



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS DILUIDORES TRIS OU ÁGUA DE COCO EM  
PÓ (ACP-106®), ASSOCIADO A *ALOE VERA* (*Aloe barbadensis Miller*), NA  
CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO**

**Cibele Cavalcanti Souza de Melo**

Recife – PE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS DILUIDORES TRIS OU ÁGUA DE COCO EM  
PÓ (ACP-106<sup>®</sup>), ASSOCIADO A *ALOE VERA* (*Aloe barbadensis Miller*), NA  
CONSERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO**

**Cibele Cavalcanti Souza de Melo**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da RENORBIO (PPGB-RENORBIO), como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Linha de pesquisa: Conservação e multiplicação de germoplasma

Orientadora: Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra

Recife – PE

2015

Ficha catalográfica

M528a Melo, Cibele Cavalcanti Souza de  
Avaliação da eficácia dos diluidores Tris ou Água de  
coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>), associado à *Aloe vera* (*Aloe  
barbadensis Miller*), na conservação do sêmen canino /  
Cibele Cavalcanti Souza de Melo. – Recife, 2015.  
88 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede

Nordeste de

Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2015.  
Ponto focal em Pernambuco - Universidade

Federal

Rural de Pernambuco.  
Inclui referências e apêndice(s).

Refrigeração

1. *Aloe vera* 2. Renovação do diluído 3.

em pó

4. Centrifugação 5. Gema de ovo 6. Água de coco

orientadora

(ACP-106<sup>®</sup>) I. Guerra, Maria Madalena Pessoa,

II. Título

CDD 620.8


**Cibele Cavalcanti Souza de Melo**

**Avaliação da eficácia dos diluidores Tris ou Água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>),  
associado a *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller), na conservação de sêmen canino.**

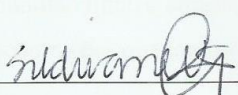
Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

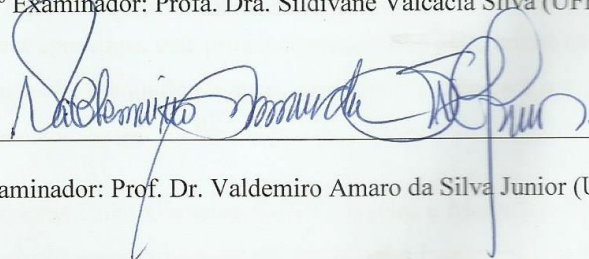
Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

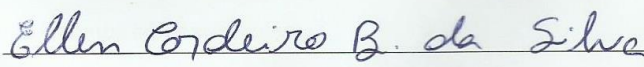
**Aprovada em 27 de fevereiro de 2015 por:**

  
\_\_\_\_\_  
Presidente: Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra (RENORBIO/UFRPE)

  
\_\_\_\_\_  
1º Examinador: Profa. Dra. Érika Christina Santos Oliveira (UFRPE)

  
\_\_\_\_\_  
2º Examinador: Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva (UFPB)

  
\_\_\_\_\_  
3º Examinador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (UFRPE)

  
\_\_\_\_\_  
4º Examinador: Profa. Dra. Ellen Cordeiro Bento da Silva (UFRPE)

## AGRADECIMENTOS

É de praxe agradecer primeiramente a Deus. Mas, não é porque todos fazem que eu esteja fazendo. E sim, pelo simples fato de que foi esta força maior que me mostrou o caminho da tranquilidade e da determinação que eu achava que havia acabado. E apesar de ser na adversidade que lembramos mais Dele, eu só tenho a agradecer por ter concluído esta etapa. Sem a crença que isto seria possível, nada teria acontecido. Por isto, meu maior Obrigada é sim, a Deus;

À minha Grande Amiga, guerreira, Ana Melo, minha Mãezona. Toda esta vitória é uma forma de recompensar o apoio, a dedicação e o amor que em toda a minha vida tens me dado. Mesmo com todos os aperreios do mundo e com todas as discussões, você é a minha luz, minha inspiração, meu Sol, e é por você que busco cada dia mais melhorar, crescer e batalhar;

A Alain Ageev, meu eterno namorado, que, mais uma vez, aguentou com toda paciência do mundo mais um período de estresse, ausência e loucuras. Eu te amo pra sempre;

A Leandro Melo, meu maninho lindo e amado, e a Nathália Regina, minha cunhada maravilhosa, pelas risadas e descontrações que tanto me ajudaram a relaxar. Amo vocês;

A todos da minha família, que de alguma forma ajudaram a me acalmar e me apoiaram com seus conselhos, mas principalmente a Manuela, minha querida afilhada, que, mesmo sem falar nada, me ajudou a amar, a ter mais paciência e a aprender quais são as coisas que realmente devemos cuidar e amar. Amo todos;

Às Professoras Erika Christina Santos Oliveira e Maria Madalena Pessoa Guerra, por terem me aceitado como orientada. Obrigada pelas inspirações, pelos puxões de orelha e pelos ensinamentos compartilhados;

Aos professores, Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior, Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho, Profa. Dra. Áurea Wischral e

Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva, que tanto contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço ainda pela amizade, pelo apoio e pelo carinho;

À Allynneide Rodrigues, apesar de todas as loucuras e desentendimentos devido ao seu jeito de ver as coisas (completamente diferente do meu), obrigada pela paciência e pela amizade, você vai viver pra sempre em meu coração;

À amiga querida, que desde o início da faculdade está sempre por perto, mesmo que apenas no coração, Luciana Coutinho. Você é uma pessoa a qual tenho como espelho. Quero ter seu discernimento, sua dedicação, sua garra e seu olhar para a vida quando eu crescer. Obrigada por fazer parte da minha vida. Ter você como minha amiga é uma honra;

À Thais Gusmão, Adriana Neves, Lorena Tavares, Renata Revorêdo, Maria da Conceição, Rebeca Ramos, Cecília Freire e Katharyne Rossiter, por todas as gargalhadas, perrengues, experimentos, viagens, passeios, confraternizações e, acima de tudo, pela amizade compartilhada, muito obrigada. Vocês marcaram minha vida, cada uma de sua forma;

À Tatiana Pagliane, pela disponibilidade e liberação do uso de seus cães maravilhosos e, em consequência, pelo crescimento de uma amizade. Não tenho palavras para agradecer. A Midi, Rosiele e Thiago, pela colaboração em todos os dias do experimento;

Aos colaboradores indiretos, Dona Sônia, Joana Darc e Alcir, que me ajudaram durante estes quatro anos do Curso de Doutorado;

Aos colegas do ANDROLAB, Dr. André Mariano Batista, pela ajuda e participação na banca e, em especial, a Profa. Dra. Ellen Cordeiro Bento da Silva, que, apesar dos estresses, no momento em que eu mais precisei você se mostrou como um Anjo em minha vida. Obrigada pelo apoio, pelas orientações, pelas puxadas de orelha, e pela participação na minha banca. Você merece todo sucesso do mundo;

Ao Professor Celso, à Professora Tânia e ao pessoal do Centro de Estratégias e Tecnologias do Nordeste (CETENE), Josi e Janaína, que me ajudaram nas ideias e nas etapas do projeto;

Ao professor Leandro Souza, que no maior período de “aperreio”, acalmou meu coração e me ajudou imensamente. Muito obrigada;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da Bolsa de Doutorado; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto; à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela disponibilidade do Laboratório; e à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pela oportunidade. Meus sinceros agradecimentos;

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma colaboraram, novas ou antigas amigas, desde o início ou agora no finalzinho do Doutorado, seja na execução do projeto ou num simples “Oi”. Sintam-se abraçados. Sou uma pessoa de sorte por ter todos vocês por perto.

*A Deus, por me conceder o dom da vida, da  
sabedoria e da dedicação, e à minha querida  
guerreira, que tanto fez e faz para me deixar feliz,  
Minha mãe.*

**Dedico**



**“As nossas crenças se transformam em pensamentos.  
Nossos pensamentos se transformam em palavras.  
Nossas palavras se tornam ações.  
Nossas ações se tornam hábitos.  
Nossos hábitos se tornam valores.  
E nossos valores revelam o nosso destino.”**

**- Gandhi**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ALH:** movimento lateral da cabeça

**ANDROLAB:** Laboratório de Andrologia

**BCF:** batimento cruzado

**CEUA:** Comitê de Ética de Uso de Animais

**CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**DCF:** Diacetato de carboxifluoresceína

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**FDA:** Food and Drug Administration

**I.A.:** inseminação artificial

**iMP:** integridade de membrana plasmática

**IP:** Iodeto de Propídeo

**LDL:** lipoproteína de baixa densidade

**LIN:** linearidade

**MOP:** motilidade progressiva

**MOT:** motilidade total

**RENORBIO:** Rede Nordeste de Biotecnologia

**ROS:** espécies reativas ao oxigênio

**SCA:** *Sperm Class Analyser*

**STR:** retilinearidade

**Tris:** hidroximetil aminometano

**VAP:** velocidade em linha reta

**VCL:** velocidade curvilínea

**VSL:** velocidade média do percurso

**WOB:** índice de oscilação

## LISTA DE FIGURAS

### Página

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1:</b> | Folha da Babosa - <i>Aloe vera</i> ( <i>Aloe barbadensis</i> Miller) – Fonte:<br>Arquivo Pessoal..... | 30 |
|------------------|---|----|

## LISTA DE TABELAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Tabela 1a:</b> Composição da Babosa ( <i>Aloe vera</i> – <i>Aloe barbadensis</i> Miller) – (BRASIL, 2014).....   | 33            |
| <b>Tabela 1b:</b> Composição da Babosa ( <i>Aloe vera</i> – <i>Aloe barbadensis</i> Miller) – (BRASIL, 2014).....   | 34            |
| <br><i>Experimento 1</i>  |               |
| <b>Table 1.</b> Means and standard deviations of the kinetic parameters and plasma membrane integrity of sperm refrigerated (5 °C) dogs evaluated before (0 to 48 hours) and after centrifugation (72 and 96h), with or without renewal extender..... | 68            |
| <br><i>Experimento 2</i>  |               |
| <b>Tabela 1.</b> Média e desvios-padrão das motilidades total e progressiva do sêmen refrigerado a 5 °C de cães avaliado no <i>Sperm Class Analyzer</i> (SCA <sup>®</sup> ), por um período de 72 horas.....  | 86            |
| <b>Tabela 2.</b> Média e desvios-padrão da integridade de membrana plasmática do sêmen refrigerado a 5 °C de cães avaliado no <i>Sperm Class Analyzer</i> (SCA <sup>®</sup> ), por um período de 72 horas.....  | 86            |
| <b>Tabela 3.</b> Média e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos do sêmen refrigerado a 5 °C de cães avaliado no <i>Sperm Class Analyzer</i> (SCA <sup>®</sup> ), por um período de 72 horas.....   | 87            |

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do gel da planta *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller), associado ao diluidor Tris (hidroximetil aminometano) ou Água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>) na conservação de sêmen de cães, bem como a ação desse gel no processo de renovação do diluidor. Foram utilizadas amostras seminais de cinco cães da raça Basset Hound. No Experimento 1, as amostras foram diluídas em duplicata, utilizando Tris + 20% de gema de ovo (G1 e G2) ou 5% de *Aloe vera* (G3 e G4), e avaliadas nos tempos de 0, 48, 72 e 96 horas. Após a análise de 48h, todas as amostras foram centrifugadas por 10 min (400g) em centrífuga refrigerada (5 °C). Nos grupos G1 e G3 o sobrenadante foi removido e um novo diluidor foi adicionado. Nos outros grupos (G2 e G4) os *pellets* foram rediluídos no mesmo sobrenadante, sem renovação. Para o Experimento 2, as amostras foram divididas em alíquotas iguais, de acordo com os tratamentos (G1: Tris + 20% gema de ovo, controle; G2: Tris + 5% *Aloe vera*; G3: ACP-106<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*) e avaliados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas após refrigeração. Em ambos experimentos foram realizadas análises de cinética espermática e de integridade da membrana (iMP). Nos resultados do Experimento 1 a renovação do diluidor não influenciou em nenhum parâmetro analisado no grupo que utilizou gema de ovo (G1), fato evidenciado quando comparados os dois tratamentos que utilizaram esta substância. O G2 (sem renovação) não determinou diferença significativa quando comparado ao G1 (com renovação). Entretanto, os grupos com Tris-*Aloe vera* (G3 e G4) foram inferiores ( $P < 0,05$ ) aos grupos com Tris-gema de ovo (G1 e G2) após a renovação, e esta mostrou efeito deletério nos espermatozoides do grupo que recebeu novo diluidor (G3), em todos os parâmetros. No Experimento 2 não foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros de motilidade total, retilinearidade e índice de oscilação e integridade de membrana plasmática quando comparados os tratamentos e os tempos de avaliação. Entretanto, a motilidade progressiva no G1 mostrou-se significativamente superior ( $P < 0,05$ ) aos demais tratamentos no primeiro tempo de avaliação (0h). No entanto, às 24h o G3 demonstrou valores semelhantes ao G1. Os valores de linearidade no G3 foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) aos demais grupos desde o início das avaliações. De acordo com os achados do Experimento 1, pode-se concluir que a renovação do diluidor não é necessária para a preservação dos espermatozoides caninos submetidos à refrigeração (5 °C) por 96 h. Além disso, constatou-se que o gel da *Aloe vera* pode ser utilizado em substituição à gema de ovo, no diluidor de refrigeração de sêmen de cães, na concentração de 5%, sem renovação do diluidor. Já no Experimento 2, pode-se concluir que a *Aloe vera* pode ser empregada na concentração de 5% em substituição à gema de ovo no diluidor de refrigeração de sêmen de cães, independente do diluidor utilizado.

**Palavras-chave:** *Aloe vera*, renovação do diluidor, refrigeração, centrifugação, gema de ovo, Água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>).

## ABSTRACT

The aim was to evaluate the effect of the *Aloe vera* gel (*Aloe barbadensis* Miller), in association with the Tris base (hydroxymethyl aminomethane) or powdered coconut water (ACP- 106<sup>®</sup>) in canine semen conservation, as well as the action of this gel in the renewal process of the extender. Semen samples from five dogs, of breed Basset Hound, were used. In Experiment 1, samples were diluted in duplicate, using Tris plus 20% egg yolk (G1 and G2) or 5% *Aloe vera* (G3 and G4) and evaluated at 0, 48, 72 and 96 hours. After 48 hours, all samples were centrifuged for 10 minutes (400g) in a cooled centrifuge (5 °C). In the groups G1 and G3 the supernatant was removed and a new extender was added. In the other groups (G2 and G4) pellets were re-diluted in the same supernatant, without renewal. For Experiment 2, samples were divided into two equal aliquots, according to the treatments (G1: Tris + 20% egg yolk, control G2: Tris + 5% *Aloe vera*; G3: ACP-106<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*) and evaluated at 0, 24, 48 and 72 hours after cooling. In both experiments were performed sperm kinetics and membrane integrity analysis (iMP). In Experiment 1 results the diluent renewal did not affect on any parameter analyzed in the group using egg yolk (G1), shown when comparing the two treatments of this substance. The G2 (without renewal) did not demonstrate a significant difference when compared to G1 (renewal). However, groups with Tris-*Aloe vera* (G3 and G4) were lower ( $P < 0.05$ ) than the groups with Tris-egg yolk (G1 and G2) after the renewal, and this has showed deleterious effect on the group that sperm received new diluent (G3) in all parameters. There were no statistical differences in Experiment 2 in the parameters of total motility, straightness and oscillation index and plasma membrane integrity comparing treatments and evaluation times. However, the progressive motility in G1 proved to be significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the other treatments in the first assessment period (0h). However, at 24 the G3 showed values similar to G1. The linearity values of G3 were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than other groups from the start of the evaluations. According to the findings from Experiment 1, it can be concluded that the replacement of diluent is not necessary for the preservation of canine spermatozoa undergo cooling (5 °C) for 96 h. Furthermore, it was found that the gel of *Aloe vera* may be used to replace egg yolk in dog semen cooling diluent at a concentration of 5% without renewal. In the Experiment 2, it can be concluded that *Aloe vera* can be used at a concentration of 5% to replace egg yolk in dog semen cooling diluent, regardless of the one used.

**Keywords:** *Aloe vera*, renewal extender, cooling, centrifugation, egg yolk, powder coconut water (ACP-106<sup>®</sup>).

