



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
COORDENADORIA DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RAMON BARROS DA CUNHA

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE 1,0 % DE MEL SOBRE OS PARÂMETROS
CINÉTICOS DE SÊMEN DE EQUINO SOBRE REFRIGERAÇÃO A 5 °C EM
TEMPOS DIFERENTES**

BELÉM - PARÁ
2019

RAMON BARROS DA CUNHA

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE 1,0% DE MEL SOBRE OS PARÂMETROS
CINÉTICOS DE SÊMEN DE EQUINO SOBRE REFRIGERAÇÃO A 5°C EM
TEMPOS DIFERENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao de Curso de Medicina Veterinária e ao Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), como requisito para obtenção ao grau de Bacharel em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Sebastião Tavares Rolim Filho

BELÉM - PARÁ

2019

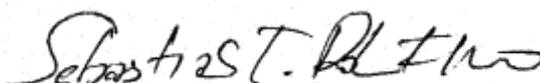
RAMON BARROS DA CUNHA

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE 1,0% DE MEL SOBRE OS PARÂMETROS
CINÉTICOS DE SÊMEN DE EQUINO SOBRE REFRIGERAÇÃO A 5°C EM
TEMPOS DIFERENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao de Curso de Medicina Veterinária e ao Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), como requisito para obtenção ao grau de Bacharel em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Reprodução Animal.

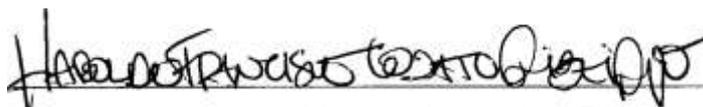
Data da Aprovação

Banca examinadora:



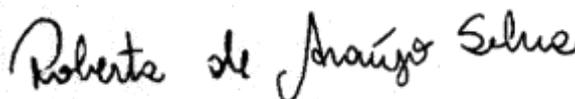
Orientador

Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho
Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

Membro 1



Membro 2

M.V^(a) Roberta de Araújo Silva
Universidade Federal Rural da Amazônia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

DIII da Cunha, Ramon

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE 1,0 % DE MEL SOBRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS DE SÊMEN
DE EQUINO SOBRE REFRIGERAÇÃO A 5 °C EM TEMPOS DIFERENTES / Ramon da Cunha. - 2019.
55 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Campus
Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho
Coorientador: Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro.

1. Garanhão. 2. Resfriamento do sêmen . 3. Preservação seminal. I. Tavares Rolim Filho, Sebastião,
orient. II. Título

CDD 636.08926

DEDICATÓRIA

*A meus preceptores Maria do Livramento Oliveira Barros e Jose Sampaio da Cunha Filho
A todos os meus irmãos Emerson Vasco, Maxwell Barros, Matheus Barros, Gustavo
Carvalho e Guilherme Carvalho*

Aos meus avós in memoriam Lezenita da Cunha, Jose Sampaio e Albeniza Barros

*Aos meus verdadeiros amigos que tens sido a minha segunda família pelo amor, ajuda,
compreensão, força e incentivos dados a mim todos os dias.*

*A minha família pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Muito do que
sou hoje devo a vocês*

Cordialmente, Ramon da cunha

AGRADECIMENTOS

Enfim, esse grande dia chegou, começo minhas gratulações, agradecendo a Deus por colocar a minha frente de grandes batalhas diárias, pois elas sempre me fizeram crescer como pessoal e como profissional, **obrigado meu Deus**.

A minha **mãe (Maria)**, quem foi, é e sempre será minha fonte de inspiração, hoje sou meramente um reflexo de todos seus ensinamentos, **pai (Sampaio)**, obrigado por ser esse exemplo de homem de garra, batalhador, aos irmãos (**Emerson, Maxwell, Matheus, Gustavo e Guilherme**) em especial a meu irmão mais velho Emerson Vasco, exemplo de pessoal honesta e batalhadora, é quem me empurrou quando já havia perdido as esperanças, **AMO TODOS VOCÊS**, gratidão também a meu padrasto (**Luciano**) e madrastra (**Elizete**), vocês também fazem parte desse pequeno passo, meu **MUITO OBRIGADO**.

Aos meus tios, sendo impossível mencionar a todos, meu muito obrigado, porém cabe dois em especial minha **tia (Leilma)** e **tio (Daniel)**, sendo responsáveis em me ajudar no momento mais difícil de minha vida, o início de curso cedendo hospedagem, alimentação e além disso carinho e força, é indescritível a gratidão que tenho a vocês meus tios.

Aos tios de graduação minha eterna gratidão por sempre me acolherem não apenas como sobrinho mas como um filho, obrigado tia Norma, tio Walderson.

Ao Setor de Reprodução Animal – SRA, lugar que me acolheu me incentivou e me ajudou a permanecer no curso, obrigado família reprodução, aos meus orientadores **Professor Haroldo e Sebastião**, obrigado por se ajudarem durante toda a graduação, gratidão por sempre me auxiliarem nas decisões, sempre me colocando nos melhores caminhos, além de um prazer é motivo de orgulho ser orientado por vocês.

A todos os professores que se dedicaram a repassar o vasto conhecimento prático teórico, em especial aos que acreditaram em meu potencial e sempre se mostraram disponível a ajudar, meu muito obrigado **professora Natalia Guarino, professor Alisson Miranda**.

Agradecimento também aos veterinários **Bruno Filgueiras e Dr Fernando Paniago** da empresa Zoetis^{br}, que concederam a oportunidade de estagiar nas melhores fazendas empresas da região norte, meu obrigado também **ao Dr Carlos Vinicius** pelo conhecimento repassado, gratidão do mesmo modo a **Dr Lawrence Barros** que me supervisionou nessa reta final de curso, trabalhando com reprodução equina e foi o mentor do presente trabalho, muito obrigado por todos os ensinamentos Dr.

Agora meus agradecimento a moçada da reprodução, começando pela família mais antiga, aos predecessores residentes e hoje grandes amigos **Dr Gustavo, Dr Will e Dr**

Alvaro, obrigado por todos os ensinamentos, eterna gratidão, aos amigos (**Anelise, Victor, Raphael, Moises, Claudia, Meire, Diego, Eliene, Daniela, Felipe, Americo, Marina**) o meu muito obrigado.

Gratidão também a moçada jovem guarda da reprodução, vocês são o futuro do SRA (**Danilo, Paulo, Iago, Carol, Luyd, Jessica, obrigado por tudo Dr^a, Karla, Camila e Ruy**).

