e avaliadas quanto ao teste de termorresistência fisiológico, funcionalidade da membrana espermática, Produção *in vitro* de embriões – PIV, Quantificação da glutatona reduzida e de malondialdeído.

Para a avaliar a termorresistência espermática, foi utilizado a avaliação fisiológica descrita por ⁽¹⁰⁾. As amostras descongeladas foram incubadas em banho-maria a 37 °C por um período de 3 horas, e avaliadas ao longo do tempo, quanto à motilidade total (MT - %) e

o vigor (1-5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos ⁽¹⁰⁾.

A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada pelo teste hiposmótico (HOST). Para isso, 20 µL de sêmen foram incubados a 37 °C por 60 minutos em uma solução de 150 mOsm/Kg contendo D-frutose (13,5 g/L; Sigma) e citrato de sódio (7,3 g/L; Sigma) ⁽¹¹⁾. Após o período de incubação, as amostras foram fixadas em 0,5 mL de formol salino. Em seguida, 10 µL da solução foi colocada em uma lâmina e coberta por lamínula. Posteriormente, 100 espermatozoides foram classificados de acordo com a presença ou a ausência do dobramento/enrolamento da cauda em microscopia óptica (aumento de 1000x). O cálculo da resposta osmótica foi determinado pela porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico (% HOST) = (% de alterações na região de cauda após teste HOST) - (% de alterações na região de cauda dos espermatozoides antes do teste HOST) ^(12,13).

A avaliação da fertilidade foi realizada pela produção *in vitro* de embriões ⁽¹⁴⁾. Os ovários, foram colhidos de vacas provenientes de abatedouro, e transportados para o laboratório, a temperatura de 35 °C, em recipiente térmico contendo DMPBS – FLUSH (Nutricell®). No laboratório, os ovários foram lavados com DMPBS – FLUSH a 35 °C e os Complexos *Cumulus-Oócitos* (CCOs) recuperados por aspiração de folículos de 2-8 mm, utilizando agulhas descartáveis 21 G, acoplado a uma seringa de 10 mL. O conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 100 x 20 mm para rastreamento em lupa estereomicroscópica. Os Complexos *Cumulus-Oócitos* (CCOs) selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 100 x 20 mm contendo meio de manutenção TQC Holding Plus (Nutricell®), e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV ⁽¹⁵⁾. E somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos.

Os CCOs selecionados, passaram por três banhos em meio de maturação, em placa de Petri 100 x 20 mm. Foram utilizados 10 a 20 oócitos por 100 µL de meio de maturação (GeneUp Biotecnologia), composto por TCM 199 e 10 % de SFB (Soro Fetal Bovino), sob óleo mineral, em placas de Petri 100 x 20mm, incubados à 38,5 °C com atmosfera de 5 % de CO₂ em ar, por um período de 24 horas. Após a maturação, os CCOs foram fecundados em meio de fertilização (Gene Up Biotecnologia®), constituído de PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina), heparina e BSA (Albumina Sérica Bovina), por período de 22 h, em temperatura de 38,5 °C com atmosfera de 5 % de CO₂ em ar.

Para fertilização, foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos amostras correspondentes ao controle e aos tratamentos de 0,5; 1,0 e 1,5mL/L de éster de pequi, e centrifugada em gradiente de Percoll (45 e 90%; GeneUp Biotecnologia) a 8000 rpm, durante 7 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, os espermatozoides ressuspensos em 1 mL de meio de fertilização e centrifugados a 3200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e 5 µL do pellet (60 µL) diluído em 250 µL de solução formol salina, para realização da contagem espermática em câmara de Neubauer, bem como 5 µL do pellet colocado entre lâmina e lamínula para avaliação de motilidade e o vigor. Posteriormente, cada gota foi

co-incubado com espermatozoides dos tratamentos experimentais, à concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Os presumíveis zigotos foram banhados três vezes em meio SOF (Gene Up Biotecnologia®). Posteriormente, foram transferidos para uma placa de Petri 100 x 20 mm, contendo microgotas de 100 μ L de meio SOF composto por SOF, EGF (Fator de Crescimento Epidermal), BSA e SFB, e mantidos em estufa à temperatura de 38,5 °C, em 5 % de CO₂, durante 7 dias. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada após 48 horas do início do cultivo e a formação de blastocisto após 168 horas. Os blastocistos foram avaliados segundo ⁽¹⁶⁾.