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b>   |               |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>   |               |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   |               |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   |               |
| <b>RESUMO</b>   |               |
| <b>ABSTRACT</b>   |               |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>16</b>     |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>   | <b>19</b>     |
| <b>2.1 Biotecnologia do Sêmen.....</b>  | <b>19</b>     |
| 2.1.1 Refrigeração.....   | 20            |
| <b>2.2 Diluidores.....</b>  | <b>23</b>     |
| <b>2.3 Crioprotetores.....</b>  | <b>26</b>     |
| 2.3.1 Gema de Ovo.....  | 26            |
| <b>2.4 <i>Aloe vera</i> (<i>Aloe barbadensis</i> Miller).....</b>                             | <b>28</b>     |
| <b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>35</b>     |
| <b>4 EXPERIMENTOS.....</b>  | <b>49</b>     |
| <b>The replacement of diluents Tris-egg yolk and Tris-<i>Aloe vera</i> sp.</b>                |               |
| <b>4.1 (<i>Aloe barbadensis</i> Miller) extends the viability of canine semen</b>             | <b>50</b>     |
| <b>storage at 5 °C? .....</b>   |               |
| <b>4.2 Efeito do gel mucilaginoso da <i>Aloe vera</i> (<i>Aloe barbadensis</i> Miller) na</b> | <b>69</b>     |
| <b>viabilidade do sêmen refrigerado canino .....</b>  |               |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>  | <b>88</b>     |



## 1 INTRODUÇÃO

O sucesso da biotecnologia de conservação do sêmen vem crescendo devido ao aumento de pesquisas na área, com o objetivo principal de prolongar a viabilidade *in vitro* e o poder fecundante dos espermatozoides armazenados (FOOTE e PARKS, 1993; ANDRADE, 2002) e, conseqüentemente, favorecer a propagação das espécies (BEAVER, 2001).

Mais especificamente nos cães, esse procedimento (RIJSSELAERE et al., 2005) a cada dia ganha mais importância mundial, pois possibilita o intercâmbio entre bancos de sêmen, sem necessidade de transportar os animais para o acasalamento (MILANI et al., 2010). É aparente o interesse cada vez maior dos criadores dessa espécie por estas biotécnicas da reprodução, devido à existência de problemas com o acasalamento natural, bem como a necessidade de conservação do gamoplasma de um determinado animal, principalmente para fins comerciais. Além disso, a tecnologia de sêmen permite também a reprodução de animais com deficiências físicas ou comportamentais, quando estes representam linhas genéticas que não podem ser perdidas (MORATO e BARNABÉ, 1998), além de auxiliar em programas reprodutivos de animais selvagens e/ou com risco de extinção.

Entretanto, para que a técnica seja bem sucedida, faz-se necessário manter o sêmen por um período de tempo mais prolongado, já que sua sobrevivência no plasma seminal é limitada a poucas horas. Para isto, é necessária a diluição em uma solução protetora e nutritiva (HAFEZ e HAFEZ, 2004; AQUILA et al., 2005). O diluidor mais utilizado para sêmen de cães é o Tris (hidroximetil aminometano), um tampão com potencial hidrogeniônico (pH) e osmolaridade compatíveis com a sobrevivência espermática (EVANS e MAXWELL, 1987). No entanto, outra alternativa é a água de coco em pó

(ACP®), oriundo de um processo de desidratação à vácuo da água de coco *in natura*, que após regulação de pH e osmolaridade para cada espécie, torna-se um diluidor viável e de baixo custo (SALGUEIRO et al., 2002).

Associado ao diluidor há a adição de substâncias protetoras de membrana e, dentre elas, a mais utilizada é a gema de ovo. No entanto, vem-se buscando um substituto para produtos de origem animal, visando garantir a segurança sanitária nos processos biotecnológicos, devido ao risco de transmissão de doenças (BOUSSEAU et al., 1998; SAMPAIO NETO et al., 2002). Uma opção para isto é a *Aloe vera*, planta que contém diversas propriedades antioxidantes (SARABIA et al., 1999) e de regeneração celular (MATOS, 1998; AHMED et al., 2009; MARPUDI et al., 2011).

A *Aloe vera* ou babosa, como é conhecida popularmente, contém ainda açúcares, como a frutose e vitaminas C e E (HU et al., 2003; VELLOSO e PEGLOW, 2003; VIGNINI, 2011), que são essenciais para a manutenção da viabilidade espermática, o que suporta e encoraja o estudo desta substância como um possível constituinte do diluidor de criopreservação de sêmen de cães. Esta planta já foi utilizada na conservação do sêmen de ovinos (RODRIGUEZ et al., 1988; GUTIÉRREZ et al., 2006), onde foram obtidas taxas favoráveis de sobrevivência espermática e também na refrigeração de sêmen de caprinos (MELO, 2010; MELO et al., 2012), corroborando o uso da mesma para conservação de sêmen de outras espécies.

Por não existir no mercado um diluidor preconizado para a espécie canina, busca-se a elaboração de uma alternativa, utilizando-se a *Aloe vera* como um possível substituto para a gema de ovo, a fim de se obter um diluidor de sêmen que possa garantir a segurança sanitária necessária ao processo biológico e ao mesmo tempo promover benefícios para os espermatozoides caninos. Assim, o objetivo da pesquisa foi avaliar a eficácia da adição de

*Aloe vera* como crioprotetor do sêmen canino refrigerado a 5 °C e verificar sua capacidade de manutenção da qualidade espermática durante a renovação do diluidor por um longo período de armazenamento.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Biotecnologia do Sêmen**

Com o advento das biotecnologias da reprodução, é possível, com grande eficiência, enriquecer e auxiliar no progresso genético das espécies, com consequente aumento da produtividade (NUNES, 2010). O sêmen pode ser processado de diferentes maneiras, podendo ser usado imediatamente após a coleta, puro ou diluído, refrigerado ou criopreservado. Mesmo quando utilizado puro, o ejaculado de um macho pode ser usado em um número relativamente elevado de fêmeas. A primeira gestação decorrente de inseminação artificial (I.A.) com sêmen canino preservado em leite pasteurizado e refrigerado por 7 dias foi descrita por Harrop em 1954 (CUNHA, 2002).

Depois de diluído, o sêmen pode ser conservado refrigerado a 4 °C para utilização em um curto período de tempo ou congelado a -196 °C em nitrogênio líquido por um período indeterminado, prolongando, assim, o seu uso (NUNES, 1988).

Especificamente nos cães, o estabelecimento de padrões seminais para a avaliação reprodutiva desta espécie tem se mostrado difícil, em função da grande variabilidade de raças e da existência de poucos estudos avaliando sistematicamente o ejaculado de um grande número de animais. Portanto, em termos qualitativos, só serão aceitos ejaculados que apresentarem motilidade espermática superior a 70%, vigor  $\geq 3$  (0 a 5) e, no máximo, 30% de espermatozoides com defeitos morfológicos. Em contrapartida, quando se estipulam os termos quantitativos, o volume, a quantidade de espermatozoides no ejaculado e a concentração espermática variam em função do porte do animal em até 10 vezes de um indivíduo para outro (THRELFALL, 2003). Segundo England et al (2010),

existem indícios de que a herdabilidade das características seminais em cães seja de média a baixa. Entretanto, fatores como idade e estado de saúde, associado ou não à exposição a drogas deletérias à reprodução, são considerados os principais contribuintes para a variabilidade dos ejaculados individuais dos cães.

### 2.1.1 Refrigeração

A refrigeração do sêmen tem por finalidade prolongar a capacidade fertilizante dos espermatozoides através da redução ou parada de sua motilidade e de suas reações metabólicas (MAXWELL e EVANS, 1990). É um processo de preservação do sêmen a uma temperatura de 5 °C, por um período determinado. Este procedimento é indicado quando o macho e a fêmea encontram-se em lugares distintos e de difícil acesso, ou nos casos de impedimento legal da entrada de animais em outro estado ou país, antes de um determinado período de observação (CUNHA, 1997; JOHNSTON et al., 2001).

O processamento de refrigeração do sêmen ocasiona danos letais e sub-letais a uma parcela de células espermáticas no ejaculado e, dependendo da velocidade de refrigeração, a extensão e a intensidade são maiores. Isto acontece devido ao choque térmico causado pelo frio, que determina alterações na conformação e na organização estrutural dos componentes das membranas dos espermatozoides, diminuindo prematuramente a motilidade e a produção de energia, a viabilidade, e, conseqüentemente, a fertilidade, além de aumentar a permeabilidade da membrana (ROY, 1957; IRITANI e NISHIKAWA, 1961; AMANN e PICKETT, 1987). Uma das principais medidas para evitar o choque térmico é a refrigeração gradual das células espermáticas, juntamente com a adição de fosfolipídios ao diluente (SALAMON e MAXWELL, 2000).

A membrana plasmática dos espermatozoides caninos apresenta uma baixa proporção de ácidos graxos poli-insaturados, em relação aos saturados (BOUCHARD et al., 1990). Esta característica confere ao espermatozoide canino uma resistência própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura. Entretanto, de acordo com Chirinéa et al. (2006), há relatos de que certas raças de cães apresentam células espermáticas com resistência maior ao processo de criopreservação do que outras. Estes autores explicam que este evento pode ser causado por diferenças genéticas na membrana celular dos espermatozoides, resultando numa variação na permeabilidade, com alterações no movimento de água e formação de gelo intracelular, ocasionando a morte celular.

Os principais componentes da membrana, os lipídios, estão à temperatura ambiente e em constante movimentação, tanto lateralmente na própria camada quanto transversalmente de camada para camada. Durante a refrigeração dos espermatozoides, esta movimentação diminui e os lipídios bioquimicamente semelhantes agrupam-se quando passam do estado líquido para o cristalino. Com isto, a organização estrutural da membrana é alterada, formando áreas de elevada permeabilidade (VALLE e SILVA FILHO, 2001). Conseqüentemente, com o aumento da permeabilidade da membrana a íons e água, pode ocorrer perda de importantes moléculas como ATP, ácidos nucleicos, fosfolipídios e enzimas, desequilibrando a composição iônica do meio intracelular. Outro entrave é o deslocamento de proteínas, que formam domínios com alta concentração proteica e estes podem interferir diretamente na sua função, como no caso de canais iônicos e receptores de membrana, aumentando, neste local, a permeabilidade da membrana e diminuindo sua função metabólica (AMANN e PICKETT, 1987; HOLT, 2000).

Outro componente, o colesterol, posiciona-se entre as cadeias lineares dos fosfolipídios e, dessa forma, pode modificar a interação entre eles, influenciando a fluidez da membrana, mas que, durante o resfriamento, age estabilizando os fosfolipídios e inibindo seu agrupamento, de forma que membranas com maior concentração de colesterol são mais resistentes a mudanças de temperatura (WATSON, 2000).

O espermatozoide canino apresenta em suas membranas baixa proporção de ácidos graxos poli-insaturados, o que explica em parte sua relativa resistência às alterações de temperatura (BOUCHARD et al., 1990). De fato, ele pode ser refrigerado a taxas relativamente altas, de até 0,5 °C/min, com bons resultados de motilidade e fertilidade, pós-reaquecimento. Entretanto, é importante salientar que variações individuais na composição da membrana espermática afetam de forma significativa a resistência do sêmen a processos de criopreservação, principalmente na espécie canina (MASCARENHAS, 2008; FARSTAD, 2009). Esta variação individual deve ser considerada como um fator que dificulta tanto a padronização das biotécnicas de criopreservação do sêmen quanto a estimativa da fertilidade em casos individuais (HOLT, 2000).

Uma alteração comumente associada à refrigeração dos espermatozoides é o acúmulo de cálcio. No entanto, é também um dos primeiros passos no processo fisiológico de capacitação espermática. Espermatozoides capacitados apresentam maior instabilidade de membranas, são mais sensíveis ao processo e demonstram maior tendência a exibir reação acrossomal espontânea (FLESCHE e GADELLA, 2000). Ainda, durante a refrigeração o acúmulo intracelular de cálcio pode resultar na ativação de fosfolipases citoplasmáticas, determinando danos diretos às membranas citoplasmáticas e mitocondriais, potencialmente letais à célula. As alterações associadas a este estado,

semelhante à capacitação, reduzem de forma significativa a longevidade espermática, sendo um dos fatores relacionados à menor fertilidade observada com a deposição intravaginal do sêmen (AMANN e PICKETT, 1987; ROTA et al., 1999; WATSON, 2000).

## 2.2 Diluidores

Os diluidores permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitando seu fracionamento em doses inseminantes e proporcionando um meio favorável para a sobrevivência dos espermatozoides *in vitro* (EVANS & MAXWELL, 1987). Os diluidores diferem em sua composição, dependendo da espécie animal, da origem do sêmen e da tecnologia seminal empregada (HOPKINS e EVANS, 1991; MOTA FILHO, 2009).

Entretanto, independente da espécie animal, um bom diluidor deve apresentar as seguintes características: ausência de toxicidade; osmolaridade igual ou próxima a do sêmen; pH favorável à espécie; bactericida; de preparação simples e de baixo custo. Além disso, deve conter substâncias nutritivas e crioprotetoras para assegurar a sobrevivência dos espermatozoides. Os crioprotetores mais comuns utilizados para a conservação das células espermáticas incluem glicerol, açúcares (lactose, rafinose, manose, sucrose), gema de ovo e proteínas lácteas (CARNEIRO, 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Os diluentes para conservação espermática devem possuir uma substância orgânica que atue como crioprotetor externo e que proteja as células contra o choque térmico que se produz ao resfriar o sêmen da temperatura de 20 °C aos 5 °C, tal como a gema de ovo ou leite desnatado; uma fonte de energia, como a glicose ou frutose; um componente tampão, como citrato de sódio ou Tris; um crioprotetor interno que proteja os espermatozoides durante a congelação, a exemplo do glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) ou etilenoglicol; e



antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano, como penicilina, estreptomicina ou gentamicina (EVANS e MAXWELL, 1987).

O sêmen devidamente diluído e congelado pode ser armazenado por tempo indeterminado, apresentando, potencialmente, sua capacidade fecundante quando reaquecido ou após a descongelação e utilizado na inseminação artificial (SILVA, 2007).

Os diluidores utilizados para o sêmen canino foram adaptados de outras espécies, sendo inicialmente empregadas substâncias à base de leite desnatado, lactose-gema, Citrato-gema e Tris-gema (ACIPRESTE, 2014). Hoje em dia, o diluente mais utilizado por diferentes grupos de pesquisa ainda permanece sendo o Tris (SILVA, 2007). Recentemente os pesquisadores estão utilizando diluidores à base de Tris e/ou citrato de sódio, adicionado de gema de ovo, açúcares (glicose, frutose, xilose ou trealose) e diferentes agentes crioprotetores (ACIPRESTE, 2014).

O Tris é uma substância solúvel em água, sendo disponibilizada no comércio com um alto grau de pureza, na forma de cristais. Permanecendo estável em temperatura ambiente por vários meses, o Tris atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (SILVA, 2007). Para compor o diluidor à base de Tris, um dos componentes é a frutose. Este açúcar possui ação crioprotetora que permite a sobrevivência dos espermatozoides e, aparentemente, o aumento de sua concentração no meio pode determinar melhores resultados pós-descongelação. O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico -  $C_6H_8O_7$ ) é uma substância inorgânica, sendo encontrado com facilidade nos frutos cítricos, e que também está presente na composição do diluente Tris. Provavelmente o ácido cítrico contribui para preservar a célula espermática, auxiliando na manutenção do pH do diluente e atuando como anti-oxidante, além de participar do mecanismo de respiração celular (SILVA et al., 2002).

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (MARQUES, 1982; NUNES e COMBARNOUS, 1995), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, proporcionando os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e a viabilidade de gametas masculinos e femininos (BLUME e MARQUES JR., 1997). Diluidores de sêmen à base de água de coco apresentam como vantagens o baixo custo, fácil preparo, além do fato do coco ser abundante na Região Nordeste do Brasil. Entretanto, a água de coco apresenta dificuldades para conservação por longos períodos após a extração do fruto, limitações na sua disponibilidade em regiões onde há a carência do vegetal, além de variações na constituição bioquímica da água de coco entre diferentes frutos. Isto motivou o desenvolvimento do produto água de coco em pó (ACP), onde os constituintes nutricionais da água de coco são obtidos em sistema de desidratação a alto vácuo. O produto ACP se caracteriza por possuir composição padronizada, obtido a partir de frutos oriundos de plantações orgânicas certificadas, além de possuir características bioquímicas similares às da água de coco *in natura* (SALGUEIRO et al., 2002). Ressalta-se, ainda, que a formulação do ACP-106<sup>®</sup> foi desenvolvida especificamente para a conservação do sêmen canino.

Até o momento não existe um consenso sobre o meio diluidor ideal para a conservação de sêmen canino. O primeiro diluidor empregado para refrigeração de sêmen canino foi o leite pasteurizado (HARROP, 1956). Desde então, várias tentativas foram feitas com diluidores à base de gema de ovo, leite e creme de leite (ROTA et al., 1995; ENGLAND e PONZIO, 1996). A maioria dos pesquisadores trabalha na adequação do meio diluidor à base de tampão Tris, ácido cítrico e gema de ovo, inicialmente descrito para conservação do sêmen bovino (PHILLIPS e LARDY, 1940; VISHWANATH e SHANNON, 2000).

## 2.3 Crioprotetores

Estas substâncias devem ser adicionadas ao diluente para que haja uma proteção da célula durante as técnicas de conservação espermática, como a refrigeração, a criopreservação e a descongelação (SQUIRES et al., 1999; ARRUDA, 2000). É importante ressaltar que um processo adequado de conservação do sêmen necessita que todas as etapas do processo aconteçam eficazmente (BITTENCOURT et al., 2013), visando evitar a formação de gelo intracelular (MEDEIROS et al., 2002).