Meu eterno obrigado também a toda a turma 2015, em especial aos irmãos (**Diego, Matheus, Walderson, Leo e Kalleu**) obrigado por tudo, vocês são uma família da faculdade, a minhas amigas que sempre não mediram esforços para me ajudarem principalmente quando eu estava paras as fazendas da vida rs (**Rafinha, Mayra, Josye, Ynaê e Carol**), sem vocês talvez o final da história não fosse esse rrsrsrs minha eterna gratidão.

Obrigado também aos amigos (**Leo Costa e Jemerson**), gratidão também aos meus amigos que estão do outro lado do mundo **Marcos Kaiano (Vovô Japonês) e Harianne Azeredo**, saudades amigos e obrigado por tudo.

Meu, muito obrigado!!

Se quer ir rápido, vá sozinho.
Se quer ir longe, vá acompanhado
Provérbio Africano

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da adição de 1,0% mel como extensor de diluidor, sobre os parâmetros seminais de vigor, motilidade total e progressiva, em refrigeração a 5 °C em diferentes tempos, o experimento foi desenvolvido, na cidade de Ceará-Mirim, no estado do Rio Grande do Norte, foram utilizados no 05 garanhões Quarto de Milha, com idade entre 04 a 15 anos de vida e histórico reprodutivo de fertilidade comprovada, sendo realizadas cinco coletas de sêmen de cada garanhão, com auxílio de vagina artificial, utilizando uma égua como manequim, após as coletas, era separada uma alíquota de sêmen para formação de grupo controle, estes apenas com o acréscimo do diluidor Botu sêmen transporte®, seguida o mesmo ejaculado era utilizado para formação de grupos de experimentais com e sem centrifugação, diluídos com o mesmo diluidor Botu sêmen transporte® porém com acréscimo de 01% de mel orgânico, por fim as amostras eram colocadas no container de transporte Botuflex® divididos em grupos de avaliação as 12, 24 e 36 horas, todos com temperatura de conservação média de 05 °C, posteriormente era realizado a avaliação, submetidos a análise estatística através de software especializado (SAS University Edition), quanto aos resultados obtidos na avaliação do vigor, pode-se constatar homogeneidade entre os grupos, com exceção do grupo controle 0 horas, ou seja a avaliação do momento da coleta, que obteve média e desvio padrão de 2.75 ± 0.50 , ($P < 0,05$) quando confrontado com todos os grupos, e o grupos 05 e 06 de avaliação de 36 horas de armazenamento com acréscimo de mel, com média e desvio padrão de 1.75 ± 0.50 , 2.25 ± 0.50 , ($P < 0,05$) respectivamente, se diferenciando estatisticamente do grupo controle 36 horas, ao avaliarmos a motilidade, foi obtido resultado similar ao anterior sendo o grupo controle 0h obteve média e desviou padrão de 65.00 ± 12.90 apresentando mais uma vez diferença estatística dos demais ($P < 0,05$), quando confrontados o grupo controle 36 horas com as amostras com acréscimo de 01% de mel, equivalente aos grupos 5 que obteve média e desviou padrão de 26.25 ± 14.71 e 6 com 23.75 ± 4.78 , apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$), a motilidade progressiva somente o grupo controle 0h com média e desvio padrão de 42.50 ± 15.00 , apresentou diferença estatística quando confrontado com os demais grupos ($P < 0,05$), permitindo concluir que há um acréscimo dos parâmetros de vigor e motilidade total ao prorrogar a viabilidade seminal.

Palavras-chave: Garanhão – Resfriamento do sêmen – Preservação seminal.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of 1,0% honey as extender on the seminal parameters of vigor, total and progressive motility in refrigeration at 5 °C at different times. The experiment was carried out in the city of Ceará-Mirim, in the State of Rio Grande do Norte. Were used 5 Quarter Horse stallions, with 4 to 15 years of age and reproductive history of proven fertility, five semen collections were performed from each stallion, with the aid of artificial vagina, using a mare as a dummy, after collection, an aliquot of semen was separated to form a control group, these only with the addition of the thinner Botu sêmen transporte®, later the same ejaculate was used to form experimental groups with and without centrifugation, diluted with the same thinner Botu sêmen transporte® but with 1,0% extra honey, finally the samples were placed in the shipping Container Botuflex® divided into assessment groups at 12, 24 and 36 hours, all with an average storage temperature of 5 °C, later the evaluation was performed, submitted to statistical analysis through specialized software (SAS University Edition), regarding the results obtained in the vigor evaluation, it can be observed homogeneity between the groups, except for the control group 0 hours, ie the evaluation of the moment of collection, which obtained mean and Standard deviation of 2.75 ± 0.50 , ($P < 0,05$) compared to all groups, and groups 5 and 6 of 36 hours of storage with honey addition, with mean and Standard deviation of 1.75 ± 0.50 , 2.25 ± 0.50 , ($P < 0,05$) respectively, differing statistically from the control group 36 hours, when we evaluated the motility, we obtained a similar result to the previous one and the control group 0h obtained mean and Standard deviation of 65.00 ± 12.90 presenting once again statistical difference from the other ($P < 0,05$), when compared to the control group 36 hours with samples with an increase of 1% of honey, equivalent to groups 5 that obtained mean and Standard deviation of 26.25 ± 14.71 and 6 with 23.75 ± 4.78 , presented statistical difference ($P < 0,05$), progressive motility only the 0h control group with mean and Standard deviation of 42.50 ± 15.00 , presented statistical difference when compared to the other groups ($P < 0,05$), concluding that there is an increase in the vigor and total motility parameters by extending the seminal viability.

Keywords: Stallion - Semen Cooling - Seminal Preservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Ação do frio sobre a célula espermática equina.....	17
3.2 Resfriamento do sêmen equino.....	18
3.2.1 Sistema de resfriamento.....	19
3.2.2 Curvas de resfriamento.....	21
3.2.3 Diluidores de sêmen	22
3.2.3.1 Antimicrobianos	22
3.2.3.2 Leite desnatado.....	24
3.2.3.3 Gema de ovo.....	25
3.3 Diluição e qualidade seminal.....	27
3.4 Efeitos da centrifugação e retirada do plasma seminal	27
3.5 Efeito do ganhão na refrigeração do sêmen	29
3.6 O mel.....	30
3.7 Avaliação de sêmen de ganhões	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Local e período de experimentação	33
4.2 Animais e alimentação	33
4.3 Delineamento experimental.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	42

1 INTRODUÇÃO

A equinocultura no Brasil vem se desenvolvendo muito nos últimos tempos, sendo que em certos segmentos, como os esportes, possuem representatividade internacional. O turismo rural é outra área que vem ganhando adeptos, aumentando as opções de renda com a utilização do cavalo. Minas Gerais e Bahia são os estados que possuem os maiores rebanhos, e a região Centro-Oeste é a que possui maior crescimento exponencial. Isso coloca o Brasil com um dos maiores efetivos do mundo. O uso do cavalo ocupa diretamente mais de 640 mil pessoas no país, gerando de forma indireta 3,2 milhões de empregos e movimentando um montante de 7,5 bilhões de reais por ano na economia nacional (LIMA et al., 2012).