A quantificação de malondialdeído (MDA) foi estimada pela medida do nível de MDA, utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no método descrito por ⁽¹⁷⁾. A quantificação de malondialdeído foi medida após a suplementação de 500 μ L de sêmen pós-criopreservado, mais Tampão Tris-ácido cítrico, pH 7,4, adicionado a 1 mL do reagente TBA (15 % de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico e 0,375 % de ácido tiobarbitúrico) e 1 % (v/v) de BHT 50 mM. A mistura foi tratada em água fervente (100 °C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e centrifugadas 1.200 g por 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25). A concentração de MDA foi determinada pela curva de calibração feita diariamente com malondialdeído como padrão, nas concentrações de 1 a 20 μ Mol. O MDA produzido foi expresso em nmol de TBARS/mL de diluidor.

A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) foi baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), conforme algumas modificações da técnica descrita por ⁽¹⁸⁾. Em um tubo foram adicionados 400 μ L das amostras (tampão EDTA pH 5,4), acrescidos de 320 μ L de água destilada e mais 80 μ L de ácido tricloroacético a 50 %. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foram recolhidos 400 μ L do sobrenadante e acrescido de 800 μ L de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 μ L de DTNB 0,01 M; e, após 1 minuto de reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 412 nm. A concentração foi expressa em μ Mol/mL. Para a curva padrão da glutathiona foram feitas soluções de glutathiona a 6,66; 13,33; 26,66; 40; 53,33 e 66 μ Mol.

O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro tratamentos: (controle; 0,5; 1,0 e 1,5 ml/L), seis blocos (animais), sete repetições (coletas). O teste de Termorresistência e avaliação da funcionalidade da membrana espermática pós-descongelção foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de média foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls (SNK), na probabilidade de 5 %. As análises foram executadas através do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013).

A taxa de clivagem e a produção de blastocisto foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado a 5 % de probabilidade de erro. A quantificação da glutathiona reduzida e de malondialdeído foi submetida a Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, EUA, 2012).

3. Resultados

A análise do perfil de ácidos graxos do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*), observado na figura 1 e tabela 1, revelou uma composição predominante de ácidos graxos insaturados, com destaque para o ácido oléico, que representou 46,3% do total. Além disso, o ácido esteárico (29,6%) e o ácido palmítico (21,5%) foram os outros componentes significativos, enquanto os ácidos graxos insaturados, como o palmitoléico (1,2%) e linoléico (1,4%), apresentaram teores muito baixos. A intensidade dos compostos de ácidos graxos do biodiesel de pequi segue na Figura 1 e a concentração dos compostos na Tabela 1.

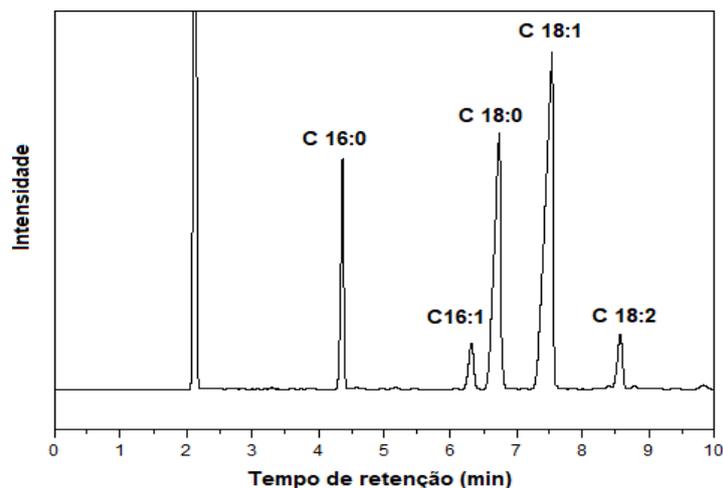


Figura 1. Intensidade de ácidos graxos no biodiesel de pequi.