A estrutura molecular dos crioprotetores é um parâmetro importante para determinar a eficiência destas substâncias. Estas, possuem afinidade pela água (H<sub>2</sub>O) devido a presença de grupamentos amina e hidroxila, os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio (BAUDOT et al., 2002). Estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (DALIMATA e GRAHAM, 1997). O protetor de refrigeração mais utilizado para criopreservação de espermatozoides de mamíferos é a gema de ovo (MOUSSA et al., 2002).

### 2.3.1 Gema de Ovo

A gema de ovo é um dos ingredientes fundamentais empregados no diluidor seminal e tem como principal função estabilizar as membranas biológicas, reduzindo os efeitos negativos do choque térmico (NEVES e HENRY, 2012), pois restauram os fosfolipídios perdidos durante o processo de refrigeração inicial do sêmen

(HAMMERSTEDT et al., 1990). Entretanto, o mecanismo pelo qual a gema de ovo protege os espermatozoides ainda não foi esclarecido (NEVES e HENRY, 2012). Em cães, além da gema de ovo de galinha, a de codorna, que é bastante rica em ácido ascórbico e outras vitaminas, também pode ser utilizada (MOURA, 2000). A gema de ovo é geralmente usada na concentração de 20% e vários dos seus componentes têm sido estudados para identificar o(s) componente(s) ativo(s) responsável(is) pelo efeito protetor (BARBOSA, 2007; MANJUNATH, 2012).

Acredita-se que a ação da gema de ovo seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando, com isso, a membrana do espermatozoide (MOUSSA et al., 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídios e, aparentemente, induzindo a alteração transitória de sua composição, consequentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolipídios que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen especificamente durante o processo de refrigeração a 5 °C (WILHELM et al., 1996).

A fração de fosfolipídio presente nas LDL protege os espermatozoides por formar uma película de proteção na sua superfície ou, ainda, através da modificação dos fosfolipídios presentes na membrana plasmática, que são perdidos ou danificados durante o processo de criopreservação (MANJUNATH, 2012). Numerosas pesquisas confirmaram que a utilização da LDL extraída da gema de ovo é eficaz na criopreservação do sêmen de suínos (HU et al., 2006; JIANG et al., 2007), bovinos (AMIRAT et al., 2004; AMIRAT-BRIAND et al., 2009; HU et al., 2010) e canídeos (BENCHARIF et al., 2008; VARELA JUNIOR et al., 2009). Segundo Hu et al. (2011), a substituição da gema de ovo pela LDL na composição do meio diluente foi benéfica para criopreservação do sêmen de touros.

Segundo estes autores, o meio diluente contendo LDL obteve maior proporção de espermatozoides móveis, acrossomas e membranas plasmáticas intactas após o processo de congelação/descongelação, quando comparados ao diluente contendo a gema de ovo *in natura*.

Em contrapartida, a utilização da gema de ovo também possui desvantagens. Às mesmas é atribuída a opacidade óptica, causada pelos grânulos formados que dificultam o exame imediato através da avaliação microscópica, além do prejuízo causado à respiração do espermatozoide, à motilidade e, ainda, podendo transportar microrganismos patogênicos (BOUSSEAU et al., 1998; MARTIN, 2005; BARBOSA, 2007). De acordo com Gil et al. (2003), o uso de aditivos de origem animal como gema de ovo na diluição de amostras de sêmen pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto, além de uma subsequente produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozoides (AIRES et al., 2003). Outro ponto de discussão em relação à gema de ovo é que a qualidade do sêmen congelado/descongelado é influenciada pela variabilidade individual do animal, devido ao número de dias após a postura e o período de armazenamento, o que torna difícil a análise em particular do efeito benéfico de um diluente à base de gema de ovo (FUKUI et al., 2008).

#### **2.4 *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller)**

A espécie foi primeiramente descrita por Carl Linnaeus em 1753 como *Aloe perfoliata* var. *vera*, e foi novamente descrita em 1768 por Nicolaas Laurens Burman como *Aloe vera* (NEWTON, 1979). Babosa é o nome popular incorporado a esta planta, de

origem africana, pertencente à família das Liliáceas e do gênero *Aloe*, da qual fazem parte a cebola, o nabo e os aspargos (MAURELLE et al., 1996; WHO, 1999; LORENZI e MATOS, 2008), onde pertencem mais de 300 espécies, muitas delas utilizadas em vários países, inclusive no Brasil, para fins medicinais e na área de cosméticos (HALLER, 1990; BACH e LOPES, 2007; GUERRA et al., 2008).

Dentre as espécies conhecidas, a *Aloe vera* é a mais estudada pelas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e fitoterápica, sendo conhecida como *Aloe barbadensis*, por crescer espontânea e fartamente na ilha de Barbados. As folhas são viscosas, pontiagudas e sua cor varia do cinza ao verde brilhante, passando pelo amarelo. Seu toque é suave, semelhante à borracha e o interior parece ser feito de geleia (VELLOSO e PEGLOW, 2003). Em uma planta já desenvolvida, a haste se eleva, geralmente, de 60 a 90 cm de comprimento e 10 cm de largura, podendo chegar a 1,4 a 2,3 Kg (LORENZI e MATOS, 2008). Sua suculência permite que a espécie sobreviva em áreas de baixa precipitação natural, tornando-a ideal para jardins e outros locais com baixa utilização de água (YATES, 2002). Entretanto, esta planta é intolerante a geadas muito pesadas ou neve (BBC GARDENING, 2014). Na parte interna das folhas é encontrado um tecido parenquimático rico em polissacarídeos (mucilagem), que confere uma consistência viscosa, originando seu nome, babosa (Figura 1). Nessa mucilagem ou gel encontram-se seus princípios ativos, que são constituídos de tecidos orgânicos, enzimas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos, dentre os quais 18 são extremamente importantes para o ser humano. Destes, sete aminoácidos pertencem ao grupo dos oito não sintetizados pelo organismo humano (BACH e LOPES, 2007; LORENZI e MATOS, 2008).



**Figura 1:** Folha da Babosa - *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) – Fonte: Arquivo Pessoal.

Devido às suas propriedades antifúngicas, a *Aloe vera* é usada como um condicionador de água do tanque de peixes. Para bactérias, o gel da folha *Aloe vera* foi comprovado como inibidor do crescimento de espécies de *Streptococcus* e *Shigella in vitro*. Em contraste, o extrato de *Aloe vera* não mostrou propriedades antibióticas contra espécies de *Xanthomonas* (SATISH et al., 1999). É interessante observar que estas propriedades só podem agir com eficiência graças à capacidade que a *Aloe vera* tem de penetrar nos tecidos, digerindo o tecido morto pela ação de suas enzimas e intensificando a proliferação normal das células (MATOS, 1998), reduzindo o sangramento através da ação coagulante, regenerando o tecido (VELLOSO e PEGLOW, 2003).

Em sua composição foram identificadas inúmeras substâncias. Entre elas estão os polissacarídeos contendo glicose, galactose e xilose, tanino, esteroides, ácidos orgânicos, substâncias antibióticas, enzimas de vários tipos, resíduos de açúcar, uma proteína com 18 aminoácidos, vitaminas, minerais, sulfato, ferro, cálcio, cobre, sódio, potássio, manganês e outras (VELLOSO e PEGLOW, 2003).

A vitamina C, encontrada em grande quantidade na *Aloe vera*, ajuda a manter a saúde dos vasos sanguíneos, promovendo com isso uma boa circulação. O potássio colabora para a manutenção do ritmo cardíaco, além de estimular as funções renais. O cálcio acelera a coagulação e a ativação das enzimas, sendo também responsável pelo controle dos movimentos cardíacos. O sódio, juntamente com o potássio, estabiliza o nível de hidratação do organismo. O manganês oferece condições para que as enzimas digestivas trabalhem com maior eficiência, impedindo a formação de cálculo renal. O ferro, juntamente com a hemoglobina, ajuda a transportar oxigênio para as células (MATOS, 1998).

Além desses componentes, a babosa possui um polissacarídeo chamado *Acemannan*, que, comprovadamente, é um excepcional imunestimulante, já comprovado nos Estados Unidos pela FDA. Na sua casca encontra-se a seiva, que é rica em aloína, alantoína e antraquinonas, excelentes substâncias cicatrizantes. No entanto, seu uso interno tem efeito catártico e para algumas pessoas pode afetar os rins, motivo pelo qual a casca da babosa ou sua seiva não devem ser usadas internamente (CREA, 1995).

No sêmen, alguns dos componentes desta planta são essenciais, dentre eles, a vitamina C, a catalase e a frutose, bastante utilizadas nos diluidores de conservação seminal. As duas primeiras são adicionadas ao diluidor por serem substâncias antioxidantes (WATSON, 2000), já que podem reduzir o estresse oxidativo durante o armazenamento e, assim, melhorar a qualidade dos espermatozoides armazenados (PASQUALOTTO et al., 2006; ALVARENGA et al., 2013; PERUMA et al., 2013). Por sua vez, a frutose, um açúcar, é também adicionada no diluidor já que é fundamental para a manutenção da motilidade e integridade no sêmen (EVANS e MAXWELL, 1987; PONGLOWHAPAN et al., 2004), uma vez que praticamente todas as reações que mantem o status funcional das



células, bem como aquelas relacionadas à sua resistência a exposição a ambientes e temperaturas não-fisiológicas, demandam consumo de energia (RIGAU et al., 2002; RODRIGUEZ-GIL, 2006).

Em 1988, Rodriguez et al. utilizaram o gel da *Aloe vera* na substituição do diluidor seminal para inseminação cervical e intrauterina em ovelhas. Já em 2006, foi utilizada a *Aloe vera* para congelação do sêmen ovino, onde os autores encontraram 70% de espermatozoides vivos com a adição de 40% da substância da planta ao diluidor e, após 90 dias de estocagem, a taxa de sobrevivência espermática atingiu 60%, após descongelação (GUTIÉRREZ et al., 2006). Trabalhos com refrigeração de sêmen de cães utilizando 5% do gel da *Aloe vera* também evidenciaram resultados satisfatórios na motilidade total durante as 48 horas de experimento (MELO et al, 2014). Em pesquisas realizadas por Melo (2010), com sêmen refrigerado de caprinos a 4 °C, foram observados valores semelhantes de motilidade total entre o diluidor à base de água de coco em pó ACP-101<sup>®</sup> utilizado isolado e o mesmo associado à *Aloe vera*. Entretanto, vale salientar que o diluidor isolado (ACP-101<sup>®</sup>) não tem a capacidade de manter os espermatozoides viáveis durante os processos de congelação/dcongelação.

No trabalho de Antunes et al. (2014), o tratamento que utilizou 5% de *Aloe vera* determinou porcentuais semelhantes ao controle, com 5 % de gema de ovo, ambos os tratamentos com ACP-101<sup>®</sup>. Segundo Brito et al. (2012), a *Aloe vera* não apresentou efeito deletério aos espermatozoides; não tendo sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos utilizando a *Aloe vera* como diluidor. Ainda que sem diferença significativa, as motilidades total e progressiva dos espermatozoides se mantiveram superiores, no tratamento com 10% de *Aloe vera*, quando incubados à temperatura de 37 °C por até 2h.

**Tabela 1a:** Composição da Babosa (*Aloe vera* – *Aloe barbadensis* Miller) – (BRASIL, 2014)

| <b>Vitaminas</b>                 | <b>Atuação</b>   |
|----------------------------------|--|
| <i>A (Beta Caroteno)</i>         | Visão, pele, ossos e contra anemia   |
| <i>B1 (Tiamina)</i>              | Crescimento dos tecidos e energia  |
| <i>B2 (Riboflavina)</i>          | Associada a vitamina B6, participa da produção de células sanguíneas   |
| <i>B3 (Niacina)</i>              | Participa da regulação do metabolismo  |
| <i>B6 (Piridoxina)</i>           | Associada a vitamina B12, participa da produção de células sanguíneas  |
| <i>B12 (Cianocobalamina)</i>     | Combate a anemia e problemas neuropatológicos  |
| <i>C (Ácido Ascórbico)</i>       | Combate às infecções e estimula o sistema imunológico  |
| <i>E (Tocoferol)</i>             | Juntamente com a vitamina C, combate as infecções  |
| <i>Ácido Fólico (Complexo B)</i> | Auxilia na formação do sangue  |
| <b>Minerais</b>                  | <b>Atuação</b>   |
| <i>Fosfato de Cálcio</i>         | Crescimento de dentes e ossos, alimento do sistema nervoso   |
| <i>Potássio</i>                  | Regula os fluidos do sangue e dos músculos, além dos batimentos cardíacos  |
| <i>Ferro</i>                     | Absorve o oxigênio para dentro dos glóbulos sanguíneos e aumenta a resistência às infecções  |
| <i>Sódio</i>                     | Juntamente com o potássio, regula os fluidos do corpo e transporta os aminoácidos e a glicose para dentro das células  |
| <i>Colina</i>                    | Um dos compostos da lecitina, indispensável ao metabolismo   |
| <i>Magnésio e Manganês</i>       | Preservam o sistema nervoso e os músculos  |
| <i>Cobre</i>                     | Participa da formação do sangue  |
| <i>Cromo</i>                     | Colabora no controle do nível de açúcar no sangue, do metabolismo, da glicose e da circulação  |
| <b>Mono e Polissacarídeos</b>    | <b>Atuação</b>   |
| <i>Acemannan</i>                 | Recentemente descoberto, tornou-se o maior foco da maioria das pesquisas sobre <i>Aloe vera</i> , vem sendo apontado como o maior responsável pela ação “milagrosa” da Aloe como agente contra doenças auto-imunes, câncer, AIDS, reumatismo, artrite, alergias. |
| <i>Celulose</i>                  |  |
| <i>Manose</i>                    |  |
| <i>Ácido Urônico</i>             |  |
| <i>Alínase</i>                   |  |
| <i>Glicose</i>                   |  |
| <i>L-raminose</i>                |  |
| <i>Aldopentose</i>               |  |

**Tabela 1b:** Composição da Babosa (*Aloe vera* – *Aloe barbadensis* Miller) – (BRASIL, 2014)

| <b>Aminoácidos Essenciais</b>   | <b>Atuação</b>  |
|---|---|
| <i>Valina, Leucina e Isoleucina (Aminoácidos de cadeia ramificada ou BCAAs (branched chain aminoacids))</i> | Contribuem consideravelmente para o aumento da resistência física, pois durante as atividades de longa duração são utilizados pelos músculos para o fornecimento de energia. Assim, o consumo de aminoácidos de cadeia ramificada diminui a degradação das proteínas corporais favorecendo a hipertrofia muscular |
| <i>Metionina e Lisina Fenilalanina e Treonina Triptofano Histidina</i>                                      | Funções cerebrais e exercem uma ação direta sobre as reações emocionais   |
| <b>Enzimas</b>  | <b>Atuação</b>  |
| <i>Brandiquinase</i>  | Analgésico, anti-inflamatório e estimulante do sistema imunológico  |
| <i>Catalase</i>   | Evita a acumulação de líquidos no corpo   |
| <i>Celulase</i>   | Ajuda a digerir a celulose  |
| <i>Creatina Fosfoquinase</i>  | Enzima Muscular   |
| <i>Proteolítase</i>   | Liquidifica as proteínas no seu interior  |
| <i>Fosfatase, Amilase e Nucleotidase</i>  |   |
| <i>Lipase</i>   |   |
| <b>Outras substâncias</b>   | <b>Atuação</b>  |
| <i>Ácidos Graxos</i>  | São os ácidos instaurados indispensáveis à saúde. Dentre esses, o ácido Caprílico é utilizado no tratamento de micoses  |
| <i>Lignina</i>  | Penetra facilmente na pele  |
| <i>Saponinas</i>  | São ao mesmo tempo depurativas e anti-sépticas  |
| <i>Antraquinonas</i>  | Analgésicas e laxativas   |
| <i>Aloína</i>   | Antibiótica e cartática   |
| <i>Isobarbaloína</i>  | Analgésica e antibiótica  |
| <i>Ácido Cinâmico</i>   | Germicida e fungicida   |
| <i>Óleo Etéreo</i>  | Tranquilizante  |
| <i>Ácido Crisofânico</i>  | Fungicida para a pele   |
| <i>Antranol e Resistanol</i>  |   |

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIPRESTE, A. C.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; COSTA, S. L.; SILVA, T. F.; BERETTA, D. C. Avaliação da eficácia de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 107-114, 2014.

AHMED, M. J.; SINGH, Z.; KHAN, A. S. Postharvest aloe vera gel- coating modulates fruits ripening and quality of ‘arctic snow’ nectarine kept in ambient and cold storage. **International Journal Food Science and Technology**, v. 44, p. 1024–1033, 2009.

AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.

ALVARENGA, M. L.; LOPES, B. V.; CHIRINÉA, V. H.; BITTENCOURT, R. F.; LOPES, M. D. Suplementação do meio de refrigeração espermática com vitamina C e catalase em sêmen obtido de cães jovens e idosos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 4, p. 673-682, 2013.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, L.J.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.