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo (GINTHER, 1992). Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos uma vez que o uso rotineiro de sêmen congelado de garanhões apresenta algumas limitações que impedem seu uso em larga escala, fazendo-se necessário o uso do sêmen refrigerado. O sêmen refrigerado equino é normalmente utilizado para possibilitar que um material genético de alta qualidade seja disseminado a longa distância (OLIVEIRA, 2013).

Entretanto, Amann e Graham (1993) citam que a manutenção da fertilidade dos espermatozoides é importante durante a refrigeração, do transporte até o momento da inseminação, além disso, qualquer alteração que ocorra durante a produção, a colheita e o armazenamento do gameta masculino, até o seu contato com o ovócito, poderão afetar o processo de fecundação. Assim, para a obtenção de bons resultados na IA, os espermatozoides deverão apresentar integridade funcional e estrutural até o momento da fertilização.

Ademais, a performance reprodutiva de um garanhão depende de vários fatores inter-relacionados, dentre eles o manejo, a fertilidade das éguas inseminadas, presença de patógenos venéreos, libido, habilidade de monta e qualidade seminal (AMANN, 2005). Portanto, com a finalidade de maximizar a performance reprodutiva, a utilização de métodos avançados para o processamento e seleção do sêmen de garanhões, são boas ferramentas para o uso de sêmen de baixa qualidade ou para obter espermatozoides para programas de reprodução assistida (LOOMIS, 2006).

Dentre diversas técnicas desenvolvidas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões a centrifugação com posterior remoção do plasma seminal é uma das principais

para reprodutores cujo ejaculado sofre uma redução acentuada da motilidade progressiva espermática quando processado da maneira convencional, especialmente para sêmen refrigerado por mais de 24h. (BRINSKO et al., 2000a)

Dessa forma, diversos autores tem buscado meios alternativos pra utilização em sêmen resfriado de garanhões, como água de cocô, açucars, leite em pó desnatado, glicose e tampão bicarbonato, porém atualmente, o mel tem sido considerado não apenas por suas propriedades terapêuticas, mas também como suplemento alimentar sem a adição de outras substâncias durante a sua elaboração. Este fato se justifica visto que a simples análise do mel demonstra claramente a riqueza nutritiva de sua composição, que inclui micronutrientes como vitaminas, minerais (AZEREDO et al., 2003), surgindo assim este como uma alternativa viável pra incremento da fertilidade de garanhões, como foi observado por El-Sheshtawy et al., (2016) em trabalho realizado no Egito, com garanhões da raça árabe onde observou que a suplementação com mel em diversas concentrações (2%, 3% e 4%) apresentou diferença sobre a motilidade, integridade da membrana e percentagem do acrossoma intacto ($P < 0,001$) a 0, 1, 2 e 3 horas pós-descongelção.

Frente ao exposto o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito antioxidante da adição de mel como extensor de diluidor, sobre os parâmetros seminais de vigor, motilidade total e progressiva, sob refrigeração a 5°C em diferentes tempos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Objetivou-se avaliar o efeito antioxidante da adição de mel como extensor de diluidor, sobre os parâmetros seminais de vigor, motilidade total e progressiva, sob refrigeração a 5°C em diferentes tempos.

2.2 Objetivos específicos

- Contribuir com informações relevantes quanto à preservação, diluição e uso do sêmen de equinos;
- Avaliar a influência do acréscimo 1% de mel nos parâmetros cinéticos do sêmen de equinos;
- Avaliar a influência da centrifugação nos parâmetros cinéticos do sêmen de equinos;
- Contribuir com a formação e qualificação de recursos humanos para desenvolvimento de trabalhos na área de manejo reprodutivo de animais domésticos;
- Aumentar o acervo literário acerca dos aspectos reprodutivos de equinos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ação do frio sobre a célula espermática equina

Ainda por volta de 1700, Spallanzani acondicionou sêmen de cavalo e cão na neve e observou diminuição da motilidade dos espermatozoides e posterior motilidade após o aquecimento. O primeiro relato de sucesso na criopreservação de sêmen de animais domésticos foi na década de 40, com sêmen bovino (PHILLIPS e LARDY, 1940). E, desde então, a utilização de técnicas de criopreservação tem sido estudada em diversas espécies domésticas, tendo em vista as diferenças na morfologia e composição da célula espermática entre espécies.

A redução da temperatura do sêmen diminui o metabolismo da célula espermática no caso do resfriamento e cessa o metabolismo no caso do congelamento do sêmen. Quando os espermatozoides são mantidos a 5 °C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência em comparação à preservação a 38 °C, o que possibilita a preservação do ejaculado por longos períodos (SQUIRES et al., 1999).

Durante o processo de resfriamento e congelamento do sêmen, a membrana plasmática, composta por dupla camada lipídica, proteínas e carboidratos e que envolve a célula espermática, sofre alterações físico-químicas e estruturais ocasionadas pelo frio (AMANN e GRAHAM, 1993). Os danos causados pelo estresse térmico podem ser decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas, ou indiretos, como alterações das funções celulares (SQUIRES et al., 1999). Mudanças na organização do mosaico fluido da membrana plasmática podem levar a alterações na permeabilidade, funcionalidade e no metabolismo da célula espermática, o que pode prejudicar sua motilidade e capacidade fecundante (AMANN e GRAHAM, 1993).

O alto conteúdo de ácidos graxos insaturados no espermatozoide tende a ocasionar estresse oxidativo (KODAMA et al., 1996). No sêmen processado, as espécies reativas ao oxigênio são induzidas pela respiração mitocondrial (TOSIC e WALTON, 1946) e principalmente pela contaminação leucocitária e peroxidação de espermatozoides com excesso de citoplasma residual (AITKEN E BAKER, 2004). Essas espécies podem ter efeitos positivos *in vivo* na indução da reação acrossômica (AITKEN e FISHER, 1994), entretanto, a excessiva peroxidação causa danos à membrana plasmática e aos ácidos nucleicos, reduzindo a motilidade e a capacidade fertilizante do espermatozoide (AITKEN e BAKER, 2004). No sêmen equino, a adição de antioxidantes, como ácido ascórbico, tocoferol, hipotaurina,

taurina, betacaroteno, catalase, glutathione peroxidase, superóxido desmutase, N-acetil cisteína ou piruvato, pode melhorar a manutenção da integridade da membrana e a motilidade do espermatozoide (AURICH et al., 1997; PAGL et al., 2006).