Tabela 1. Composição em ácidos graxos de biodiesel de pequi

Ácido graxo	Teor % (p/p)
Palmítico (C16:0)	21,5
Palmitoléico (C16:1)	1,2
Esteárico (18:0)	29,6
Oléico (18:1)	46,3
Linoléico (18:2)	1,4

Os resultados obtidos a partir da análise de motilidade espermática em diferentes tempos de incubação e concentrações de ésteres de pequi (*Caryocar coriaceum*) são apresentados na Tabela 2. Observou-se uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na motilidade espermática ao longo do tempo, no entanto, não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos aplicados. No tempo inicial (0 minutos), todos os tratamentos apresentaram valores semelhantes, com o grupo controle e os grupos tratados com éster de pequi mostrando motilidade média entre 23,71% e 29,52%. Ao final do período de incubação de 180 minutos, a motilidade espermática caiu drasticamente, com o controle apresentando apenas 5,95% de motilidade, enquanto os grupos com éster de pequi tenderam a uma leve melhora, especialmente o tratamento com 0,5 mL/L, que atingiu 9,02%.

Tabela 2. Motilidade total pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservado em três concentrações diferentes (0,5; 1,0 e 1,5 mL/L) de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*) avaliados pelo teste de termo resistência (TTR) fisiológico

Tempo (min)	Tratamentos			
	Controle	0,5 mL/L	1,0 mL/L	1,5 mL/L
0	23,71 ^A	26,55 ^A	27,38 ^A	29,52 ^A
60	16,78 ^B	22,00 ^B	20,92 ^B	23,69 ^B
120	12,23 ^C	14,88 ^C	15,07 ^C	14,07 ^C
180	5,95 ^D	9,02 ^D	7,95 ^D	7,95 ^D
EPM	1,49	1,81	1,81	1,87

*Médias dos tempos, com letras maiúsculas e distintas na coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de SNK. EPM: erro padrão da média.

Os dados da Tabela 3 mostram uma redução progressiva e significativa ($P < 0,05$) do vigor ao longo do tempo, no entanto, não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos aplicados.

Tabela 3. Vigor pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservado em três concentrações diferentes (0,5; 1,0 e 1,5 mL/L) de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*) avaliados pelo teste de termo resistência (TTR) fisiológico

Tempo (min)	Tratamentos			
	Controle	0,5 mL/L	1,0 mL/L	1,5 mL/L
0	2,71 ^A	2,83 ^A	2,85 ^A	2,82 ^A
60	2,23 ^B	2,40 ^B	2,38 ^B	2,39 ^B
120	1,88 ^C	1,95 ^C	2,00 ^C	1,97 ^C
180	1,90 ^D	1,38 ^D	1,30 ^D	1,29 ^D
EPM	0,11	0,09	0,10	0,09

*Médias dos tempos, com letras maiúsculas e distintas na coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de SNK. EPM: erro padrão da média.

Observou-se que os tratamentos com diferentes concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 mL/L) de éster de pequi apresentou médias próximas ao controle, variando de 36,54 a 38,61, sem diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos para a funcionalidade da membrana plasmática (Tabela 4).

Tabela 4. Funcionalidade da membrana plasmática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservado em três concentrações diferentes (0,5; 1,0 e 1,5 mL/L) de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*)

	Tratamentos			
	Controle	0,5 mL/L	1,0 mL/L	1,5 mL/L
	37,52	36,54	38,61	36,64
EPM	1,93 ^A	1,53 ^A	1,77 ^A	2,39 ^B

*Médias dos tempos, com letras maiúsculas e distintas na linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de SNK. EPM: erro padrão da média.