AMIRAT-BRIAND, L.; BENCHARIF, D.; VERA-MUNOZ, O.; BEL HADJ ALI, H.; DESTRUMELLE, S.; DESHERCES, S.; SCHMIDT, E.; ANTON, M.; TAINTURIER, D. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: preliminary results. **Theriogenology**, v. 71, p. 1209–1214, 2009.

ANDRADE, M. M. J. **Insulina e hipoglicemiantes orais**. In: Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária, São Paulo: Guanabara Koogan, p. 345-353, 2002.

ANTUNES, L. P.; BRITO, B. F.; RODRIGUES, F. R. N.; CATUNDA, A. G. V.; RIOS, R. S. Avaliação do sêmen ovino resfriado e diluído em ACP 101/102 adicionado de diferentes proporções de Aloes. **Acta Veterinária Brasília**, v. 8, Supl. 2, 2014.

AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E.; CATALANO, S.; ANDO, S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinology**, v. 146, p. 552-557, 2005.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos dos diluentes e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso da microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análise computadorizada da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo, 2000, 130f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2000.

BACH, D. B.; LOPES, M. A. Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (*aloe vera L.*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, 2007.

BARBOSA, C. C. **Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®): Efeito da temperatura de adição do glicerol e da adição de antibiótico**, 2007, p. 83. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M. L.; FAUSTO, R Thermal study of simple aminoalcohol solution, **Cryobiology**, v. 44, p. 150-160, 2002.

BBC GARDENING, "**Aloe vera**". British Broadcasting Corporation. Disponível em:[http://www.bbc.co.uk/gardening/plants/plant\\_finder/plant\\_pages/7686.shtml](http://www.bbc.co.uk/gardening/plants/plant_finder/plant_pages/7686.shtml) > Data de acesso: 12 de fevereiro de 2014.

BEAVER, B. V. **Comportamento Canino: Um guia para Veterinários**. Editora Roca, São Paulo, 1ª edição, 2001, 431p.

BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1478–1488, 2008.

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; FILHO, A. L. R.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, 2013.

BLUME, H.; MARQUES JR., A. P. V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 18, p. 97-104, 1997.

BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v. 34, p. 147-157, 1990.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, B.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.

BRASIL, A. V. F. **Brasil Aloe vera Forever**. Disponível em: <<http://www.nossosaopaulo.com.br/AloeVeraForever/>>, Data de acesso: 22 de julho de 2014.

BRITO, B. F.; MAIA FILHO, S. P. M.; FARIAS, P. P. Q.; CÂMARA, T. S.; AGUIAR, G. V.; NUNES, J. F. Viabilidade espermática do sêmen ovino resfriado à base de água de coco em pó (ACP-102<sup>®</sup>) adicionado de *Aloe vera* ou gema de ovo. **Ciência Animal**, v. 22, p. 509-512, 2012.

CARNEIRO, G. F. Transporte e criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl., n. 5, p. 37-41, 2002.

CHIRINÉA, V. H.; MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F.; TEBET, J. M.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, 2006.

CREA, P. **Aloe Sabila manual práctico y clínico: terapias e medicinas alternativas**. Buenos Aires: Continente, 1995, 128p.

CUNHA, I. C. N. **Criopreservação de sêmen de cães**. Botucatu, 2002. 124p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

CUNHA, I. C. N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina- gema**. Botucatu, 1997. 149p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841, 1997.

ENGLAND, G. C. W., PONZIO, P. Comparisons of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 165-171, 1996.

ENGLAND, G. C. W.; PHILLIPS, L.; FREEMAN, S. L. Heritability of semen characteristics in dogs. **Theriogenology**, v. 74, p. 1136-1140, 2010.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth, London, 1987, 194p.

FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – New challenges. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 336-341, 2009.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.



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

FOOTE, R.H.; PARKS, R.W. Factors effects preservation and fertility of bull sperm: a brief review. **Reproduction, Fertility & Development**, v. 5, p. 665-673, 1993.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender (AndromedR) in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, p. 286-289, 2008.

GIL, J. L.; NIELS, S. L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v. 59, p. 1241-1255, 2003.

GUERRA, M. F. L.; OLIVEIRA, R. A. G.; ARAÚJO, E. C. Spontaneous use in natura of aloe sp in persons afflictetec by conjunctivitis. **Revista de Enfermagem da UFPE**, v. 2, n. 1, p. 36-46, 2008.

GUTIÉRREZ, A. J.; COSME, R. W.; JIMÉNEZ, C. J. A.; RAMÍREZ, G. J. A. Agua de coco, suero fetal bovino, aloe vera y sus combinaciones para criopreservar semen ovino, **Archivos de Zootecnia**, v. 55, p. 101-104. 2006.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7<sup>a</sup> ed., Barueri: Manole, 2004, 513p.

HALLER, J.S. A drug for all seasons Medical and Pharmacological history of Aloe. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 66, n. 6, p. 647-59, 1990.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HARROP, A. E. Artificial insemination in dogs, first transatlantic conception. **British Veterinary Journal**, v. 112, p. 338-340, 1956.

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

HOPKINS, S. M.; EVANS, L. E. **Endocrinología Veterinaria y Reproducción**. 4 ed. Interamericana: México, 1991. 466p.

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

HU, J. H.; LI, Q. W.; JIANG, Z. L.; ZAN, L. S. ; AN, 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**, v. 117, p. 11–17, 2010.

HU, J. H.; LI, Q. W.; LI, G.; CHEN, X. Y.; YANG, H.; ZHANG, S. S.; WANG, L. Q. The cryoprotective effect on frozen–thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Journal of Animal Science**, v. 19, p. 486–494, 2006.

HU, Y.; XU, J.; HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 7788-7791. 2003.

IRITANI, A.; NISHIKAWA, A. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 10, p. 44-51, 1961.

JIANG, Z. L.; LI, Q. W.; LI, W. Y.; HU, J. H.; ZHAO, H. W.; ZHANG, S. S. Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing–thawing boar sperm by neutral comet assay. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 401–407, 2007.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and Feline Therigenology**, Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 592p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas**. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 244p.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 809-815, 2012.

MARPUDI, S. L.; ABBIRAMI, L. S. S.; PUSHKALA, R.; SRIVIDYA, N. Enhancement of storage life and quality maintenance of papaya fruits using *aloe vera* based antimicrobial coating. **Indian Journal Biotechnology**, v. 10, p. 83–89, 2011.

MARQUES, A. L. V. **Água de coco**. Informativo Soccego, nº 92, 1982.

MARTIN, C. E. G. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados**. 2005. 26f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

MASCARENHAS, R. M. **Avaliação individual e racial da qualidade do sêmen canino “in natura” e criopreservado em diferentes protocolos**. 2008. 69p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**. 3.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1998.

MAURELLE, J. A. F.; RODRIGUEZ, F. M.; GUITIERREZ, Z. P. Acción analgésica del extrato acuoso liofilizado de *Aloe vera* L. em ratones. **Revista Cubana Plantas Medicinails**, n. 2, p. 15-17, 1996.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Ed. Acribia, S.A., Madrid, 1990. 192p.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MELO, C. C. S. **Conservação de sêmen caprino a 4°C utilizando ACP-101® com duas concentrações de *Aloe vera* ou gema de ovo**, 2010, p. 72. Dissertação de Mestrado (Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

MELO, C. C. S.; OLIVEIRA, E. C. S.; RAMOS, R. P.; LIMA, C. F.; RODRIGUES, A. E. S.; GUERRA, M. M. P. Renovação do diluidor tris com gema de ovo ou *Aloe vera* sp. na viabilidade do sêmen canino refrigerado a 5°C – resultados preliminares. **Acta Veterinária Brasília**, v.8, Supl. 2, 2014.

MELO, C. C. S.; MELO, L. C. S.; CASTRO, E. V.; SANTOS, B. M. B.; OLIVIERA, E. C. S.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. *Aloe vera* sp. is an acceptable alternative to egg yolk for preserving goat semen at 4 °C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, suppl. 4, p. 433, 2012.

MILANI, C.; FONTBONNE, A.; SELLEM, E.; STELLETTA, C.; GERARD, O.; ROMAGNOLI, S. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2-

deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen, **Theriogenology**, v. 74, p. 153-64, 2010.

MORATO, R. G.; BARNABE, R. C. Biotécnicas de Reprodução Aplicadas à Preservação de Felídeos Selvagens. **Clínica Veterinária**, v. 12, p. 24-26, 1998.

MOTA FILHO, A. C. **Efeito da adição de dimetilformamida ao diluente ACP-106c sobre as características do sêmen canino congelado**. 2009, p. 105. Dissertação de Mestrado (Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, UECE.

MOURA, C. S. **Utilização de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen de cão**, 2000, p. 40. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

NEVES, M. M.; HENRY, M. Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 209-214, 2012.

NEWTON, L. E. Em defesa do nome Aloe vera. **O Cactus e Suculentas Oficial da Grã-Bretanha**, v.41, p.29-30, 1979.

NUNES, J. F. A inseminação artificial em caprinos no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 12, p. 85-91, 1988.

NUNES, J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução de pequenos ruminantes**. Fortaleza: Tecnograf, 2010. 208p.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluente do sêmen de mamíferos domésticos. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1995.

PASQUALOTTO, F. F.; PASQUALOTTO, E. B.; UMEZU, F. M.; SALVADOR, M. Atividades da superóxido-dismutase e catalase no sêmen de homens férteis e inférteis. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 130-134, 2006.

PERUMA, P.; CHAMUAH, J. K.; RAJKHOWA, C. Effect of catalase on the storage of mithum (*Bos frontalis*) semen. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 2, p. 209-2014, 2013.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal Dairy Science**, v. 23, p. 399-404, 1940.

PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen, **Theriogenology**, v. 62, p. 1498-1517, 2004.

RIGAU, T.; RIVERA, M.; PALOMO, M. J.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; MOGAS, T.; BALLESTER, J. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reproduction**, v. 123, p. 579-591, 2002.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review, **Theriogenology**, v. 64, p. 706-719, 2005.

RODRIGUEZ, F.; BALDASSARRE, H.; SIMONETTI, J.; ASTE, F.; RUTTLE, J. L. Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with Aloe vera gel, **Theriogenology**, v. 30, p. 843-854. 1988.

RODRIGUEZ-GIL, J.E. Mammalian sperm energy resources management and the survival during conservation in refrigeration. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41 (Suppl. 2), p.11-20, 2006.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v. 51, p. 1045-1058, 1999.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. **Theriogenology**, v. 44, p. 885-900, 1995.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. **Nature**, v. 159, p. 318-319, 1957.

SALAMON, S.; MAXWEEL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.L.P.; VIEIRA, V.L.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 96-98, 2002.

SAMPAIO NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilização do diluente ACP-105<sup>®</sup> na refrigeração do sêmen eqüino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 5, p. 137-139, 2002.

SARABIA, J. E. L.; CLARES, V. P. R.; CLARES, R. A. R.; HERNANDEZ, V. P. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante del ungüento rectal de *Aloe vera L.* **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, n. 3, p. 106-109, 1999.

SATISH, S.; RAVEESHA, K. A.; JANARDHANA, G. R. Atividade antibacteriana de extratos vegetais no patovares fitopatogênicos *Xanthomonas campestris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 145-147, 1999.

SILVA, A. R, CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 244-246, 2002.

SILVA, A. R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 119-127, 2007.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Principles of cryopreservation**. In: Cooled and frozen Stallion Semen, b09, 1999.

THRELFALL W. R. **Semen Collection and Evaluation**. In: ROOT KUSTRITZ M. V.: Small Anim. Theriogenology. Butterworth Heinemann, Missouri, 2003. p. 97-123.

VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M. Membrana plasmática do espermatozoide. **Caderno Técnico de Veterinária e Zooetecnia**, n. 36, p. 45-53, 2001.

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

VELLOSO, C. C.; PEGLOW, K. **Plantas Mediciniais**. Porto Alegre: EMATER/ RS – ASCAR, 2003. 83p.

VIGNINI, S. **A inteligência biológica numa visão quântica e sistêmica: apresentação de uma proposta terapêutica**. São Paulo: Scortecci, 2011, 168p.



VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

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

WHO, World Health Organization. **WHO Monographs on selected medicinal plants**. vol. 1. Geneva: WHO Publications. 1999.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, p. 320-329, 1996.

YATES, A. **Yates Garden Guide Paperback**. Harper Collins, Austrália, 2002, 100p.

## **4 EXPERIMENTOS**

**4.1 The replacement of diluents Tris-egg yolk and Tris-Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) extends the viability of canine semen storage at 5 °C?**

<sup>1,2</sup>Melo, C. C. S.; <sup>2</sup>Oliveira, E. C. S.; <sup>2</sup>Ramos, R. P.; <sup>2</sup>Lima, C. F.; <sup>2</sup>Rodrigues, A. E. S.;  
<sup>2</sup>Andrade, T. G. F.; <sup>2</sup>Neves, A. K. R.; <sup>3</sup>Esquerre, K. O.; <sup>2</sup>Silva, E. C. B.; <sup>1,2</sup>Guerra, M. M. P.

<sup>1</sup>Northeast Biotechnology Network - RENORBIO - Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife - PE – Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Andrology - ANDROLAB - Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE) – Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, - Recife - PE – Brazil; <sup>3</sup>Polytechnic School - Federal University of Bahia (UFBA) - Rua Professor Severo Pessoa, 31 – Federação - Salvador - BA – Brazil

**Corresponding author:** Maria Madalena Pessoa Guerra

**E-mail correspondence:** [mpguerra@dmv.ufrpe.br](mailto:mpguerra@dmv.ufrpe.br)

**Mailing address:** Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife – PE; Laboratory of Andrology – ANDROLAB; CEP: 52171-900

**Phone:** + 55 (81) 9925-4070

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of renewal of the Tris-based extender plus 20% egg yolk (G1 and G2 - control) or 5% *Aloe vera* (G3 and G4) on the quality of sperm cooled to 5 °C for a period of 96 hours. Five dogs were used from which semen samples were collected, diluted and chilled to 5 °C. The integrity of the sperm plasma membrane (iPM) and sperm kinetics were analyzed at 0, 48, 72 and 96 hours following cooling. Following analysis at 48 hours, all samples were centrifuged for 10 min (400 X g) in a refrigerated centrifuge (5 °C). G1 and G3 had their supernatant discarded and the pellet was resuspended in a new Tris-egg yolk or Tris-*Aloe vera* extender, respectively. For groups G2 and G4, the pellet was resuspended in the original supernatant (without renewal). The renewal of the extender did not influence any parameter that was analyzed, although in G1 it shown to have increased total (MOT; G1= 81.3 ± 1; 70.9 ± 2 e G2= 72.4 ± 1; 59.9 ± 3, 72h and 96h, respectively) and progressive (MOP; G1= 50.4 ± 14; 24.6 ± 14 e G2= 35.8 ± 5; 18.9 ± 14, 72h and 96 hours, respectively) motility patterns when compared to G2. Groups with Tris-*Aloe vera* (G3 and G4) had significant lower motility patterns than (p<0.05) groups with Tris-egg yolk (G1 and G2) and renewal of the extender (G3) showed to be deleterious on sperm cells in all parameters. It can, therefore, be concluded that renovation of the extender is not necessary for preserving canine spermatozoa stored at 5°C for 96 hours and *Aloe vera* can be used as cooling semen extender in this species.

**Keywords:** Renewal; *Aloe vera*; Semen; Dogs; Cooling.

## 1. Introduction

A critical step in the cryopreservation of semen, to prolong its life, is the dilution of that in an appropriate solution that preserves cell quality [1]. A good semen extender should provide nutrition to the sperm and protection against thermal shock during the cryopreservation process [2,3], for example, egg yolk that protect the sperm membrane, which is susceptible to thermal shock [4].

Despite the excellent protective action of egg yolk on sperm membrane during cryopreservation, egg yolk is an animal product and its use is restricted. Therefore, it is necessary to eliminate animal products from semen extenders [5,6,7] and discover alternative substances that provide effective protection to sperm. In this study, *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller), plant of the family *Liliaceae* [8] which has abundant distribution in tropical areas [9], has been investigated as a candidate to replace egg yolk.

*Aloe vera* has antioxidant [10,11,12], antimicrobial [13,14], cell protection and regeneration properties [15,16,17]. The rationale for considering *Aloe vera* as a dog semen cryoprotectant is because it contains key nutrients such as fructose and vitamins C and E [18,19,20], which are considered essential for the maintenance of sperm quality.

One of the most widely techniques used for maintaining sperm viability is semen cooling; when compared to freezing, it is less costly and the fertility of sperm is more preserved [21,22]. The disadvantage of cooled semen is the restriction of material storage, initially estimated to be 12-24h [23,24] and up to 48 hours [21,22,25].