O frio também altera as proteínas intracelulares, ou seja, afeta as funções enzimáticas e o transporte por proteínas transmembrana. A redução da temperatura altera o padrão de fluidez da membrana plasmática, que passa de um estado fluido para um estado gel, no qual as cadeias de ácidos graxos são rígidas e paralelas, fase chamada transição, a qual, no sêmen equino ocorre por volta dos 20,7 °C (AMANN e GRAHAM, 1993). A transcrição de DNA é interrompida no espermatozoide maturo, com isso, os mecanismos de reparo não estão disponíveis e danos à membrana plasmática resultam em perdas irreversíveis das funções da célula espermática (EDDY & O'BREIN, 1994).

O choque térmico, o estresse osmótico, a formação de cristais de gelo (sêmen congelado) e o dano oxidativo são os principais fatores que ocasionam injúrias na célula espermática decorrentes do frio, causando perda da viabilidade e da capacidade fertilizante do espermatozoide (AMIRAT et al., 2004; LI et al., 2005).

Algumas espécies (galo, bovino) são mais resistentes ao choque térmico e esta resistência está relacionada principalmente à alta concentração de colesterol na membrana plasmática. O colesterol estabiliza a membrana plasmática e reduz a temperatura a qual, a membrana passa pela fase de transição e, em altas concentrações, pode eliminar essa fase (STRYER, 1992; ALBERTS et al., 1999). A membrana plasmática de garanhões possui variações quanto aos níveis de colesterol, isso não difere somente entre outras espécies, mas também entre os garanhões e seus ejaculados (GADELLA et al., 2001).

Desse modo, se as membranas espermáticas estiverem devidamente protegidas no processo de resfriamento e armazenamento e as funções celulares forem preservadas até o momento da inseminação, espera-se aumento da longevidade dos espermatozoides relacionado à redução da utilização das reservas de adenosina trifosfato (ATP), o que possibilita que o ejaculado seja utilizado por longos períodos após a coleta (VARNER et al., 1989).

3.2 Resfriamento do sêmen equino

A tendência mundial de utilização de inseminação artificial com sêmen resfriado é crescente e, de acordo com a Associação de cavalos Puro-Sangue Suecos (2007) e a Associação Sueca de registro de cavalos (2005), o uso do sêmen resfriado tem aumentado nas últimas décadas. Uma das causas desse aumento é a alta proporção de garanhões (20-40%)

com resposta insatisfatória ao congelamento do sêmen (VIDAMENT et al., 1997).

Entre as vantagens do sêmen resfriado, destacam-se a menor alocação de gananhões na propriedade; a redução dos custos, do estresse e dos danos à égua e ao potro ocasionados pelo transporte; a ausência de contágio com doenças; e o aumento da habilidade para seleção de gananhões (BRISKO et al., 2000; VARNER et al., 1992).

De qualquer modo, a tecnologia de resfriamento do sêmen é interessante quando o sêmen mantém sua capacidade fertilizante por 1 a 2 dias. Infelizmente, a fertilidade obtida com a inseminação artificial com sêmen resfriado varia entre gananhões e laboratórios (PICKETT e SHINER, 1994; KATILA, 1997). O sucesso do uso do sêmen resfriado/estocado depende de muitos fatores, que se confundem, como: temperatura de armazenamento, composição do meio extensor (diluidor), dose inseminante, número de inseminações, qualidade do sêmen a fresco e manuseio do sêmen (MALMGREN, 1998).

3.2.1 Sistema de resfriamento

Os sistemas de resfriamento de sêmen equino podem ser ativos ou passivos. Os sistemas ativos possuem taxas de refrigeração predeterminadas, mas são caros e de pouca utilidade prática em condições de campo, enquanto os sistemas passivos são mais baratos, porém mais susceptíveis a alterações nas taxas de resfriamento decorrentes de variações na temperatura ambiente, no volume e na temperatura inicial da amostra (VALLE et al., 1999).

O sistema passivo é o mais utilizado para resfriamento de sêmen equino. É realizado em dispositivos (contêineres) de refrigeração, que devem atender às seguintes exigências: completo isolamento térmico do meio exterior; obtenção de taxa de resfriamento lenta; manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após a estabilização; proteção do sêmen; estrutura forte que permita o uso de diferentes meios de transportes; viabilidade econômica; leveza e facilidade de manuseio (SILVA FILHO et al., 1994). Sistemas de resfriamento passivo são desenvolvidos para proporcionar taxas de resfriamento lentas, em torno de 0,05 °C/min (BRINSKO et al., 2000b), e manter a temperatura entre 4 e 6 °C (MORAN et al., 1992; VARNER et al., 1988).

O período de armazenamento necessário até a inseminação determina o tipo e a temperatura final do contêiner. Para períodos de armazenamento de até 12 horas após a coleta, o sêmen pode ser armazenado a 20 °C ou a 4-6 °C. Entretanto, para estocagem por tempo superior, o sêmen deve ser refrigerado entre 4 e 6 °C. O armazenamento nesta temperatura mantém a viabilidade das células espermáticas melhor que a temperaturas mais baixas, entre 0 e 2 °C (SQUIRES et al., 1999).

O primeiro sistema comercial de resfriamento de sêmen equino foi o Equitainer® (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). Desde então, vários outros contêineres têm sido desenvolvidos. Segundo Silva Filho (1998), podem ser identificadas as metodologias japonesa, holandesa, americana, francesa, alemã e brasileira, a qual inclui formas mais econômicas e igualmente eficientes de transporte de sêmen para as condições tropicais. Esses equipamentos possuem sistema de refrigeração passiva com diversas taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem. A temperatura ambiente à qual os contêineres são expostos tem impacto sobre as taxas de refrigeração e temperatura final de estocagem da amostra em seu interior, influenciando algumas características seminais (MALMGREN, 1998). Esses contêineres, em sua maioria, são muito resistentes e podem ser reutilizados, todavia o alto custo para sua aquisição e a necessidade de retorno ao haras de origem desencorajam alguns criadores a utilizá-los (BRINSKO et al., 2000b). De acordo com Douglas-Hamilton et al., (1984), o Equitainer® promove taxa de resfriamento inicial de 0,3 °C/min e temperatura final de 4 a 6 °C, que pode ser mantida por até 72 horas. Esses autores demonstraram que é possível utilizar sêmen resfriado no Equitainer® e obter alta taxa de concepção (91% ao terceiro ciclo). AVANZI et al., (2006) compararam alguns sistemas de refrigeração passiva disponíveis no mercado – Equitainer®, Botutainer®, Max- Semen®eBotu-Box® – e também não observaram diferenças entre eles quando mantidos a temperatura ambiente de 24 °C. Entretanto, esses autores relataram que apenas os sistemas Equitainer® e Botutainer® foram eficazes na manutenção da viabilidade espermática quando expostos à temperatura ambiente de 40 °C durante 24 horas.