A taxa de clivagem e a taxa de embriões avaliadas na produção *in vitro* não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre os tratamentos (Figuras 2 e 3).

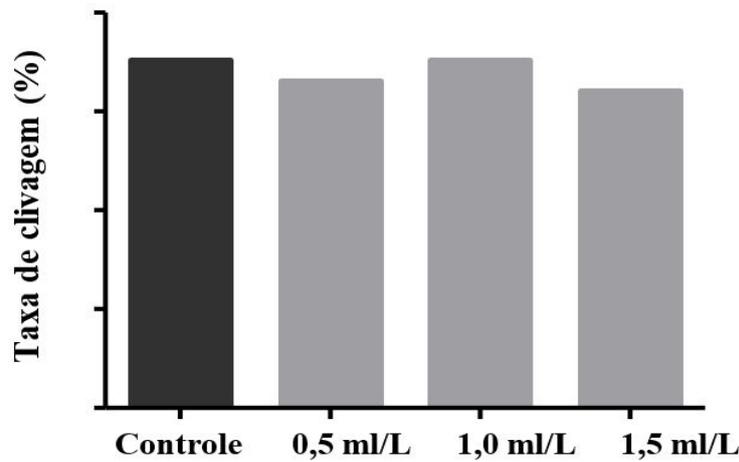


Figura 2. Taxa de Clivagem de oócitos fertilizados com sêmen bovino criopreservado em três concentrações diferentes (0,5; 1,0 e 1,5 mL/L) de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*), e grupo controle sem tratamento experimental. Os valores representam a média \pm D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA).

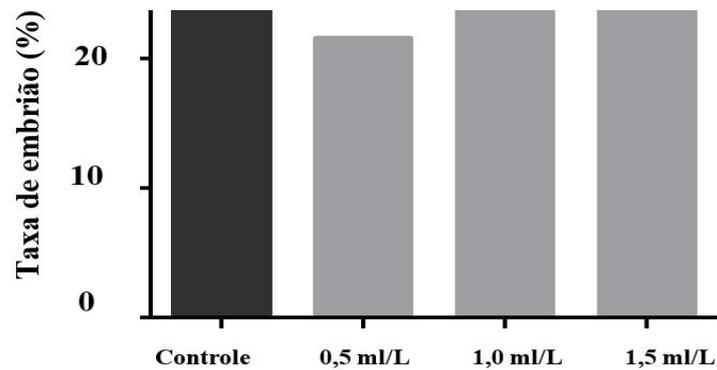


Figura 3. Taxa de desenvolvimento embrionário fertilizado com sêmen bovino criopreservado em três concentrações diferentes (0,5; 1,0 e 1,5 mL/L) de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*), e grupo controle sem tratamento experimental. Os valores representam a média + D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA).

A quantificação de glutathiona reduzida (Figura 4) do sêmen bovino criopreservado não diferiu entre os tratamentos ($p>0,05$). A quantificação de MDA do sêmen bovino (Figura 5) após descongelação diferiu significativamente ($p<0,05$), reduzindo a concentração de malondialdeído nos tratamentos 1,0 e 1,5 mL/L, em comparação ao tratamento 0,5 mL/L de éster de pequi e o controle.