Despite the reduced metabolic activity of sperm during cooling, the generation of reactive oxygen species (ROS) continues, which are harmful to sperm cells and their fertilizing capacity [26,27]. Therefore, it is important that semen extenders be identified for

protection of cooled sperm [25,28]. This issue becomes critical for insemination into dogs because it has been shown that two inseminations over a 2-4 day fertility period of the bitch improves fertility in this species [29]. Seeking alternatives to increase the longevity of cooled semen in this species, Verstegen et al., (2005) [25] showed that if the original semen extender was replaced with fresh extender after a long storage period, the motility of sperm improved. In light of this finding, the objective of the study was to examine the effectiveness of *Aloe vera* as a crioprotectant for colling canine semen at 5 °C and to assess its usefulness following renewal in a long term storage.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Approval of the ethics committee*

This study was approved by the Ethics Committee of Animal Use (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) under license number 038/2014 and 23082.004850/2014 file number.

### *2.2. Animals*

Five Basset Hound, aged between one and five years old and of proven fertility were used. The animals were kept in individual houses (according to their temperament) which were open every day so that they could have exercises and socialization; They were fed a balanced diet and had water ad libitum. All dogs underwent a complete breeding soundness examination and semen was collected by digital manipulation of the penis [23]. Ejaculates were evaluated for volume, color, appearance, concentration (Neubauer chamber; spz least  $10^6$ /ml), percentage of motile spermatozoa (0 to 100%) and vigour (0

to 5). Animals with sperm motility greater than 70%, vigour greater than or equal to 3, and 80% morphologically normal sperm were used.

### 2.3. Treatments

The extender used in this work was Tris base (3.605g Tris, 2.024g citric acid, 1.488g of fructose, 100 ml of ultrapure water, pH 7.2) plus 20% egg yolk (G1: samples were centrifuged and resuspended in a new extender; G2: samples were centrifuged and resuspended using the same extender) or 5% *Aloe vera* (G3: samples were centrifuged and resuspended in a new extender; G4: samples were centrifuged and resuspended using the same extender). To obtain the gel from *Aloe vera*, its rind outer layer was removed and the leaf parenchyma with respect colorless gel was extracted. The extracted gel was filtered using a sterile fine sieve, at room temperature and immediately used for formulating the extender.

### 2.4. Cooling procedure

After semen collection from each dog, the ejaculate was split into two aliquots and diluted in a ratio of 1/2 (semen: diluent) according to the experimental groups (Tris-egg yolk or Tris-*Aloe vera*). Then, each diluted semen sample was divided into two aliquots over a total of four samples: G1 and G2 diluted in Tris-egg yolk 20%; G3 and G4 diluted in Tris-*Aloe vera* 5%. Samples were placed in Falcon tubes and cooled to 5 °C, at an average rate of 0.3 °C temperature decrease/min. When the temperature reached 5 °C (after 2 hours), this time was considered time 0 (0h) and semen parameters were assessed. Subsequent analyzes were performed 48 hours later. To examine the effect of replacing the extender with fresh one, after 48 hours, aliquots from each group (G1, G2, G3 and G4) were taken and centrifuged for 10 min (400 X g) in a refrigerated centrifuge (5 °C). In

groups G1 and G3 supernatant was discarded and the pellet was resuspended in a new specific volume of extender (G1: Tris-yolk egg 20%; G3: Tris-*Aloe vera* 5%), that have been previously cooled (5 °C). In contrast, in G2 and G4, pellets were resuspended in the supernatant containing the original extender. Then, semen samples from all experimental groups were again stored at 5°C. After 72 and 96 hours, aliquots of semen samples from each experimental group were heated in a water bath (37°C for 1 min) and the replacement procedure repeated as described above. Samples were also evaluated for sperm kinetics using CASA and integrity of the plasma membrane.

### *2.5. Sperm kinetics evaluation*

The sperm kinetics were assessed using a Sperm Class Analyser<sup>®</sup> program (SCA<sup>®</sup>, Microptics SL, Barcelona, Spain). The analysis was performed after five minutes of heating the semen samples at 37°C and re-dilution (10 µl to 200 µl of semen extender each group). Aliquots (10 µl) of semen were deposited between slide and coverslip, which were pre-heated to 37 °C, and a minimum of 200 sperm per sample were captured in five fields under a phase contrast microscope (10x objective) and evaluated using the SCA software. The following measurements were obtained: percentage of motile spermatozoa (MOT), percentage of sperm with progressive movement (MOP), straight-line speed (VAP), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VSL), linearity (LIN), straightness (STR), lateral movement of head (ALH), oscillation index (WOB) and crossed beat (BCF).

### *2.6. Integrity of the Plasma Membrane*

A double staining method comprising carboxyfluorescein diacetate (DCF) and propidium iodide (PI) was used for the evaluation of the integrity of the plasma membrane [30]. Aliquots of 50µL semen were diluted in 150 µL Tris (3.605g Tris, 2.024g citric acid,



1.488g of fructose, 100 mL of distilled water; pH 6.8) containing 5  $\mu$ L DCF (0, 46 mg / ml in DMSO) and 20 $\mu$ L IP (0.5 mg / ml in PBS) and incubated for 10 minutes at 37°C and fixed with PBS containing 0.5% glutaraldehyde. A total of 200 spermatozoa was evaluated in an epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), with 400x magnification, using emission filter 580-630 nm BPD and BPD 485-520 nm excitation. Intact sperm membranes were green whereas damaged membranes were red.

### 2.7. Statistical Analysis

Mean and standard deviations were calculated and an Analyses of Variance was performed to compare sperm CASA data and the plasma membrane integrity between groups and over time. A significance level (p) of 5% [31] was used.

## 3. Results

All results of this study are presented in Table 1.

At 48h, MOT in G1 and G2 (Tris-egg yolk 20%) were higher ( $p < 0.05$ ) than in groups G3 and G4 (Tris-*Aloe vera* 5%). Following renewal of extender by centrifugation and redilution, at 72h and 96h evaluation, MOT in G3 group showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) when compared to the other groups (G1, G2 and G4).

Regardless of the renewal of the extender, samples diluted in Tris-egg yolk (G1 and G2) showed higher percentages of MOP ( $p < 0.05$ ) than groups diluted in Tris-*Aloe vera* (G3 and G4) in evaluation at 72h. However, at 96 hours, only MOP value from group G3 was significantly lower ( $p < 0.05$ ) when compared to groups G1 and G2. Total and progressive motility of spermatozoa from groups G3 and G4 were significantly decreased

( $p < 0.05$ ) after 48h of storage at 5°C. Progressive motility for spermatozoa from groups G1 and G2 were significantly reduced ( $p < 0.05$ ) at 96h compared to the other groups. On the other hand, sperm kinetics (VAP, VCL and VSL) showed differences between experimental groups. In treatments with Tris-*Aloe vera* (G3 and G4), values of VAP were lower ( $p < 0.05$ ) than the groups treated with Tris-egg yolk (G1 and G2), at 48 h of evaluation. However, at 96 h, spermatozoa from the G3 group were significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared to the other groups. When evaluating the parameters at time points during the storage at 5°C, it was observed that in G2 VAP was lower after 96 hours when compared to 0h ( $p < 0.05$ ) and G3 revealed lower values of VAP at 72 and 96 hours when compared to 0 and 48h ( $p < 0.05$ ).

Regarding VCL, G1 and G2 were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than G3 and G4 groups during the storage at 5°C (0 to 96h), as well as for VSL. When comparing VCL values along the evaluation times for each experimental group, it was observed that a decrease ( $p < 0.05$ ) in G3 at 48 hours and G4 at 48 and 96 hours evaluation when compared to 0h. In contrast, for VSL, values were lower ( $p < 0.05$ ) only after 96h in G2 when compared to 0 and 48h, while in G3 it was reduced ( $p < 0.05$ ) after 72 and 96 hours compared to 0h.

The analysis of LIN, STR, ALH, WOB and BCF revealed that G1 and G2 were better ( $p < 0.05$ ) than G3 and G4 at 48 hours of evaluation. Evaluations performed at 72 hours revealed that LIN, STR, ALH and BCF were higher for G1 and G2 ( $p < 0.05$ ) than for G3 and G4, while WOB values were higher ( $p < 0.05$ ) in G1 when compared to G3 and G4. After 96 hours of storage at 5°C, LIN was higher ( $p < 0.05$ ) in G1, G2 and G3 when compared to G4 and ALH and STR were higher ( $p < 0.05$ ) in G1 and G2 than in G3 and G4,

while WOB was higher ( $p<0.05$ ) in G1, G2 and G3 and BCF was higher in ( $p<0.05$ ) G1 than G3 and G4.

Storage at low temperatures contributed to the decrease in LIN ( $p<0.05$ ) in G2 in evaluation at 96 hours when compared to previous evaluations (48 and 72 hours) as well as G3, in evaluations at 72 and 96 hours. Regarding STR, values were lower in G3, in evaluations at 72 and 96 hours when compared to 0h. For ALH, it was reduced ( $p<0.05$ ) in G3 in evaluation performed after 48 hours of storage and, in G4, at 48 and 96 hours when compared to 0h. In turn, G3 values for WOB and BCF were lower ( $p<0.05$ ) at 72 and 96 hours of storage when compared to 0h, while in G2, BCF was reduced ( $p<0.05$ ) after 96 hours of storage when compared to previous evaluations (48 and 72 hours).

The analysis of plasma membrane integrity revealed lower percentages of viable cells in groups with Tris-*Aloe vera* (G3 and G4) than in groups with Tris-egg yolk (G1 and G2), from 72 hours of storage to the end of the experiment ( $p<0.05$ ). Furthermore, it was observed a decrease in the integrity of plasma membrane during storage at 5°C; percentage of cells with intact plasma membrane was lower ( $p<0.05$ ) in G1 in evaluation at 96 hours than in previous evaluations (48 and 72 hours), as well as in G3 and G4 in evaluation at 72 hours.

#### **4. Discussion**

The present study demonstrated that Tris-*Aloe vera* can be used as a protecting agent for dog semen cryopreservation at 5°C up to 48h, in place of egg yolk. These results show that *Aloe vera* was effective in maintaining the quality of colled semen from dogs. It is noteworthy that sperm motility after 96 hours of storage at 5°C in samples diluted in

Tris-*Aloe vera* extender (without renewal extender) was similar to samples that had been diluted in Tris-egg yolk extender, which supports the indication of *Aloe vera* as a substitute of egg yolk in crioextenders.

Renewal of extender did not show significant benefit regardless of the extenders used, contradicting the study of Verstegen et al., (2005) [25]. The replacement procedure did not maintain sperm quality of the samples cooled in Tris-*Aloe vera* (G3), since samples in this group revealed MOT and MOP values lower than values in group whose extender was not replaced, as well as, in groups preserved in Tris egg-yolk. In addition, there was a decrease in the linearity and straightness of spermatozoa in group G3, which did not occur in samples preserved in Tris-egg yolk (G1 and G2) or Tris-*Aloe vera* (G4), where the movement pattern of the sperm was maintained.

The results of this study suggests that the adaptation of sperm to the extender containing *Aloe vera* was slower, possibly due to the high viscosity derived from the mucilaginous gel of the plant. According to Marshall (1990) [32], the extract of *Aloe vera* has a high osmolarity, which may have affected the movement of sperm.

The centrifuge procedure during the procedures did not exert noticeable effects (beneficial or harmful), immediate or delayed, on the integrity of the plasma membrane of samples preserved in Tris-egg yolk (G1 and G2), as sperm from these groups remained similar following cooling for 96 hours. This can be explained by the fact that egg yolk contains low density lipoprotein (LDL) that protect the sperm membrane from heat shock [33], thereby suggesting that the replacement diluent was not necessary.

The ability of *Aloe vera* to increase cell permeability [15] may have contributed to the reduction of total and progressive motility observed in this study, since the effect of

*Aloe vera* on the membrane of sperm is not known. Another variable that may have caused the divergence of results after the use of this plant is the lack of standardization of the process. In the present study we used the mucilaginous gel, which can vary in composition depending on the form of planting, time of year, rainfall, climate and ground [34].

There are no reports in the literature on the use of *Aloe vera* in canine semen cryopreservation, or even on the concentration to be used in semen extenders formulation in this species. Rodriguez et al (1988) [35] evaluated ovine frozen semen with *Aloe vera* associated with egg yolk, which concentration used was 40 parts of the plant, and achieved excellent results, reaching 90% of motile cells after thawing.

Melo et al. (2012) [36] and Brito et al (2012) [37] included *Aloe vera* in the extender (ACP-101<sup>®</sup> and ACP-102<sup>®</sup>) during cooling (4 °C) of semen from sheep and goats, respectively, at the same concentration used in the present study (5%). In both studies, the replacement of egg yolk by *Aloe vera* was shown to be beneficial. However, Câmara et al. (2012) [38] didn't find beneficial results when froze ram semen using ACP-102<sup>®</sup> plus 20% of *Aloe vera*.

The concentrations and viscosity of *Aloe vera* used in this study for the preparation of the diluents were based upon the studies mentioned above. Since the gel extracted from *Aloe vera* has a high viscosity, then it is suggested that sperm be incubated in the gel for longer periods to allow the spermatozoa to adjust to its new environment.

The mechanisms involved in the increase in sperm motility associated with the renewal of the extender were not yet fully understood. However, it is possible that the renewal of the extender influences the physiology of cooled sperm, increasing the

availability of molecules such as sugars and lipoproteins, which are responsible for removing free radicals, enzymes and other catabolites and restore the pH.

The presence of suitable pH in both intracellular and in the extracellular environment is essential to maintain the longevity and vitality of the cells [39,40]. However, this characteristic did not apply to this study, since renewal of Tris-egg yolk (G1), did not change sperm parameters (kinetics and plasma membrane integrity), when compared to the group whose renewal of the extender was not performed (G2). Furthermore, renewal of Tris-*Aloe vera* extender contributed to cell death [41,42,43].

Based on the observations of this study, it can be concluded that the replacement of the extender is not necessary for preserving canine sperm at 5 °C for 48 hours. In addition, although Tris-*Aloe vera* was not better at preserving canine sperm in lower temperatures when compared to Tris-egg yolk, the maintenance of the quality of these cells for up to 48 hours of storage at 5 °C evidences an alternative membrane protector to be used in semen cooling processes of this species.

### **Acknowledgement**

This research was supported by the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco Foundation (FACEPE), the Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), the Higher Education Personnel Training Coordination (CAPES) and the National Council for Scientific and technology (CNPq).

### **References**

- [1] Salamon, S; Maxwell, WMC. Storage of ram semen. *Ani Reprod Sci*, 2000; 62: 77-111.
- [2] Squires, EL; Pickett, BW; Graham, JK. et al. Principles of cryopreservation. In: *Cooled and frozen Stallion Semen*, 1999, 9p.
- [3] Arruda, RP. Avaliação dos efeitos dos diluentes e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso da microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análise computadorizada da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). São Paulo, 2000, 130f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2000.
- [4] Witte, TS; Schöfer-Somi, S; Kuchar, A; Iben, C; Aurich, C. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Ani Reprod Sci*, 2009; 110: 293–305.
- [5] Bousseau, S; Brillard, JP; Marquant-Le Guienne, B. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 1998; 50: 699-706.
- [6] Sampaio Neto, JC; Salgueiro, CCM; Mateos-Rex, E; Nunes, JF. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 2002; 5: 137-139.
- [7] Pillet, E; Duchamp, G; Batellier, F. et al. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 2011; 75: 105–114.

- [8] Maurelle, JAF; Rodriguez, FM; Guitierrez, ZP. Acción analgésica del extrato acuoso liofilizado de *Aloe vera L.* em ratones. *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s, 1996; 2: 15-17.
- [9] Aro, AA; Nishan, U; Perez, MO. et al. Structural and biochemical alterations during the healing process of tendons treated with Aloe vera. *Life Sciences*, 2012; 91: 885–893.
- [10] Sarabia, JEL; Clares, VPR; Clares, RAR; Hernandez, VP. Actividad antiinflamatória y cicatrizante del ungüento rectal de *Aloe vera L.*. *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s, 199; 3: 106-109.
- [11] Zhang, ZT; Du, YJ; Liu, QG; Liu, Y. Dertermination of the antioxidative effect of Aloe vera. *National Production and Research Development*, 2001; 13: 45-46.
- [12] Dias, DMO; Silva, ARA; Macêdo, AAM. Atividade antioxidante in vitro do extrato etanólico do gel da aloe vera. In: VII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO (CONNEPI). Tocantins. 2012. Anais... Tocantins: 2012.
- [13] Saritha, V; Anilakumar, KR; Khanum, F. Antioxidant and antibacterial activity of aloe vera gel extracts. *Int J Pharm Biol Arch*, 2010; 1(4): 376–384.
- [14] Navarro, D; Diaz-Mula, HM; Guillen, F. et al. Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Bortrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with aloe vera gel alone or with the addition of thymol. *Int J Food Microbiol*, 2011; 151: 241–246.
- [15] Matos, FJA. *Farmácias Vivas*. 3 ed, Edições UFC, Fortaleza. 1998.