Malmgren (1998) verificaram superioridade ($P < 0.001$) do Equitainer® em relação ao Salsbro Box® quando utilizados em temperatura ambiente de 37 °C; no Salsbro Box®, a viabilidade manteve-se na temperatura de $19,3 \pm 3,9$ °C e, no Equitainer®, na temperatura de $12,2 \pm 1$ °C. Brinsko et al. (2000b), utilizando sete contêineres, estudaram o efeito de três temperaturas ambientes, -20 °C, 22 °C e 37 °C, sobre as características do sêmen e, apesar de terem observado respostas distintas, verificaram maior impacto da temperatura de -20 °C sobre as características de refrigeração e preservação da motilidade da amostra, enquanto as demais temperaturas não diferiram entre si. No entanto, Valle et al., (1999) utilizaram o contêiner Celle modificado e observaram que a temperatura ambiente influenciou as taxas iniciais de refrigeração, as quais eram mais rápidas em condições laboratoriais, em torno de 22 °C, que aquelas obtidas após transporte rodoviário quando havia insolação direta sobre o contêiner, cujos valores eram de -0,25 °C e -0,11 °C, respectivamente.

Atualmente, no Brasil, existem alguns modelos de contêiner comercialmente

disponíveis: Botu-Box® (mantém a 15 °C) e Botutainer® (mantém a 5 °C), fabricados pela Biotech Botucatu; Max-Sêmen Express® revendido pela E.H.G. Agrofarma; Cia Semen® (Cia do Sertão). Outros contêineres podem ser encontrados no exterior, como: Equitainer I®, Equitainer II®, Equitainer III®, ExpectaFoil®, Bio-Flite®, Lane STS®, Equine Express®, Foal Flight®, Celle®, Sarstedt® e Salsbrobox®.

Nunes et al., (2004) desenvolveram contêineres de baixo custo, CP1 e CP2 (US\$ 10,00), e observaram boa manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen resfriado por 24 horas nestes contêineres e validaram a utilização do sistema CP para áreas tropicais. Melo et al., (2006) verificaram superioridade do Equitainer® em relação ao Max-sêmen Express® na manutenção da motilidade total e progressiva de sêmen equino resfriado por 24 horas. Essa superioridade pode estar relacionada à menor temperatura de manutenção do Equitainer® (6 °C) em relação ao Max-SêmenExpress® (16 °C), o que diminuiu metabolismo da célula espermática. Entretanto, esses autores não notaram diferença na integridade da membrana plasmática do sêmen acondicionado nesses dois contêineres.

3.2.2 Curvas de resfriamento

Os fatores mais críticos no resfriamento do espermatozoide são a velocidade e a temperatura a qual o sêmen será resfriado. O sêmen diluído de garanhões pode ser resfriado rapidamente de 37 °C a 20 °C sem causar danos aos espermatozoides (KAYSER, 1991). Varner et al., (1989) verificaram que taxas de resfriamento mais lentas ($0,240 \pm 0,042$ °C/min), durante os primeiros 15 minutos proporcionam os melhores valores de motilidade em comparação a taxas muito rápidas ($1,091 \pm 0,003$ °C/min; $P < 0,05$). O resfriamento de 37 a 8 °C utilizando temperaturas superiores a 0,3 °C/min pode resultar em “choque térmico”, caracterizado principalmente por movimentos anormais, rápida perda de motilidade durante o armazenamento e por danos à membrana acrossomal, ocasionados pela perda de enzimas e conteúdo intracelular (MORAN et al., 1992). O espermatozoide equino é mais sensível ao choque térmico entre 19 e 8 °C (MORAN et al., 1992). Taxas de resfriamento mais lentas são recomendadas abaixo de 20 °C para evitar a ocorrência de choque térmico (VARNER et al., 1988). Kayser (1991) também reportaram que taxa de resfriamento de 0,05 °C/min entre 20 e 5 °C mantém a porcentagem máxima de espermatozoides móveis. Adicionalmente, Heisnaken et al., (1987) verificaram que taxas de resfriamento lentas (0,02 e 0,04 °C/min) resultam em taxas de fertilidade aceitáveis. O resfriamento do sêmen diluído sob condições de anaerobiose reduz a taxa metabólica dos espermatozoides e as vias metabólicas aeróbicas, aumentando o tempo de manutenção da viabilidade e motilidade espermática (BATELLIER et al., 2001).

3.2.3 Diluidores de sêmen

O sêmen é composto de células espermáticas e plasma seminal, o qual contém substâncias benéficas ao espermatozoide, mas não é um meio ideal para o armazenamento de espermatozoides equinos (VARNER et al., 1987; JASKO et al., 1991; MOORE et al., 2005b). Para se obter boa capacidade fertilizante do espermatozoide armazenado resfriado, é recomendada a adição de um diluidor seminal ao sêmen fresco (VARNER, 1986).

Os diluidores seminais reduzem a concentração de plasma seminal, controlam o pH e a osmolaridade, suprem de nutrientes e antimicrobianos, além de proteger o espermatozoide do choque térmico durante o armazenamento. O controle do pH e da osmolaridade é importante, pois, quando esses parâmetros do sêmen equino se encontram fora dos padrões normais (pH: $7,74 \pm 0,15$ e osmolaridade: 331 mOsm), pode haver redução da motilidade progressiva, que, no caso do pH alto e da osmolaridade inferior ou superior, se torna um processo irreversível (GRIGGERS et al., 2001).

A adição de substâncias quelantes, como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), que se ligam ao Ca^{2+} Mg^{2+} , reduz a perda de íons intracelulares, amenizando as lesões causadas pelo choque térmico (AMANN e GRAHAM, 1993). O uso de indutores de funcionalidade, como as metilxantinas (teofilina, cafeína e pentoxifilina), pode aumentar a motilidade espermática, resultante do aumento intracelular da adenina monofosfato cíclica (AMPC) e da guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (GOULART et al., 2004).

A maioria dos extensores seminais é a base de leite ou gema de ovo. O maior problema dos extensores contendo essas bases é que, por suas substâncias biológicas, podem diferir entre lotes/partidas. Outros componentes benéficos ao espermatozoide podem ser adicionados ao diluidor, como fontes energéticas, substâncias tamponantes e antibióticos. Alguns extensores com componentes mais bem definidos já foram desenvolvidos (INRA96[®] - IMV Technologies, França; EquiPro[®] - Minitub, Alemanha).