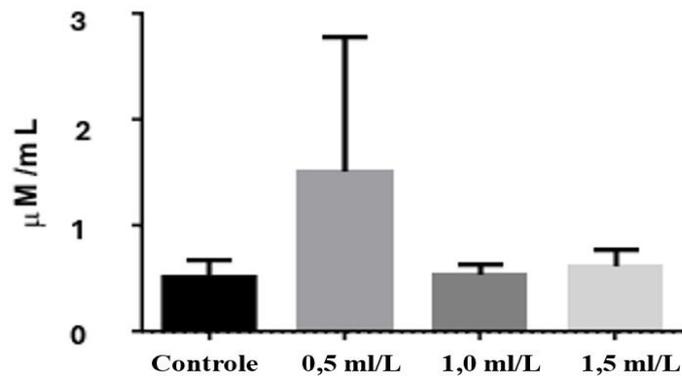


Figura 4. Quantificação de glutatona reduzida (GSH) em sêmen bovino criopreservado em três concentrações diferentes (0; 0,5; 1,0 e 1,5mL/L) de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*), e grupo controle sem tratamento experimental. Os valores representam a média \pm D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA).

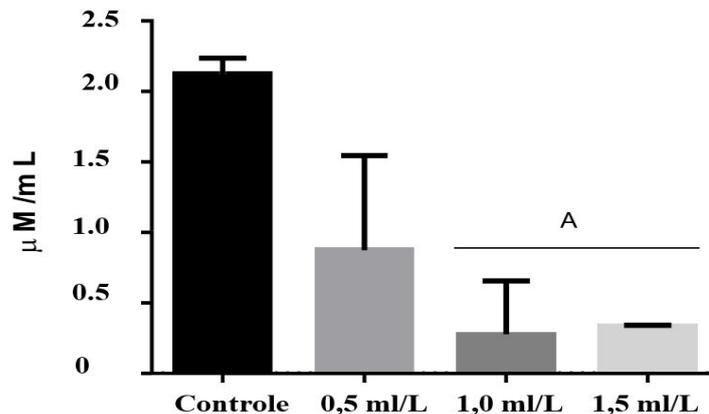


Figura 5. Quantificação de malondialdeído em sêmen bovino criopreservado em três concentrações diferentes (0,5; 1,0 e 1,5mL/L) de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*), e grupo controle sem tratamento experimental. Os valores representam a média \pm D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA). Médias com letras maiúsculas e distintas na coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de SNK.

4. Discussão

O ácido oléico (18:1) é um ácido graxo monoinsaturado amplamente reconhecido por suas propriedades antioxidantes e benéficas à saúde. Sua presença em concentrações elevadas pode contribuir para a proteção contra estresse oxidativo, o que é relevante para a preservação da qualidade espermática durante a criopreservação. Estudos têm demonstrado que a suplementação com ácidos graxos insaturados pode melhorar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides e reduzir os danos oxidativos⁽¹⁹⁾.

O ácido esteárico (18:0) e o ácido palmítico (16:0), ambos ácidos graxos saturados, também desempenham papéis importantes na composição de lipídios da membrana celular. Embora a presença elevada de ácidos graxos saturados possa estar associada a efeitos

adversos na fluidez da membrana espermática, o equilíbrio entre ácidos graxos saturados e insaturados é crucial para manter a funcionalidade espermática ⁽²⁰⁾. A combinação desses ácidos graxos no óleo de pequi sugere um potencial sinérgico que poderia ser explorado para otimizar a preservação do sêmen. Além disso, a baixa concentração de ácidos graxos poliinsaturados, como o linoléico (18:2), é favorável, uma vez que esses compostos estão mais suscetíveis à oxidação, o que poderia comprometer a qualidade do sêmen durante o processo de criopreservação ⁽²¹⁾. A menor quantidade de ácido palmitoléico também indica que o óleo de pequi tem uma composição que pode ser menos propensa à degradação oxidativa.

Estudos com éster de pequi em criopreservação espermática não foram descritos anteriormente, mas estudos com compostos presentes no éster de pequi como o ácido oleico e o ácido linoléico ao meio de diluição já foram relatados em estudos promovendo aumento da motilidade de espermatozoides suínos ⁽²²⁾. Por isso foi considerado que a suplementação de éster de pequi aumentasse os valores de motilidade e vigor espermático em comparação ao controle, uma vez que os antioxidantes podem preservar ou reduzir os radicais livres liberados pelo metabolismo celular ⁽²³⁾. Mas o efeito da atividade antioxidante do éster de pequi nesse estudo não demonstrou aumentar ou preservar a velocidade e o vigor espermático. Esse resultado pode ser atribuído às propriedades antioxidantes do óleo de pequi, que, embora sejam capazes de neutralizar o estresse oxidativo (um fator que contribui para a diminuição da motilidade), não foram suficientes para manter esses parâmetros⁽²¹⁾.