- [16] Ahmed, MJ; Singh, Z; Khan, AS. Postharvest aloe vera gel- coating modulates fruits ripening and quality of ‘arctic snow’ nectarine kept in ambient and cold storage. *Int J Food Sci Technol*, 2009; 44:1024–1033.
- [17] Marpudi, SL; Abbirami, LSS; Pushkala, R; Srividya, N. Enhancement of storage life and quality maintenance of papaya fruits using *aloe vera* based antimicrobial coating. *Indian J Biotechnol*, 2011; 10: 83–89.
- [18] Hu, Y; Xu, J; Hu, Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. *J Agr Food Chemist*, 2003; 51: 7788-7791.
- [19] Velloso, CC; Peglow, K. *Plantas Mediciniais*. Porto Alegre: EMATER/ RS – ASCAR, 2003.
- [20] Vignini, S. A inteligência biológica numa visão quântica e sistêmica: apresentação de uma proposta terapêutica. São Paulo: Scortecci, 2011, p. 111-114.
- [21] Ponglowhapan, S; Essén-Gustavsson, B; Linde-Forsberg, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen, *Theriogenology*, 2004; 62: 1498-1517.
- [22] Peña, FJ; Núñez-Martínez, I; Morán, JM. et al. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod Domest Ani*, 2006; Supp.12, 41: 21-29.
- [23] Linde-Forsberg, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Anim Pract*, 1991; 21: 467- 485.
- [24] Rota, A; Ström, B; Linde-Forsberg, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 1995; 44: 885-900.

- [25] Verstegen, JP; Onclin, K; Iguer-Ouada, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: *In vitro* an in vivo studies. *Theriogenology*, 2005; 64:720-733.
- [26] Aboagla, EM; Terada, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 2004; 62: 1160–1172.
- [27] Silva, A. R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2007; 31: 119-127.
- [28] Nizanski, W, Klimowicz, M, Partyka, A, et al. Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 °C. *Reprod Domest Ani*, 2009; 44: 363-365.
- [29] Linde-Forsberg, C. Intra-uterine insemination in the dog using the scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. In.: Concannon, PW; England, G; Verstegen, J. *Rec. Adv. S. Anim Reprod* Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001.
- [30] Silva, ECB; Cajueiro, JFP; Silva, SV; Soares, PC; Guerra, MMP. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 2012; 77: 1722-1726.
- [31] Sampaio, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.
- [32] Marshall, JM. Aloe vera gel: whats is the evidence? *The Pharmaceutical Journal*, 1990; 244: 360-362.

- [33] Manjunath, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod*, 2012; 9: 809-815.
- [34] Correa Júnior, C; Ming, LC; Scheffer, MC. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Curitiba: SEAB-EMATER-PR, 1991, 150p.
- [35] Rodriguez, F; Baldassarre, H; Simonetti, J; Aste, F.; Ruttle, JL. Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with Aloe vera gel. *Theriogenology*, 1988; 30: 843-854.
- [36] Melo, CCS; Melo, LCS; Castro, EV. et al. *Aloe vera sp.* is an acceptable alternative to egg yolk for preserving goat semen at 4 °C. *Reprod Domest Anim*, 2012; 47: 433.
- [37] Brito, BF; Maia Filho, SPM; Farias, PPQ. et al. Viabilidade espermática do sêmen ovino resfriado à base de água de coco em pó (ACP-102<sup>®</sup>) adicionado de *Aloe vera* ou gema de ovo. *Ciência Animal (UECE)*, 2012; 22: 509-512.
- [38] Câmara, TS; Bandeira, NC; Fernandes, JS. et al. Avaliação do efeito crioprotetor da *Aloe vera* no congelamento do sêmen ovino. *Ciência Animal (UECE)*, 2012; 22: 319-522.
- [39] Oliveira, ECS. Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino. 2003, 61p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- [40] Purdy, PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res*, 2006; 63: 215-225.
- [41] Rijseelaere, T; Van Soom, A; Maes, D. et al. Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, 2002; 57: 1669-1681.

[42] Aurich, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Ani Reprod Sci*, 2005; 89: 65-75.

[43] Matás, C; Decuadro, G; Martínez-Miró, S. et al. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology*, 2007; 67: 1087–1091.

**Table 1.** Means and standard deviations of the kinetic parameters and plasma membrane integrity of sperm refrigerated (5°C) dogs evaluated before (0 to 48 hours) and after centrifugation (72 and 96h), with or without renewal extender

| Parameters | Groups | Time of evaluation (hours) |                            |                             |                            |
|------------|--------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|            |        | 0                          | 48                         | 72                          | 96                         |
| MOT (%)    | G1     | 90 ± 5                     | 83.5 ± 1 <sup>a</sup>      | 81.3 ± 1 <sup>a</sup>       | 70.9 ± 2 <sup>a</sup>      |
|            | G2     | 90 ± 5                     | 83.5 ± 1 <sup>a</sup>      | 72.4 ± 1 <sup>a</sup>       | 59.6 ± 3 <sup>a</sup>      |
|            | G3     | 78.1 ± 1 <sup>A</sup>      | 42.8 ± 2 <sup>bB</sup>     | 10.5 ± 1 <sup>bC</sup>      | 5.8 ± 1 <sup>bC</sup>      |
|            | G4     | 78.1 ± 1 <sup>A</sup>      | 42.8 ± 2 <sup>bB</sup>     | 50.8 ± 1 <sup>aB</sup>      | 45.1 ± 1 <sup>aB</sup>     |
| MOP (%)    | G1     | 51.2 ± 5 <sup>aA</sup>     | 40.9 ± 7 <sup>aA</sup>     | 50.4 ± 14 <sup>aA</sup>     | 24.6 ± 14 <sup>aB</sup>    |
|            | G2     | 51.2 ± 5 <sup>aA</sup>     | 40.9 ± 7 <sup>aA</sup>     | 35.8 ± 5 <sup>aA</sup>      | 18.9 ± 14 <sup>aB</sup>    |
|            | G3     | 26.5 ± 14 <sup>bA</sup>    | 7.3 ± 5 <sup>bB</sup>      | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>     | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>    |
|            | G4     | 26.5 ± 14 <sup>bA</sup>    | 7.3 ± 5 <sup>bB</sup>      | 9.2 ± 7 <sup>bB</sup>       | 11.3 ± 15 <sup>abB</sup>   |
| VAP (µm/s) | G1     | 112.4 ± 2.3 <sup>a</sup>   | 98.8 ± 25.9 <sup>a</sup>   | 106.6 ± 5.8 <sup>a</sup>    | 96.3 ± 36.7 <sup>a</sup>   |
|            | G2     | 112.4 ± 2.3 <sup>aA</sup>  | 98.8 ± 25.9 <sup>aAB</sup> | 90.6 ± 24.1 <sup>aAB</sup>  | 62.4 ± 42.6 <sup>abB</sup> |
|            | G3     | 72.7 ± 41.9 <sup>aA</sup>  | 23.7 ± 21.1 <sup>bA</sup>  | 2.06 ± 4.6 <sup>bB</sup>    | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>    |
|            | G4     | 72.7 ± 41.9 <sup>a</sup>   | 23.7 ± 21.1 <sup>b</sup>   | 34.7 ± 23.9 <sup>b</sup>    | 28.6 ± 29.9 <sup>bc</sup>  |
| VCL (µm/s) | G1     | 144.5 ± 12.2 <sup>a</sup>  | 125.2 ± 36.4 <sup>a</sup>  | 149.9 ± 16 <sup>a</sup>     | 132.8 ± 52.2 <sup>a</sup>  |
|            | G2     | 144.5 ± 12.2 <sup>a</sup>  | 125.2 ± 36.4 <sup>a</sup>  | 128.9 ± 38.6 <sup>a</sup>   | 92.8 ± 62.6 <sup>a</sup>   |
|            | G3     | 110.4 ± 63.5 <sup>ba</sup> | 32.1 ± 27.9 <sup>bB</sup>  | 3.53 ± 7.9 <sup>bB</sup>    | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>    |
|            | G4     | 110.4 ± 63.5 <sup>ba</sup> | 32.1 ± 27.9 <sup>bB</sup>  | 51.3 ± 35.5 <sup>baBC</sup> | 41 ± 43.5 <sup>bC</sup>    |
| VSL (µm/s) | G1     | 95.3 ± 6.2                 | 89.4 ± 22.4 <sup>a</sup>   | 95.2 ± 1.8 <sup>a</sup>     | 67.3 ± 25.2 <sup>a</sup>   |
|            | G2     | 95.3 ± 6.2 <sup>A</sup>    | 89.4 ± 22.4 <sup>aA</sup>  | 80.7 ± 20.2 <sup>aAB</sup>  | 48.6 ± 36.6 <sup>abB</sup> |
|            | G3     | 58.4 ± 33.3 <sup>A</sup>   | 15.6 ± 19.9 <sup>bAB</sup> | 1.8 ± 3.9 <sup>bB</sup>     | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>    |
|            | G4     | 58.4 ± 33.3                | 15.6 ± 19.9 <sup>b</sup>   | 28.4 ± 20.7 <sup>b</sup>    | 23.4 ± 24.6 <sup>b</sup>   |
| LIN (%)    | G1     | 67.9 ± 8                   | 64.9 ± 13.3 <sup>a</sup>   | 64.1 ± 6.8 <sup>a</sup>     | 46.1 ± 9.1 <sup>a</sup>    |
|            | G2     | 67.9 ± 8 <sup>A</sup>      | 64.9 ± 13.3 <sup>aA</sup>  | 56.5 ± 10.6 <sup>aA</sup>   | 35.4 ± 24.6 <sup>abB</sup> |
|            | G3     | 43.4 ± 24.5 <sup>A</sup>   | 21.8 ± 15.6 <sup>bA</sup>  | 5.0 ± 11.2 <sup>bB</sup>    | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>    |
|            | G4     | 43.4 ± 24.5                | 21.8 ± 15.6 <sup>b</sup>   | 27.3 ± 20.9 <sup>b</sup>    | 29.6 ± 21.2 <sup>a</sup>   |
| STR (%)    | G1     | 84.9 ± 4.9                 | 81.5 ± 19.4 <sup>a</sup>   | 89.4 ± 3.7 <sup>a</sup>     | 63.7 ± 14.8 <sup>a</sup>   |
|            | G2     | 84.9 ± 4.9                 | 81.5 ± 19.4 <sup>a</sup>   | 80.1 ± 18.9 <sup>a</sup>    | 53.2 ± 37.8 <sup>a</sup>   |
|            | G3     | 64.3 ± 36.3 <sup>A</sup>   | 30.1 ± 22.3 <sup>bAB</sup> | 8.6 ± 19.3 <sup>bB</sup>    | 7.7 ± 17.3 <sup>bB</sup>   |
|            | G4     | 64.3 ± 36.3                | 30.1 ± 22.3 <sup>b</sup>   | 40.0 ± 29.3 <sup>b</sup>    | 40.7 ± 28.7 <sup>b</sup>   |
| ALH (µm)   | G1     | 3.8 ± 0.6                  | 3.9 ± 1.3 <sup>a</sup>     | 5.0 ± 0.8 <sup>a</sup>      | 4.9 ± 1.9 <sup>a</sup>     |
|            | G2     | 3.8 ± 0.6                  | 3.9 ± 1.3 <sup>a</sup>     | 4.2 ± 1.5 <sup>a</sup>      | 3.2 ± 2.3 <sup>a</sup>     |
|            | G3     | 3.7 ± 2.1 <sup>A</sup>     | 0.9 ± 1.1 <sup>bB</sup>    | 0.1 ± 0.3 <sup>bB</sup>     | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>    |
|            | G4     | 3.7 ± 2.1 <sup>A</sup>     | 0.9 ± 1.1 <sup>bB</sup>    | 1.8 ± 1.3 <sup>baAB</sup>   | 1.3 ± 1.6 <sup>baAB</sup>  |
| WOB (%)    | G1     | 79.2 ± 5.8                 | 71.5 ± 15.6 <sup>a</sup>   | 71.5 ± 4.9 <sup>a</sup>     | 65.6 ± 15.8 <sup>a</sup>   |
|            | G2     | 79.2 ± 5.8                 | 71.5 ± 15.6 <sup>a</sup>   | 63.5 ± 12.8 <sup>ab</sup>   | 47.0 ± 30.2 <sup>a</sup>   |
|            | G3     | 52.9 ± 29.7 <sup>A</sup>   | 29.4 ± 16.7 <sup>baB</sup> | 5.8 ± 13.0 <sup>bB</sup>    | 7.9 ± 15.8 <sup>bB</sup>   |
|            | G4     | 52.9 ± 29.7                | 29.4 ± 16.7 <sup>b</sup>   | 33.9 ± 25.2 <sup>bc</sup>   | 36.2 ± 25.7 <sup>ab</sup>  |
| BCF (Hz)   | G1     | 10.9 ± 1.5                 | 10.9 ± 2.9 <sup>a</sup>    | 12.2 ± 0.7 <sup>a</sup>     | 8.4 ± 3.5 <sup>a</sup>     |
|            | G2     | 10.9 ± 1.5 <sup>A</sup>    | 10.9 ± 2.9 <sup>aA</sup>   | 10.9 ± 3.6 <sup>aA</sup>    | 6.0 ± 4.4 <sup>abB</sup>   |
|            | G3     | 6.8 ± 3.8 <sup>A</sup>     | 2.2 ± 2.4 <sup>baB</sup>   | 0.2 ± 0.3 <sup>bB</sup>     | 0.0 ± 0.0 <sup>bB</sup>    |
|            | G4     | 6.8 ± 3.8                  | 2.2 ± 2.4 <sup>b</sup>     | 3.3 ± 2.7 <sup>b</sup>      | 2.3 ± 3.2 <sup>bc</sup>    |
| iMP (%)    | G1     | 72.2 ± 5 <sup>A</sup>      | 67.8 ± 9 <sup>A</sup>      | 77.0 ± 3 <sup>aA</sup>      | 52.0 ± 1 <sup>abB</sup>    |
|            | G2     | 72.2 ± 5                   | 67.8 ± 9                   | 72.7 ± 3 <sup>a</sup>       | 58.5 ± 1 <sup>a</sup>      |
|            | G3     | 70.4 ± 5 <sup>A</sup>      | 55.3 ± 2 <sup>A</sup>      | 41.8 ± 1 <sup>bB</sup>      | 29.1 ± 1 <sup>bB</sup>     |
|            | G4     | 70.4 ± 5 <sup>A</sup>      | 55.3 ± 2 <sup>A</sup>      | 38.2 ± 1 <sup>bB</sup>      | 38.1 ± 9 <sup>bB</sup>     |

Different capital letters in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ). Different small letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ). G1: Tris + 20% egg yolk (renewal); G2: Tris + 20% egg yolk (without renewal); G3: Tris + 5% Aloe vera (renewal); G4: Tris + + 5% *Aloe vera* (without renewal). MOT: Percentage of mobile spermatozoa; MOP: Percentage sperm with progressive movement; VAP: Speed straight; VCL: Speed curvilinear; VSL: Average speed of the route; LIN: Linearity; STR: straightness; ALH: lateral movement of the head; WOB: Oscillation Index; BCF: Beat crossed; iMP: Percentage with sperm plasma membrane intact.

## 4.2 Efeito do gel mucilaginoso da *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) na viabilidade do sêmen refrigerado canino

Cibele Cavalcanti Souza de Melo<sup>a</sup>; Cecília Freire de Lima<sup>a</sup>; Erika Christina Santos Oliveira<sup>a</sup>; Rebeca Pinto Ramos<sup>a</sup>; Ellen Cordeiro Bento da Silva<sup>a</sup>; Renata Gomes Revorêdo<sup>b</sup>; Júnior Mário Baltazar de Oliveira<sup>b</sup>; Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Recife – PE – Brasil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Recife – PE – Brasil.

ceciliafreirelima@gmail.com; eco21@uol.com.br; rebeca.ramos139@gmail.com;  
silva.ecb@gmail.com; revoredorgvet@hotmail.com; jrmariovet@yahoo.com.br;  
mpguerra@dmv.ufrpe.br

**Autor para correspondência:** Maria Madalena Pessoa Guerra

**E-mail para correspondência:** mpguerra@dmv.ufrpe.br

**Endereço para correspondência:** Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil. Laboratório de Andrologia - ANDROLAB - UFRPE; CEP: 52171-900.

**Fone/fax:** (081) 3302 60 51

### Resumo

O uso de produtos de origem animal nos diluidores para a criopreservação de sêmen representa um risco em termos de contaminação e/ou transmissão de doenças, o que

marca a necessidade de substituição dos mesmos na composição destas formulações. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do gel da *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) associado aos diluidores Tris ou Água de coco em pó (ACP-106®) na viabilidade do sêmen refrigerado de cães, por um período de 72 horas, como alternativa à substituição da gema de ovo. Para isto, foram colhidas amostras seminais de cinco cães, Basset Hound, a cada 48 horas, totalizando 15 ejaculados, os quais foram avaliados e, posteriormente divididos em alíquotas iguais, de acordo com os grupos experimentais (G1: Tris + 20% gema de ovo (controle); G2: Tris + 5% *Aloe vera*; G3: ACP-106 + 5% *Aloe vera*), e refrigerados. Após refrigeração, as amostras de sêmen foram reaquecidas e avaliadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h quanto a cinética e integridade de membrana plasmática. Não foram encontradas diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ) para os parâmetros de motilidade total, retilinearidade, índice de oscilação e integridade de membrana plasmática entre os grupos experimentais, independentemente do tempo de avaliação. A motilidade progressiva do G1 foi superior ( $P < 0.05$ ) a do G2 nos tempos 0, 24 e 48 h, bem como a do G3 nos tempos 0, 48 e 72 h. A linearidade do G3 foi superior ( $P < 0.05$ ) a dos demais grupos em todos os tempos de avaliação. Com base nestes achados, pode-se concluir que a *Aloe vera* pode ser utilizada na concentração de 5% em substituição à gema de ovo no diluidor de refrigeração de sêmen de cães.