Brinsko et al., (2000b) avaliaram a utilização de diluidor à base de leite (E-Z Mixin) no armazenamento do sêmen equino resfriado no Equitainer[®] por 24 e 48 horas e verificaram que o diluidor foi eficiente em manter o sêmen até 24 horas, porém houve grande perda de motilidade progressiva (65% de perda) depois de 48 horas de resfriamento.

A escolha do diluidor deve ser baseada no sistema de inseminação realizada, no tempo de estocagem, na temperatura de estocagem e na individualidade de resposta do garanhão ao resfriamento (PAGL et al., 2006).

3.2.3.1 Antimicrobianos

A superfície do pênis e do prepúcio do garanhão é habitada por uma grande variedade de bactérias comensais e por algumas espécies patogênicas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Taylorella equigenitalis*) que podem promover endometrites na fêmea equina e redução na qualidade seminal, ocasionando subfertilidade dos garanhões (PICKETT et al., 1999). A utilização de diluidores seminais contendo antimicrobianos é recomendada, tanto para o sêmen fresco como para o resfriado, já que pode controlar o crescimento de microrganismos, mantendo a qualidade seminal e evitando o desenvolvimento de infecções no trato genital da fêmea (VARNER et al., 1998; PICKETT et al., 1999).

Vários agentes antimicrobianos têm sido utilizados no sêmen equino: amicacina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, ácido nalidíxico, polimixina B, estreptomicina, tircacilina, penicilina G e ceftiofur. Back et al., (1975) utilizaram um ejaculado de sete garanhões para avaliar o efeito de oito antibióticos (eritromicina, sulfato de gentamicina, ácido nalidíxico, sulfato de kanamicina, lincomicina, penicilina G sódica, polimixina B e sulfato de estreptomicina) sobre a motilidade progressiva espermática. Esses antibióticos foram avaliados sob várias concentrações (0, 250, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500 UI ou µg/mL do diluidor) e a motilidade espermática foi avaliada após 0, 2, 4 e 6 horas a diluição do sêmen fresco e 12, 24, 48 e 72 horas de resfriamento do sêmen a 5 °C. Esses autores verificaram que o sulfato de estreptomicina teve efeito deletério no sêmen fresco quando adicionado em altas concentrações (1.500, 2.000 e 2.500µg/mL), ao passo que os demais tiveram efeito semelhante na manutenção da motilidade, tanto no sêmen fresco como no resfriado, mas promoveram melhores efeitos quando utilizados em baixas concentrações (0 a 1.000 UI ou µg/mL).

Hoyumpa et al., (1992) e Varner et al., (1992), em estudos sobre os efeitos de antibióticos na redução do número de colônias de diversos tipos de bactérias (aeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas e anaeróbias), evidenciaram que a combinação de penicilina G potássica e amicacina teve efeito melhor que o uso isolado da penicilina e da amicacina no sêmen resfriado a 5 °C.

Varner et al., (1998), avaliando o sêmen de garanhões, diluído com antibióticos e resfriado no Equitainer[®] por 12 e 24 horas a 5 °C por meio de cultura bacteriana e da motilidade progressiva espermática, verificaram superioridade da amicacina e gentamicina G potássica em relação aos demais (penicilina G sódica, tircacilina dissódica, sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina, sulfato de estreptomicina e polimixina B). A polimixina B promoveu maior redução da motilidade progressiva após o resfriamento quando o sêmen foi armazenado por 24 horas.

A utilização de amicacina (1.000 UI/mL) ou penicilina G potássica (1.000 UI/mL), ou de ambas, para o controle do crescimento bacteriano no sêmen equino resfriado foi recomendada por Pickett et al., (1999). Esses autores relataram que pode haver interação entre o sêmen de diferentes garanhões e determinados tipos de antimicrobianos.

Outro constituinte que pode ser adicionado ao diluidor é a D (+) manose, que tem o efeito de reduzir a aderência bacteriana ao endométrio da fêmea, constituindo uma forma alternativa de profilaxia a endometrites causadas após a inseminação. A D (+) manose não interfere na viabilidade e fertilidade do sêmen diluído com diluidores à base de leite em pó (King et al., 2006).

3.2.3.2 Leite desnatado

Os diluidores à base de leite desnatado são usados rotineiramente na diluição, centrifugação e no resfriamento do sêmen equino. O fracionamento do leite por diversos métodos (microfiltração, ultrafiltração, diafiltração ou secagem) é realizado para purificar algumas frações do leite. O leite em pó desnatado é desprovido de lipoproteínas, mas também protege a célula espermática durante o armazenamento. Vários estudos indicam que os componentes ativos envolvidos na proteção do espermatozoide pelo leite são as micelas de caseína, que interagem com as proteínas BSP, que, por sua vez, podem promover a retirada de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática (BERGERON e MANJUNATH, 2006). O fosfocaseinato e a β - lactoglobulina são os componentes com maior influência positiva sobre o espermatozoide. Entretanto, o mecanismo de ação desses componentes ainda não é conhecido (BATTELIER et al., 1998; 2001).

O leite desnatado pode ser beneficiado como leite UHT (*ultra-high- temperature*) ou como leite em pó. Na fração proteica do leite, há fatores tóxicos ao espermatozoide (HOUSEHOLDER et al., 1981; EVANS e MAXWELL, 1987), como a lactenina, uma proteína de baixo peso molecular e bactericida para cepas de *Streptococcus* spp. no leite fresco, a qual seria inativada a +92 °C por 10 minutos (FLIPSE et al., 1954). De acordo com EVANS e MAXWELL (1987), o leite UHT não precisa ser inativado previamente quando utilizado como diluente de sêmen, ao contrário do leite em pó reconstituído.

Entretanto, Meirelles et al., (1998) compararam a utilização de diluidores à base de leite em pó e leite UHT submetidos ou não a inativação por tratamento térmico e, contrariando os achados de EVANS e MAXWELL (1987), não observaram diferenças na motilidade espermática progressiva, na motilidade total e na fertilidade entre o leite desnatado inativado e o leite desnatado não- inativado, o que indica que o processo de inativação não é necessário quando se utiliza leite em pó. A lactenina, fator tóxico ao espermatozoide, é inativada pelo

calor, aparentemente pela liberação de grupos sulfídricos das lactoglobulinas que posteriormente se juntam à lactenina, eliminando seu fator tóxico (JOHNSON et al., 1955). É possível que, nos processos atuais de beneficiamento do leite em pó, ocorra inativação da lactenina (MEIRELLES et al., 1998). A desnecessidade do tratamento térmico do leite em pó dispensa um processo dispendioso, que pode constituir fonte de erro (PICKETT e AMANN, 1987) e que possibilita o rápido preparo do diluente com produtos comercialmente disponíveis (MATTOS, 1994). O leite em pó desnatado reconstituído, desde que preparado com ingredientes de boa qualidade, apresenta resultados de preservação da motilidade e da fertilidade satisfatórios e constantes (MEIRELLES et al., 1998).