A redução da motilidade espermática ao longo do tempo é um fenômeno esperado em contextos de criopreservação, onde a perda da viabilidade celular é frequentemente observada ⁽²²⁾. A redução acentuada nos tempos de 120 e 180 minutos reflete a fragilidade dos espermatozoides sob condições não ideais, mesmo na presença de antioxidantes. A funcionalidade da membrana espermática não diferiu estatisticamente nesse estudo, entre os tratamentos e o controle, contudo foram reativos ao teste. Estudos demonstram que antioxidantes naturais, podem melhorar a resistência ao estresse criogênico, protegendo a estrutura e função da membrana ⁽²⁴⁾.

As diferentes concentrações de éster de pequi não influenciaram a taxa de clivagem e a taxa de embriões, apesar de ter sido observado menor produção de MDA nos tratamentos com éster de pequi em comparação ao controle, o que pode ser explicado por diversos fatores envolvidos na criopreservação e no desenvolvimento embrionário. Estudos recentes sugerem que a criopreservação de sêmen afeta não apenas a integridade da membrana plasmática, mas também provoca danos no DNA espermático e na função mitocondrial, fatores que são essenciais para o desenvolvimento embrionário adequado ^(25,24), no entanto os testes não foram realizados neste estudo.

A ausência de efeito nas taxas de clivagem pode estar relacionada ao fato de que, embora o éster de pequi apresente propriedades antioxidantes, a sua capacidade de prevenir a peroxidação lipídica pode não ser suficiente para proteger contra danos mais profundos, como a fragmentação do DNA espermático. Fragmentação de DNA pode ocorrer mesmo em

espermatozoides que retêm motilidade, e esses danos podem resultar em embriões de baixa qualidade que não conseguem atingir os estágios de desenvolvimento mais avançados ⁽²⁶⁾.

A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) nos tratamentos mantiveram-se constante não diferindo do controle. A atividade do GSH é importante no controle da geração de peróxidos lipídicos, pois evita alteração na fluidez da membrana plasmática necessária para a fusão espermatozoide-oócito ⁽²⁷⁾. Contudo a criopreservação altera o metabolismo espermático, através do desequilíbrio induzido, aumentando a produção de espécies reativas e reduzindo a atividade antioxidante do sêmen, resultando na redução da glutathiona peroxidase do sêmen ⁽²⁸⁾. Em outro estudo, avaliou o efeito da polpa de pequi na dieta de ratos, e verificou efeito protetor ao fígado aumentando o conteúdo de glutathiona total e redução da peroxidação lipídica ⁽²⁹⁾.

No presente estudo, a adição de 1,0 e 1,5 mL/L de éster de pequi (*Caryocar coriaceum*) mostrou-se eficaz na prevenção da produção de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica. Esse achado é consistente com outros estudos que demonstraram a inibição da lipoperoxidação (LPO) por antioxidantes durante a criopreservação espermática ^(24,26). O estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante celular, é uma das principais causas de danos às membranas celulares e à motilidade espermática durante a criopreservação ⁽²⁵⁾.

As mitocôndrias são particularmente vulneráveis a danos induzidos por ROS, uma vez que são as principais fontes de produção de ROS na célula. Quando comprometidas, elas contribuem para a geração de estresse oxidativo, o que pode resultar em danos severos às membranas espermáticas, ao DNA e, conseqüentemente, na imobilização dos espermatozoides ⁽²⁴⁾. A adição de antioxidantes como o éster de pequi visa neutralizar essas ROS e minimizar o impacto negativo na integridade e função celular durante o processo de congelamento e descongelamento ⁽²⁵⁾.