**Palavras-chave:** Água de coco em pó; *Aloe vera*; Refrigeração; Espermatozoides; Sêmen de cães.

## **Introdução**

A colheita, o armazenamento e o transporte do sêmen canino, por meio da tecnologia do sêmen refrigerado [25,38], permite atender a necessidades preconizadas

pelos criadores de cães [31]. Estas técnicas possibilitam o uso de material genético de reprodutores geneticamente superiores [14], sem que para isso seja necessário o transporte de animais e a nem interferência em seu habitat [1,26].

Uma notável vantagem do processo de refrigeração é a manutenção da viabilidade do sêmen por no mínimo 48 horas, possibilitando sua distribuição para qualquer destino [28]. Alguns dos diluidores seminais de destaque neste processo são aqueles a base de Tris (hidroximetil aminometano) e de Água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>) [7,39,46]. Na composição destes meios é necessário que outros constituintes estejam presentes, como a frutose [11] e a gema de ovo [15,27]. Isso é preciso para que a qualidade dos espermatozoides seja mantida [9,16], uma vez que os diluidores com os componentes base apenas, não têm a capacidade de manter as células viáveis durante o processo de refrigeração [42].

Além disso, em virtude dos riscos sanitários, é preconizada a substituição da gema de ovo, por ser de origem animal, por uma substância, uma molécula ou outro produto que, ao interagir com as células espermáticas promova a manutenção da sua viabilidade de forma semelhante ou superior [5,36]. Uma alternativa para isto é a *Aloe vera* (*Aloe barbadensis Miller*), planta da família das Liláceas, encontrada em larga escala em vários lugares do mundo [22,32]. Na composição deste vegetal estão presentes vitaminas (C e E), açúcares (frutose) e enzimas (Catalase) [4,18,37,45] os quais podem favorecer a nutrição das células espermáticas e a manutenção da sua viabilidade.

Com base no exposto, objetivou-se avaliar o efeito da utilização do gel da *Aloe vera* (*Aloe barbadensis Miller*) associado aos diluidores Tris ou Água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>) sobre a viabilidade do sêmen canino refrigerado (5 °C) por um período de 72 h, como uma alternativa à gema de ovo.



## Material e Métodos

Para realização do trabalho, o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sob número de licença 038/2014 e número de processo 23082.004850/2014.

### Animais

Foram utilizados cinco cães, da raça Basset Hound, com idade entre cinco e sete anos, pertencentes a um canil particular. Três ejaculados de cada animal foram coletados pelo método de manipulação digital do pênis a cada 48 horas, totalizando 15 ejaculados [20], os quais foram imediatamente analisados em microscópio óptico. Apenas as amostras com  $\geq 70\%$  de motilidade total (0-100%), vigor  $\geq 3$  (0-5) e 80% de espermatozoides morfolologicamente normais foram utilizadas para o estudo.

### Preparação dos diluidores

Os diluidores utilizados foram à base de tampão Tris (3,028g de Tris, 1,75g de ácido cítrico monohidrato e 1,25g de D-frutose, diluídos em 100 mL de água purificada) e Água de coco em pó (ACP-106<sup>®</sup>) diluída em 50 mL de água destilada, de acordo com as recomendações do fabricante. A gema de ovo foi preconizada como o grupo controle em associação a solução Tris (G1: Tris + 20% de gema de ovo) e o gel da *Aloe vera* como grupos tratamento (G2: Tris + 5% de *Aloe vera*; G3: ACP-106<sup>®</sup>+ 5% *Aloe vera*; G4: ACP-106<sup>®</sup>+ 20% gema de ovo). Para a extração do gel da *Aloe vera*, foram retiradas as partes mais externas da folha e a parte mucilaginosa foi recuperada, triturada e filtrada. A correção do pH dos diluidores foi realizada com solução de carbonato de sódio (NaCO<sub>3</sub>), enquanto que a correção da osmolaridade foi feita com acréscimo de água destilada.

## **Refrigeração**

O ejaculado foi fracionado e diluído em três alíquotas na proporção de 1/2 (sêmen:diluidor), de acordo com os grupos experimentais. Estas amostras foram acondicionadas em tubos *falcon* e refrigeradas em geladeira, previamente estabilizada à temperatura de 5 °C. O tempo médio da curva de refrigeração foi de 2 horas, com média de decréscimo de temperatura de 0,3°C/ min. Ao final deste período, as amostras de sêmen foram avaliadas, tendo este, considerado o momento 0 (0h).

## **Análises Espermáticas**

Para as avaliações das amostras de sêmen submetidas à refrigeração, uma alíquota de 100µl de cada grupo foi aquecida em banho-maria (37 °C/ 1 min) e analisadas quanto a cinética espermática e integridade de membrana plasmática, conforme descrito abaixo. As avaliações foram realizadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas após a refrigeração.

### *Cinética Espermática*

Uma lâmina contendo 10 µl da amostra foi acoplada ao microscópio de contraste de fase (Nikon<sup>TM</sup> H5505, Eclipse 50i, Japão) e as imagens foram capturadas por uma vídeo-câmera (Basler Vision Technologie<sup>TM</sup> A312FC, Ahrensbug, Alemanha). A cinética espermática foi avaliada com auxílio do programa *Sperm Class Analyser*<sup>®</sup> (SCA<sup>®</sup>, Microptics S.L, Barcelona, Espanha), fornecendo os seguintes parâmetros: percentual de espermatozoides móveis (MOT), percentual de espermatozoides com movimento progressivo (MOP), velocidade média do percurso (VAP - µm/s), velocidade curvilínea (VCL - µm/s), velocidade em linha reta (VSL - µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral da cabeça (ALH - µm), índice de oscilação (WOB - %) e batimento cruzado (BCF - Hz).

### Integridade de Membrana Plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática (iMP), alíquotas de 50 µl de sêmen foram adicionadas à solução contendo 150 µL de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose; 100 mL de água destilada; pH 6,8), 5 µL de Diacetato de Carboxifluoresceína (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de Iodeto de Propídio (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído, descrito por Silva e Guerra (2012) [41] e Betancur et al (2013) [3]. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). As células espermáticas foram classificadas segundo a coloração apresentada em: membrana intacta, quando as células apresentavam-se coradas em verde, e com membrana danificada, quando coradas em vermelho.

### **Análise Estatística**

Os dados foram apresentados considerando-se média e desvios-padrão. Análises de variância foram feitas para comparar os dados de cinética espermática e integridade de membrana plasmática entre os grupos e ao longo do tempo. Para as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (P) de 5% [23].

### **Resultados**

Na primeira avaliação dos grupos o G4 foi descartado do experimento, pois demonstrou impossibilidade de ser avaliado.

Os parâmetros de MOT (Tabela 1), STR e WOB (Tabela 3), bem como de integridade de membrana plasmática (Tabela 1) não demonstraram diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre os grupos experimentais, em nenhum dos tempos de avaliação

(0, 24, 48 e 72 h). No entanto, nos períodos de 0h e 48h de refrigeração, os percentuais de MOP foram significativamente superiores ( $P<0.05$ ) no grupo Tris-gema de ovo (G1) do que naqueles que tiveram o gel da *Aloe vera* (G2 e G3) como crioprotetor. Em contrapartida, às 24h a MOP foi maior ( $P<0.05$ ) no G1 do que no G2 e às 72h no G1 em relação ao G3 (Tabela 1).

Os valores das velocidades espermáticas estão expostos da Tabela 3 e não diferiram ( $P>0.05$ ) entre os tratamentos experimentais nos tempos 0, 24 e 48 h. Contudo, no tempo 72 h, as VAP, VCL e VSL foram encontradas diferenças significativas apenas no tempo de 72h. Neste, o T1 mostrou-se significativamente superior ( $P<0.05$ ) que o T3.

A análise da LIN evidenciou diferenças no tempo de 24h de refrigeração foi maior ( $P<0.05$ ) no G3 do que noG2. A ALH, nos tempos de 0h e 48h, foi significativamente superior ( $P<0.05$ ) no G2 do que no G3. Entretanto, às 72h de refrigeração, G3 foi inferior ( $P<0.05$ ) aos demais grupos de estudo (G1 e G2). Por sua vez, os valores de BCF, às 24h de refrigeração, foram maiores ( $P<0.05$ ) no G1 e G3 do que no G2, enquanto que no tempo de 72h, o G1 foi superior ( $P<0.05$ ) aos demais tratamentos (Tabela 3).

Quando avaliados os parâmetros espermáticos ao longo dos tempos de refrigeração (0 a 72h), pode-se constatar que os porcentuais de MOP (Tabela 1) do G3 no tempo 0 h foram maiores ( $P<0.05$ ) e do que no tempo 72h. Da mesma forma, para os valores das velocidades, VAP e VSL manifestaram-se maiores ( $P<0,05$ ) no G3 às 24h de refrigeração do que às 72h (Tabela 3).

## **Discussão**

O G4 foi excluído do experimento porque, quando a amostra foi exposta ao *Sperm Class Analyzer* (SCA), os diversos grumos formados devido a interação da gema de ovo com o diluidor ACP-106<sup>®</sup> impossibilitaram a avaliação das células espermáticas. Durante

as avaliações foi observado que as partículas formadas eram confundidas com as cabeças dos espermatozoides, reduzindo, desta forma, a acurácia dos possíveis resultados. No entanto, apesar disso, pode-se observar que haviam células com motilidade.

Na literatura consultada não há relatos sobre a utilização do gel mucilaginoso da *Aloe vera* no diluidor de sêmen de cães e muito menos sobre a concentração a ser utilizada; embora isto exista para outras espécies. Como por exemplo, nos trabalhos de Rodriguez et al (1988) [33], que congelaram sêmen de ovinos usando a 40 partes de *Aloe vera* associada à gema de ovo, 90% das células mantiveram-se móveis após descongelação. Por outro lado, Melo et al (2012) [24] e Brito et al (2012) [6] sugeriram a substituição da gema de ovo pela *Aloe vera*, quando utilizaram 5% desta planta no diluente a base de água de coco em pó (ACP-101<sup>®</sup> e ACP-102<sup>®</sup>) durante refrigeração a 4 °C de sêmen caprino e ovino, respectivamente; o que foi utilizado como base para a realização do presente trabalho.

Os resultados indicam que o gel da *Aloe vera*, na concentração de 5%, foi eficaz em manter a qualidade do sêmen refrigerado de cães, corroborando com os estudos citados anteriormente. Independente do diluidor a ser utilizado a indicação da *Aloe vera* como substituto à gema de ovo é indicada. Entretanto, quando observada a linearidade no tratamento com ACP-106<sup>®</sup> e 5% de *Aloe vera*, pode-se observar um notável incremento benéfico neste grupo causando um aumento deste parâmetro, sendo mantido durante todo o estudo. Este fato pode estar relacionado a uma interação mais eficaz entre o diluidor a base de água de coco em pó com o gel da *Aloe vera* e, conseqüentemente a aparente adaptação das células a este meio.

Outro ponto de discussão é que, apesar de inicialmente os espermatozoides diluídos em Tris-gema de ovo obterem resultados superiores na primeira avaliação (0h), nota-se uma adaptação das células espermáticas nos grupos com *Aloe vera*. O que sugere uma adequação mais lenta ao meio contendo o gel desta planta, sendo observada mais

lentamente no Tris do que na ACP-106<sup>®</sup>, já que, neste último, nas primeiras 24 horas de refrigeração, os resultados foram semelhantes ao grupo com gema de ovo.

Este processo pode ser explicado devido à viscosidade do diluidor após sua formulação, sendo atribuída aos polissacarídeos existentes em grande quantidade no gel da *Aloe vera* [22,40,43]. Estas substâncias podem ter interferido também na redução das motilidades progressivas das células espermáticas observadas no trabalho, já que tem a capacidade de se ligar às membranas celulares, o que pode ter causado uma estabilização nas membranas dos espermatozoides devido a modificação de sua estrutura.

De acordo com Holt (2000) [17] e Manjunath (2012) [21] dependendo da composição da membrana plasmática e do grau de interferência das substâncias adicionadas ao diluidor podem ocasionar em danos irreversíveis à célula, o que pode ter ocorrido em parte da população espermática nos diluidores que utilizaram o gel da *Aloe vera*. Associado a isto, outro fator relevante para a influência nos resultados é a capacidade da *Aloe vera* em aumentar a permeabilidade celular [23], o que pode ter auxiliado na modificação da estrutura da membrana plasmática e diminuído sua movimentação após o re-aquecimento.

Além de polissacarídeos em grande quantidade, há a presença de diversos antioxidantes naturais, como, flavonoides, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol citados por Ozsoy et al (2009) [29] e encontrados no extrato aquoso da folha da *Aloe vera*. Entretanto, estes autores relatam que a atividade antioxidante observada no extrato aquoso não foi constatada quando se utilizou o gel da planta. Portanto, a incorporação desse extrato aquoso da folha ao diluidor associado ao seu gel que, segundo Surjushe (2008) [40], é rico em água, além de vitamina A, B, C e E, cálcio, potássio, magnésio e zinco, diversos aminoácidos, enzimas e carboidratos, pode ser um fator contribuinte para

enriquecer as características do diluidor e, conseqüentemente contribuir de forma benéfica para a manutenção da qualidade espermática.

De acordo com Rodríguez-González et al (2011) [34], os níveis de polissacarídeos, são menores nas plantas bem irrigadas, além disso, segundo estes autores, o processamento das folhas deve ser realizado logo após a colheita, pois o gel oxida rapidamente quando entra em contato com o ar, o que não foi observado no presente estudo, já que a formulação do diluidor foi realizada imediatamente após sua obtenção.

Devido à instabilidade do gel mucilaginoso da *Aloe vera*, diversas técnicas são empregadas para a conservação de suas propriedades [2,10,12], auxiliando também na sua manipulação. As mais estudadas são, a pasteurização (HTST - *high temperature short time*) e a desidratação, no entanto, causam significativa diminuição nos níveis de acemanan, um polissacarídeo bioativo encontrado no gel [13,34], o que pode favorecer e facilitar na sua padronização do gel da *Aloe vera* para utilização nos diluidores. Além destas, a liofilização também é uma técnica de referência [19]. Segundo Vieira et al (2012) [44] esta técnica retém grande parte de seus nutrientes originais, uma vez que emprega baixas temperaturas em seu processamento. Além disso, a qualidade final do produto, quanto aos aspectos nutritivos e sensoriais, também deve ser investigada no intuito de garantir a sua qualidade. Dentre estes índices, pode-se citar o teor de retenção de vitamina C, a capacidade de reidratação e a textura do produto.

Por isto, o emprego de técnicas de processamento que conservem os ativos do gel de maneira adequada é essencial para que o mesmo apresente os efeitos esperados [12]. Entretanto, no presente estudo, não se sabe ao certo até que ponto o processamento do gel em altas temperaturas poderia ter beneficiado a qualidade espermática nos tratamentos que continham a *Aloe vera*, já que estas técnicas não só modificam a quantidade de substâncias, possivelmente interferem também no pH do meio e na osmolaridade, condições estas, que

alteradas, podem causar danos irreversíveis para os espermatozoides, ocasionando a morte celular [30].

Por isto, é imprescindível a padronização do gel da *Aloe vera*, objetivando conservar suas características químicas essenciais para a sobrevivência espermática e, conseqüentemente definir qual será a melhor forma de utilizá-la como componente do diluidor para o sêmen de cães. Pois, é evidente a gama de substâncias que esta planta possui, sendo necessários, porém, estudos mais controlados no intuito de padronizar a idade de colheita, tecnologia de cultivo, clima e solo [8], além de uniformizar o método de extração do gel, manipulação e processamento, já que estes parâmetros são influenciadores na sua composição e, conseqüentemente na manutenção da viabilidade espermática.

### **Conclusão**

Com base nos dados apresentados, é sugerida a substituição da gema de ovo pela *Aloe vera* no diluidor de refrigeração de sêmen de cães na concentração de 5% do gel mucilaginoso desta planta. Quanto ao diluidor a ser utilizado, ambos mostraram-se eficazes, no entanto, sugere-se o Tris já que sua formulação é menos onerosa.