Um diluidor contendo componentes definidos (INRA96) foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores franceses e manteve eficientemente a longevidade de espermatozoides equinos durante o período de estocagem a baixas temperaturas, o que permitiu taxas de gestação por ciclo semelhantes às obtidas com diluidores à base de leite em pó (BATTELIER et al., 1998;2001).

Pagl et al. (2006) avaliaram a utilização de um diluidor contendo caseinatos, proteínas específicas do soro e vários açúcares (EquiPro[®], Minitub, Tiefenbach, Germany), em comparação a um diluidor de leite em pó desnatado (KENNEY et al., 1975), e não notaram diferença na viabilidade do sêmen armazenado por até 72 horas a 4 °C.

Em estudo, Farrás et al., (2008) avaliaram a utilização de dois diluidores comerciais à base de leite desnatado (Botu-sêmen[®] e Botubox[®]) e um diluidor à base de frações do leite (INRA96[®]) resfriados em dois sistemas de resfriamento nacionais (Botutainer[®] e Botu-turbo[®]) e não observaram diferença na motilidade espermática total e progressiva nem na integridade de membrana (epifluorescência) entre os três diluidores.

Comercialmente é possível encontrar alguns diluidores seminais à base de leite desnatado ou de seus constituintes, como: Botu-sêmen[®] (Biotech Botucatu-Brasil); Botu-turbo[®] (Biotech Botucatu-Brasil); Max-Sêmen Plus[®]; Equimix[®] (Nutricell); EquiPro[®] (Minitub-Alemanha); EZ Mixin[®] (CST, Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA); INRA82[®]; INRA 96[®]; Kenney[®], entre outro.

3.2.3.3 Gema de ovo

A gema de ovo em associação a outros componentes do diluidor pode ajudar os espermatozoides a resistir ao choque térmico (BOGART e MAYER, 1950; AMIRAT et al., 2004). Esse efeito pode ser atribuído principalmente à lipoproteína de baixa densidade, LDL – (PACE e GRAHAM, 1974; WATSON, 1975; QUINN et al., 1980; GRAHAM e FOOTE,

1987; BABIAK et al., 1999; BERGERON e MANJUNATH, 2006), que interage principalmente com as proteínas de membrana (proteínas BSP), constituindo o principal mecanismo de proteção do sêmen bovino (BERGERON et al., 2004), além de incorporar-se à membrana espermática, promovendo sua maior estabilidade (MANJUNATH et al., 2002).

Entretanto, na sua composição, a gema de ovo possui substâncias indesejáveis e tem algumas desvantagens quando utilizada na forma integral nos diluidores – opacidade óptica, causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato à avaliação microscópica; prejuízo causado à respiração do espermatozoide (TOSIC e WALTON, 1946); diminuição da motilidade espermática (PACE e GRAHAM, 1974), pois pode transportar microrganismos patogênicos (BOSSEAU et al., 1998).

Estudos têm sido realizados com gema de ovo centrifugada ou apenas com a LDL extraída da gema de ovo. Rota et al., (2004) verificaram superioridade na motilidade progressiva e na velocidade de espermatozoides equinos resfriados por 24 horas quando adicionaram gema de ovo centrifugada (2%) a um diluidor à base de leite em pó desnatado. Rota et al., (2008) compararam esse mesmo diluidor contendo 2% de gema de ovo centrifugada (INRA 82Y) com dois diluidores à base de constituintes do leite (INRA 82 e INRA 96) no resfriamento do sêmen de jumentos até 72 horas e também verificaram superioridade na motilidade espermática total e progressiva e na velocidade dos espermatozoides utilizando o INRA82Y após 48 e 72 horas de resfriamento em relação aos outros dois diluidores. Outros autores, no entanto, verificaram desvantagem no uso de diluidores à base de gema de ovo (PROVINCE et al., 1984) ou da adição de gema de ovo em diluidores à base de leite desnatado (BRUEMMER et al., 2002).

Em estudo comparando um diluidor à base de gema de ovo (meio Baken) com um diluidor à base de leite em pó (Kenney), Melo et al., (2005) concluíram, com base no teste hiposmótico, que o diluidor à base de gema de ovo preservou melhor a membrana plasmática que o diluidor à base de leite desnatado. Melo e Henry (1999), com base no teste supravital, também verificaram superioridade de um diluidor contendo gema de ovo na manutenção da integridade da membrana plasmática. Palm et al., (2006) constataram que o uso de um diluidor comercial à base de gema de ovo (Gent extender; Minitub- Alemanha), em comparação ao EquiPro[®] (Minitub-Alemanha), resultou em menor número de leucócitos no endométrio de éguas 12 horas após sua infusão no útero, o que possivelmente refletiu em menor ocorrência de endometrites no útero.

3.3 Diluição e qualidade seminal

Uma das grandes falhas no processo de resfriamento do sêmen é a diluição. No sêmen fresco geralmente se utiliza diluição de 1:1 ou 2:1 (diluidor : sêmen), todavia, para o resfriamento, o sêmen deve ser diluído a taxas de diluição maiores para suprir energeticamente e proteger o sêmen durante o armazenamento (VARNER, 1986; JASKO et al., 1991). O mais importante seria que o ejaculado fosse diluído na concentração de 25 milhões de espermatozoides/mL. Pesquisadores na Universidade do Texas A&M demonstraram superioridade da diluição do sêmen a 25 milhões em comparação à diluição a 50 ou 100 milhões de espermatozoides/mL. Grandes Diluições (menos de 25×10^6 espermatozoides viáveis/mL) promovem baixa motilidade e fertilidade do sêmen resfriado (VARNER et al., 1987).

A importância na manutenção de uma concentração de 25 a 50 milhões de espermatozoides viáveis/mL é comprovada na hora da inseminação, visto que doses inseminantes com grande volume e baixa concentração podem promover redução na fertilidade, portanto, são aconselháveis doses com volumes entre 10 e 30 mL dentro da concentração espermática recomendada (VARNER et al., 1987).