Estudos anteriores já demonstraram que a polpa de pequi apresenta significativo potencial antioxidante, relacionado aos altos níveis de ácido ascórbico (Vitamina C) ⁽¹⁸⁾. *In vivo*, esta substância caracteriza-se como um bom antioxidante por ser capaz de neutralizar as ROS e inibir a peroxidação lipídica na forma direta ou indireta atuando fortemente como O₂^{••}, H₂O₂, hipoclorito (ClO⁻), OH⁺ e radical peroxil (OOH[•]) ⁽³⁰⁾. Além disso, em determinadas condições, a vitamina C pode atuar como pró-oxidante, estimulando a produção de H₂O₂ e promovendo reações de Fenton, que geram radicais hidroxila (OH⁺), os quais, em excesso, também podem causar danos às células ⁽²⁵⁾.

5. Conclusão

A partir dos resultados encontrados, conclui-se que a suplementação com o éster de pequi (1,0 e 1,5 mL/L), na criopreservação de sêmen bovino, pode ser benéfica para minimizar os efeitos da peroxidação lipídica dos espermatozoides, visto que houve redução na concentração de malondialdeído pós-descongelamento.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

Contribuições do autor

Conceituação: Y. N. T. C. Castelo Branco e M. S. C. Lustosa. Curadoria de dados: R. L. Moura, Y. N. T. C. Castelo Branco e M. S. C. Lustosa. Análise formal: J. H. L. Silva e R. L. Moura. Gerenciamento do projeto: J. A. T. Souza, F. C. Figueiredo e G. M. C. Carvalho. Supervisão: I. M. R. Nascimento, M. A. Castelo Branco. Investigação: B. F. Brito, T. S. Câmara, J. H. L. Silva, S. D. C. Rodrigues, M. A. Castelo Branco, R. L. Moura, Y. N. T. C. Castelo Branco e M. S. C. Lustosa. Redação (rascunho original): R. L. Moura e M. S. C. Lustosa. Redação (revisão e edição): M. A. Castelo Branco e Y. N. T. C. Castelo Branco.

Agradecimentos

Os autores agradecem à EMBRAPA MEIO-NORTE pela concessão dos animais utilizados no experimento. Agradecemos também à CAPES, pelo apoio financeiro.

Referências

1. Sapanidou V, Tsantarliotou MP, Lavrentiadou, SN. A review of the use of antioxidants in bovine sperm preparation protocols. *Animal Reproduction Science*. 2023; 251(4):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107215>
2. Durairajanayagam D. Physiological role of reactive oxygen species in male reproduction. In: Henkel R, Samanta L, Agarwal A. (Eds.) *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*. Eds. Academic Press, 65–78. 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00008-0>
3. Baldi E, Tamburrino L, Muratori M, Degl'Innocenti S, Marchiani S. Adverse effects of in vitro manipulation of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2020; 220:106314. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106314>
4. Pintus, E, Ros-Santaella JL. Impact of oxidative stress on male reproduction in domestic and wild animals. *Antioxidants*. 2021; 10(7), 1154. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox10071154>
5. Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2007; 29(3): 695-698. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000300052>
6. Polewski K, Kniat S, Slawinska D. Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. *Current Topics in Biophysics*. 2002; 26(2), 217–227. https://www.researchgate.net/publication/284542596_Gallic_acid_a_natural_antioxidant_in_aqueous_and_micellar_environment_spectroscopic_studies
7. Miranda -Vilela AL, Akimoto AK, Alves PCZ, Pereira LCS, Gonçalves CA, Klautau-Guimarães MN, Grisolia CK. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant -Val9Ala. *Genet. Mol. Res*. 2009; 8, 1481-1495. doi: <https://doi.org/10.4238/vol8-4gmr684>.
8. AOCS – American Oil Chemists’ Society. 1993. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists’ Society*, 4th ed., AOCS, Champaign. <https://library.aocs.org/>
9. CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Bovinos. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. CBRA. Belo Horizonte-MG, p. 47-50, 2013. Disponível em: <http://cbra.org.br/br/>
10. Vianna F P, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell’Aqua Jr. JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull sêmen. *Animal Reproduction Science*. 2009; 113, 279-282. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.06.009>
11. Correa JR, Zavos PM. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 1994 Aug 1;42(2):351-60. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90280-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90280-1)