### **Agradecimentos**

Esta pesquisa teve o apoio da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Referências**



- [1] Y. Abe; D. S. Lee; H. Sano; K. Akiyama; Y. Yanagimoto-Ueta; T. Asano. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. *J. Reprod. Dev.*, 54 (2008) 290-294./
- [2] P. Atherton. Aloe vera revisited. *The Br. J. Phytother.*, 4, (1997) 176-183.
- [3] G. R. Betancur; A. U. Suárez; B. A. Rojano. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Rev. CES Med. Vet. Zootec.*, 8 (2013) 115-127.
- [4] M.D. Boudreau; F.A. Beland. Uma avaliação das propriedades biológicas e toxicológicas de *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. In: *Jornal da ciência ambiental e da saúde. Part C. Environmental carcinogenesis e ecotoxicologia*, 24 (2006) 103-54.
- [5] S. Bousseau; J.P. Brillard; B. Marquant-Le Guienne; B. Guérin; B. Camus; M. Lechat. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50 (1998) 699-706.
- [6] B.F. Brito; S.P.M. Maia Filho; P.P.Q. Farias; T.S. Câmara; G.V. Aguiar; J.F. Nunes. Viabilidade espermática do sêmen ovino resfriado à base de água de coco em pó (ACP-102®) adicionado de *Aloe vera* ou gema de ovo. *Ciência Animal*, 22 (2012) 509-512.
- [7] R.C.S. Cardoso; A.R. Silva; L.D.M. Silva. Use of the powdered coconut water (ACP - 106®) for cyopreservation of canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2 (2005) 257-262.
- [8] C. Correa Júnior; L.C. Ming; M.C. Scheffer. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. Curitiba, 1991, 150p.

- [9] G.F. Carneiro. Transporte e criopreservação de sêmen equino. Rev. Bras. Reprod. Anim., 5, (2002) 37-41.
- [10] A.P. Cunha. Farmacognosia e Fotoquímica. In: Farmacognosia e Fotoquímica, Lisboa, 2006, pp. 358-422.
- [11] G. Evans; W.M.C. Maxwell. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. London, 1987, 194p.
- [12] K. Eshun; Q. He. Aloe vera: A valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries – a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 44, (2004) 91-96.
- [13] A. Femenia; E.S. Sánchez; S. Simal; C. Rosselló. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. Carbohydr. Polym., 39 (1999) 109-117.
- [14] J. R. Figueiredo; A. P. R. Rodrigues; C. A. Amorim. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: P.B.D. Gonçalves; J.R. Figueiredo; V.J.F. Freitas, Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo, 2002, pp. 227-260.
- [15] R.H. Hammerstedt; J.K. Graham; J.P. Nolan. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J. Androl., 11 (1990) 73-88.
- [16] E.S.E. Hafez; B. Hafez. Reprodução Animal, Barueri, 2004.
- [17] W.V. Holt. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci., 62 (2000) 13-22.
- [18] Y. Hu; J. Xu; Q. Hu. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 7788-7791.

- [19] A. Ibarz; G.V. Barbosa-Canovas. *Deshidratación y Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos*, Lancaster, Basel, 1999, 872p.
- [20] C. Linde-Forsberg. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Anim Pract*, 21 (1991) 467-485.
- [21] P. Manjunath. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.*, 9 (2012) 809-815.
- [22] J.M. Marshall. Aloe vera gel: whats is the evidence? *The Pharma. J.*, 244 (1990) 360-362.
- [23] F.J.A. Matos. *Farmácias Vivas*. Fortaleza, 1998.
- [24] C.C.S. Melo; L.C.S. Melo; E.V. Castro; B.M.B. Santos; E.C.S. Oliveira; C.C.M. Salgueiro; J.F. Nunes. *Aloe vera sp.* is an acceptable alternative to egg yolk for preserving goat semen at 4 °C. *Reprod. Domest. Anim.*, 47(2012) 433.
- [25] A.J. Michael; C. Alexopoulos; E.A. Pontiki; D.J. Hadjipavlou-Litina; P. Saratsis; H.N. Ververidis. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 112 (2009) 119-135.
- [26] C. Milani; A. Fontbonne; E. Sellem; C. Stelletta; O. Ge´rard; S. Romagnoli. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen, *Theriogenology*, 74 (2010) 153-64.

- [27] M.M. Neves; M. Henry. Gema de ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, 36 (2012) p.209-2014.
- [28] D.B. Nunes; C.E.S.N. Zúccari; E.V.C. Silva. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 30, (2006) 42-56.
- [29] N. Ozsoy; E. Candoken; N. Akev. Implications for degenerative disorders – Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol in Aloe vera. *J. Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2 (2009) 99-106.
- [30] P.H. Purdy. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res*, 63 (2006) 215-225.
- [31] A.M.P.N. Quintanilha. Inseminação artificial e sêmen congelado. In: R.W. Nelson; C.G. Couto. *Fundamentos de medicina interna de pequenos animais*. Rio de Janeiro, 1994, pp. 526-529.
- [32] T. Reynolds; A.C. Dweck. Aloe vera leaf gel: a review update. *J. Ethnopharm.* 68 (1999), p.33-37.
- [33] F. Rodriguez; H. Baldassarre; J. Simonetti; F. Aste; J.L. Ruttle. Cervical versus intrauterine insemination of ewes using fresh or frozen semen diluted with Aloe vera gel, *Theriogenology*, 30 (1988) 843-854.
- [34] V.M. Rodríguez-Gonzalez; A. Femenia; R.F. González-Laredo; N.E. Rocha-Guzmán; J.A. Gallegos-Infante; M.G. Candelas-Cadillo; P. Ramírez-Baca; S. Simal; C. Rosselló.

Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr. Polym.*, 86 (2011) 1675-83.

[35] I.B.M. Sampaio. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte, 1998, 221p.

[36] J.C. Sampaio Neto; C.C.M. Salgueiro; E. Mateos-Rex; J.F. Nunes. Utilização do diluente ACP-105<sup>®</sup> na refrigeração do sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 5 (2002) 137-139.

[37] W.J. Skinner. *Aloe vera* resultou em injeções de suspensão para licença médica. *Medicina Natural Law*, 1997.

[38] A.R. Silva. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 31 (2007) 119-127.

[39] A.R. Silva; R.C.S. Cardoso; D.C. Uchoa; L.D.M. Silva. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Vet. J.*, 164 (2002) 244-246.

[40] A. Surjushe; R. Vasani, D.G. Saple. *Aloe vera*: A short review. *Indian J. Dermatol.*, 53 (2008) 163-166.

[41] E.C.B. Silva; J.F.P. Cajueiro; S.V. Silva; P.C. Soares; M.M.P. Guerra. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77 (2012) 1722-1726.

[42] E.L. Squires; B.W. Pickett; J.K. Graham; D.K. Vanderwall; P.M. McCUE; J.E. Bruemmer. Principles of cryopreservation. In: *Cooled and frozen Stallion Semen*, 1999.

[43] M. Teske; A.M.M. Trentini. Aloe vera. In: Herbarium – Compêndio de Fitoterapia. Curitiba, 1997, pp. 111-132.

[44] A.P. Vieira; J.F., Nicoleti, V.R.N., Telis. Liofilização de fatias de abacaxi: avaliação da cinética de secagem e da qualidade do produto. Braz J Food Technol, 15, (2012) 50-58.

[45] S. Vignini. A inteligência biológica numa visão quântica e sistêmica: apresentação de uma proposta terapêutica. São Paulo, 2011, p.111-114.

[46] R. Vishwanath; P. Shannon. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62 (2000), p.23-53.

**Tabela 1.** Média e desvios-padrão das motilidades total e progressiva do sêmen refrigerado a 5 °C de cães avaliado no *Sperm Class Analyzer* (SCA<sup>®</sup>), por um período de 72 horas

| Parâmetros | Grupos | Tempo de avaliação        |                            |                           |                           |
|------------|--------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|            |        | 0h                        | 24h                        | 48h                       | 72h                       |
| MOT (%)    | G1     | 84,0 ± 12,9               | 84,7 ± 14,4                | 86,2 ± 15,8               | 80,9 ± 12,4               |
|            | G2     | 83,7 ± 5,2                | 70,1 ± 13,3                | 66,9 ± 12,4               | 51,8 ± 14,8               |
|            | G3     | 71,6 ± 11,3               | 62,1 ± 13,0                | 58,1 ± 9,4                | 38,7 ± 9,6                |
| MOP (%)    | G1     | 41,3 ± 9,5 <sup>A</sup>   | 36,3 ± 9,7 <sup>A</sup>    | 36,8 ± 8,5 <sup>A</sup>   | 28,6 ± 5,2 <sup>A</sup>   |
|            | G2     | 21,5 ± 4,3 <sup>B</sup>   | 20,1 ± 5,6 <sup>B</sup>    | 21,7 ± 5,8 <sup>B</sup>   | 16,4 ± 6,1 <sup>AB</sup>  |
|            | G3     | 27,9 ± 7,6 <sup>abB</sup> | 23,9 ± 7,1 <sup>abAB</sup> | 18,0 ± 2,5 <sup>abB</sup> | 10,4 ± 3,9 <sup>bbB</sup> |

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (P<0,05). Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (P<0,05). G1: Tris + 20% gema de ovo; G2: Tris + 5% *Aloe vera*; G3: ACP-106<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; MOT: motilidade total; MOP: motilidade progressiva.

**Tabela 2.** Média e desvios-padrão da integridade de membrana plasmática do sêmen refrigerado a 5 °C de cães avaliado no *Sperm Class Analyzer* (SCA<sup>®</sup>), por um período de 72 horas

| Parâmetros | Grupos | Tempo de avaliação |             |             |             |
|------------|--------|--------------------|-------------|-------------|-------------|
|            |        | 0h                 | 24h         | 48h         | 72h         |
| iMP (%)    | G1     | 72,6 ± 14,7        | 70,0 ± 11,3 | 65,1 ± 12,5 | 69,9 ± 9,9  |
|            | G2     | 53,5 ± 9,2         | 50,3 ± 12,0 | 54,8 ± 10,2 | 49,2 ± 16,7 |
|            | G3     | 53,0 ± 12,8        | 56,4 ± 7,9  | 53,2 ± 9,5  | 54,4 ± 11,5 |

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (P<0,05). Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (P<0,05). G1: Tris + 20% gema de ovo; G2: Tris + 5% *Aloe vera*; G3: ACP-106<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; iMP: integridade de membrana plasmática.

**Tabela 3.** Média e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos do sêmen refrigerado a 5 °C de cães avaliado no *Sperm Class Analyzer* (SCA<sup>®</sup>), por um período de 72 horas

| Parâmetros | Grupos | Tempo de avaliação        |                           |                           |                            |
|------------|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
|            |        | 0h                        | 24h                       | 48h                       | 72h                        |
| VAP (µm/s) | G1     | 105,9 ± 17,2              | 105,1 ± 16,7              | 105,2 ± 15,4              | 103,5 ± 16,4 <sup>A</sup>  |
|            | G2     | 83,6 ± 20,2               | 83,3 ± 24,4               | 87,2 ± 20,5               | 75,1 ± 19,1 <sup>AB</sup>  |
|            | G3     | 87,2 ± 22,5 <sup>ab</sup> | 97,7 ± 15,9 <sup>a</sup>  | 78,5 ± 20,0 <sup>ab</sup> | 61,2 ± 30,6 <sup>bB</sup>  |
| VCL (µm/s) | G1     | 127,0 ± 18,2              | 125,3 ± 19,7              | 127,2 ± 18,5              | 123,2 ± 19,3 <sup>A</sup>  |
|            | G2     | 128,9 ± 30,0              | 117, ± 33,5               | 119,5 ± 29,2              | 100,3 ± 20,2 <sup>AB</sup> |
|            | G3     | 106,7 ± 21,9              | 115,2 ± 19,6              | 89,8 ± 25,6               | 68,9 ± 32,8 <sup>B</sup>   |
| VSL (µm/s) | G1     | 90,3 ± 15,3               | 90,2 ± 15,6               | 88,5 ± 14,2               | 91,0 ± 15,2 <sup>A</sup>   |
|            | G2     | 70,1 ± 14,2               | 68,5 ± 20,8               | 73,6 ± 15,3               | 67,2 ± 15,3 <sup>AB</sup>  |
|            | G3     | 81,0 ± 21,4 <sup>ab</sup> | 92,9 ± 14,3 <sup>a</sup>  | 74,6 ± 17,9 <sup>ab</sup> | 58,4 ± 28,5 <sup>bB</sup>  |
| LIN (%)    | G1     | 66,5 ± 12,7               | 67,3 ± 12,2 <sup>AB</sup> | 65,2 ± 12,0               | 69,1 ± 12,4                |
|            | G2     | 52,1 ± 13,1               | 46,8 ± 14,6 <sup>B</sup>  | 58,7 ± 9,7                | 58,9 ± 14,5                |
|            | G3     | 65,0 ± 16,7               | 75,4 ± 10,8 <sup>A</sup>  | 66,9 ± 12,7               | 60,3 ± 20,5                |
| STR (%)    | G1     | 79,5 ± 13,2               | 80,1 ± 13,9               | 78,6 ± 13,9               | 82,1 ± 13,9                |
|            | G2     | 72,6 ± 12,7               | 65,4 ± 16,3               | 79,9 ± 14,6               | 78,3 ± 18,1                |
|            | G3     | 80,1 ± 16,7               | 88,7 ± 13,4               | 76,2 ± 16,6               | 70,2 ± 26,5                |
| ALH (µm)   | G1     | 3,5 ± 0,5 <sup>AB</sup>   | 3,4 ± 0,5                 | 3,5 ± 0,5 <sup>AB</sup>   | 3,3 ± 0,5 <sup>A</sup>     |
|            | G2     | 4,8 ± 1,2 <sup>A</sup>    | 3,7 ± 1,5                 | 4,1 ± 0,8 <sup>A</sup>    | 3,4 ± 0,5 <sup>A</sup>     |
|            | G3     | 2,8 ± 0,5 <sup>B</sup>    | 2,8 ± 0,6                 | 2,1 ± 0,8 <sup>B</sup>    | 1,6 ± 0,8 <sup>B</sup>     |
| WOB (%)    | G1     | 77,9 ± 14,3               | 78,3 ± 12,9               | 77,3 ± 12,9               | 78,5 ± 13,1                |
|            | G2     | 56,3 ± 11,9               | 56,8 ± 15,9               | 68,5 ± 10,7               | 65,2 ± 15,2                |
|            | G3     | 70,1 ± 17,8               | 79,3 ± 11,9               | 70,2 ± 14,0               | 62,9 ± 21,8                |
| BCF (Hz)   | G1     | 9,9 ± 1,5                 | 10,9 ± 2,0 <sup>A</sup>   | 10,9 ± 1,8                | 11,2 ± 1,8 <sup>A</sup>    |
|            | G2     | 8,3 ± 1,3                 | 7,1 ± 2,2 <sup>B</sup>    | 7,9 ± 1,9                 | 6,8 ± 0,6 <sup>B</sup>     |
|            | G3     | 9,4 ± 1,5                 | 11,7 ± 1,8 <sup>A</sup>   | 8,8 ± 2,3                 | 7,4 ± 3,6 <sup>B</sup>     |

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (P<0,05). Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (P<0,05). G1: Tris + 20% gema de ovo; G2: Tris + 5% *Aloe vera*; G3: ACP-106<sup>®</sup> + 5% *Aloe vera*; VAP (µm/s): velocidade média do percurso; VCL (µm/s): velocidade curvilínea; VSL (µm/s): velocidade em linha reta; LIN (%): linearidade; STR (%): retilinearidade; ALH (µm): deslocamento lateral da cabeça; WOB (%): índice de oscilação; BCF (Hz): frequência de batimento cruzado.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, o uso do gel de *Aloe vera* na concentração de 5% foi eficaz para a manutenção da qualidade espermática durante a refrigeração por 48 e 72 horas (Experimento 1 e Experimento 2, respectivamente). No entanto, quando objetivada a renovação do diluidor, esta não foi benéfica para o grupo que incluía em sua composição esta planta. Independente do diluidor utilizado (Tris ou ACP-106<sup>®</sup>), é recomendada a substituição da gema de ovo pela *Aloe vera*.

Apesar da planta *Aloe vera* demonstrar características que são viáveis para a sobrevivência espermática, apenas no processo de refrigeração foram encontrados resultados que corroboram com o objetivo do presente estudo. Entretanto, a elevada viscosidade do gel da planta que foi utilizado durante o experimento é um entrave que deve ser corrigido, o que foi observado durante os dois experimentos. Além de demonstrar resultados diferentes nos dois experimentos, mesmo utilizando condições iguais de diluidor, concentração do gel e animais.

Outra alteração verificada durante o processo de formulação do diluidor foi a redução do pH (6,2 em média) e o aumento da Osmolaridade (390 mOsm, em média). Entretanto, ambos foram corrigidos no intuito de mantê-los nos valores recomendados para a célula espermática.

Outras pesquisas devem ser realizadas no intuito de diminuir a viscosidade do gel da *Aloe vera*, dentre elas, sugere-se a pasteurização e a desidratação. No entanto, após estes processos há a necessidade de avaliar a qualidade do produto obtido verificando sua textura e tamanho das partículas, assim como se haverá perda de componentes.