12. Melo MIV, Henry M. Teste hiposmótico na avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2005;57(6), 757-763. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000600009>
13. Vasconcelos AB, Zandonaide JBZ, Sobrinho ALF, Silva BO, Quintal PNQ. A comparative study of three different dyes evaluating the physical integrity of the plasma membrane of cryopreserved bovine spermatozoa. *Veterinária Notícias*. 2017; 23(1), 13-22. <http://dx.doi.org/10.14393/VTV-v23n1-2017.2>
14. Oliveira CS. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica / Clara Slade Oliveira, Raquel Varela Serapião e Carolina Capobiango Romano Quintão. – Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014. 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1001858>
15. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*. 1979 Jan; 48(1): 76-86. doi: <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>.
16. Bó GA, Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*. 2013; 10(3):344-348. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a604cf7783717068b46a2>
17. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52:302-10. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
18. Machado, M.T.C.; Mello, B.C.B.S.; Hubinger, M.D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, v.117, p.450– 457, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.007>
19. Barros, F N. Efeito da adição do ácido araquidônico e do ácido oleico ao diluidor tris-gema sobre a viabilidade espermática póscongelamento em sêmen caprino. 2021. 88 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí. 2021. <http://repositorio.ufpi.br:8080/handle/123456789/2814>
20. Ferramosca A, Zara V. Diet and male fertility: The impact of nutrients and antioxidants on sperm energetic metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 25;23(5):2542. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23052542>.
21. Beygi Z, Forouhari S, Mahmoudi E, Hayat SMG, Nourimand F. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in male fertility. *Current Molecular Medicine*. 2021;21(4):265-282. doi: <https://doi.org/10.2174/1566524020999200831123553>
22. Hossain MDS, Tareq KMA, Hammano K, Tsujii H. Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. *Reproductive Medicine and Biology*. 2007; 6: 235-239. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2007.00191.x>. PMID: 29699281; PMCID: PMC5904605.
23. Almeida J, Brito M, Neves BP, Becerra VAB, Auler PA, Haddad JP, Baruselli PS, Henry M. Use of cooled buffalo semen as a strategy to increase conception rates in fixed-time artificial insemination programs during unfavorable reproductive periods. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (online)*. 2021; 73(3): 560-570. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12142>
24. Khan IM, Cao Z, Liu H, Khan A, Rahman SU, Khan MZ, Sathanawongs A, Zhang Y. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021; 8; 1-14. doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>.
25. Ugur MR, Abdelrahman AS, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019; 1-15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>.
26. Zhang B, Wang Y, Wu1 C, Qiu S, Chen X, Cai B, Xie H. Freeze-thawing impairs the motility, plasma membrane integrity and mitochondria function of boar spermatozoa through generating excessive ROS. *BMC Veterinary Research*. 2021;17;127: 1-9. doi: <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02804-1>.
27. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*. 1994 Apr; 16(4): 259-67. doi: <https://doi.org/10.1002/bies.950160409>. PMID: 8031303.
28. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine

spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.* 2000 Mar;55(3):282-8. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7)

29. Viana, A. M. F. Efeito da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) nas alterações hepáticas induzidas pela dieta hiperlipídica em ratos. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Nutrição) - Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição, Ouro Preto, 2015. <https://www.repositorio.ufop.br/items/248df98a-f4eb-435b-b53b-1b8155199115>

30. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova.* 2007; 30(5), 1323-1338. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>