Um fator importante a ser considerado ao estabelecer a taxa de diluição é que o efeito deletério do plasma pode ocasionar baixa viabilidade após o resfriamento em alguns animais (resfriadores ruins) e, neste caso, são indicadas taxas de diluição maiores ($> 3:1$). Entretanto, alguns animais que são oligospermos apresentam baixa motilidade e viabilidade espermática com altas taxas de diluição (efeito diluição), assim, torna-se mais recomendável a retirada de parte desse plasma por centrifugação e posteriormente do sobrenadante (BRINSKO et al., 2000a). O processo de centrifugação, no entanto, pode ocasionar injúrias na célula espermática, por isso, é indicado somente nestes casos.

3.4 Efeitos da centrifugação e retirada do plasma seminal

A centrifugação pode causar efeitos no sêmen, como redução na motilidade e perda de espermatozoides (10 a 30%), porém ambos variam de acordo com a temperatura, diluidor, volume, tempo e força de centrifugação e volume do sobrenadante deixado no sedimento (JASKO et al., 1991; VIDAMENT et al., 2000).

A força e o tempo de centrifugação podem influenciar também a integridade de membrana. Dell'aqua Jr. et al., (2001) testaram três forças de centrifugação (600g, 800g e 1000g) e tempos (3min, 5min e 10min) quanto a motilidade e integridade de membrana. Os autores encontraram valores significativamente menores ($P < 0,05$) nas forças de 800g e 1000g

por 10 min, e concluíram que, dentre as técnicas avaliadas, a melhor é a de 600g/10min.

Padilla e Foote (1991) compararam o sêmen refrigerado a 4 °C por até 72 horas, com ou sem plasma seminal, retirado por centrifugação, e diluído somente em diluidor a base de leite ou neste suplementado com meio de Tyrode modificado. Os autores observaram que a motilidade dos espermatozóides diluídos em diluidor a base de leite suplementado com Tyrode modificado, foi superior. Porém, quando o plasma seminal foi mantido, este tratamento teve motilidade diminuída, sugerindo uma possível interação entre os componentes do diluidor e o plasma seminal.

Resultados semelhantes foram encontrados por Webb e Arns (1995), sendo que esses últimos recomendam o uso deste diluidor suplementado no sêmen de garanhões que necessitam de centrifugação devido a baixa concentração espermática, ou cujo plasma seminal precisa ser removido devido a prováveis efeitos tóxicos na viabilidade do sêmen refrigerado.

Moore et al., (2005a) verificaram que a exposição do sêmen por 15 minutos a diferentes concentrações de plasma seminal, entre 0 a 80%, antes da criopreservação, não interferiu na motilidade total, progressiva e integridade da membrana plasmática. Neste mesmo estudo, a incubação por 2 a 6h com 20% de plasma seminal foi deletéria à motilidade espermática quando comparada à preservação com 5%.

Todd et al., (2001) testaram cinco concentrações de plasma seminal (0%, 1,25%, 2,5%, 5%, 10% e 20%) na manutenção da motilidade progressiva do espermatozóide refrigerado por até 48h, e constataram os melhores valores para 1,25% e 2,5% após 24h e para as concentrações menores que 5% após 48h ($P < 0,05$). Já Keller et al., (2001) utilizaram três concentrações de plasma seminal (1,95%, 6,29% e 17,78%) no sêmen preservado a 4 °C por até 72h, e constataram melhores valores de motilidade na menor concentração e também nas amostras centrifugadas. Entretanto, Schmitt et al., (2003) não encontraram efeito significativo de quatro concentrações de plasma seminal (0%, 2,5%, 5% e 10%) na motilidade.

Brinsko et al., (2000a) constataram que a centrifugação com posterior remoção do plasma seminal é benéfica principalmente para garanhões cujo ejaculado sofre uma redução acentuada da motilidade progressiva espermática quando processado da maneira convencional, especialmente para sêmen refrigerado por mais de 24h. O mesmo foi encontrado por Fogal et al., (2006).

Estudos realizados com sêmen diluído com diluidores diferentes, centrifugado (600g/10min) e refrigerado 5 °C, relatam uma melhor manutenção da qualidade espermática por até 96h (CARVALHO, 2003).

Love et al., (2005) obtiveram melhor preservação da motilidade espermática e da integridade do DNA no espermatozóide refrigerado por até 48h na ausência de plasma seminal, sendo que diluidor a base de leite com suplementação de sais obteve melhores resultados do que o sem suplementação.

Webb e Humes (2006) comparam a motilidade do sêmen equino refrigerado por até 72h em três diluidores comerciais (Keney, INRA 96®, VMD-Z®), submetidos ou não à centrifugação para remoção do plasma seminal. Não houve aumento significativo da motilidade espermática quando o plasma seminal foi removido, porém maiores valores foram encontrados para os espermatozóides em diluidor a base de sais com suplementação de proteína do leite (INRA 96®) e sem o plasma seminal, sugerindo que combinação entre o procedimento e o diluidor pode influenciar na motilidade do sêmen refrigerado.

Pagl et al. (2006), utilizando diluidor a base de proteínas do leite, verificaram porcentagens maiores de espermatozóides móveis no sêmen centrifugado, porém não houve diferença quanto à velocidade espermática. Os autores sugerem que as características do movimento individual dos espermatozóides não são afetadas pela centrifugação.

3.5 Efeito do garanhão na refrigeração do sêmen

Dentre os animais das espécies domésticas, o cavalo é o que mais se assemelha aos humanos no que diz respeito à clínica da reprodução. Os cruzamentos de cavalos raramente incluem a fertilidade como um critério de seleção, isto acarreta num número significativo de reprodutores com baixo desempenho reprodutivo ou subfêrteis (LOOMIS, 2006).

A seleção de reprodutores geralmente é feita pelo padrão racial e performance atlética, o que leva à utilização de garanhões subfêrteis. Apesar das características reprodutivas terem herdabilidade moderada, a utilização destes garanhões pode perpetuar na população genes particularmente indesejáveis sob o aspecto reprodutivo (AMANN; GRAHAM, 1993).

Variações individuais entre os garanhões, como na composição do plasma seminal e das membranas espermáticas, podem interferir na manutenção da motilidade espermática e integridade da membrana plasmática durante o processo de refrigeração, podendo ocasionar redução na taxa de fertilidade (BATELLIER et al., 2001; BRINSKO et al., 2002; MOORE et al., 2005a; KARESKOSKI et al., 2006).

A influência do plasma seminal heterólogo na motilidade espermática no sêmen refrigerado e congelado já foi detectada por alguns autores, sendo notado um efeito benéfico na adição de plasma seminal de garanhões com alta motilidade ao ejaculado de garanhões com baixa motilidade (AURICH et al., 1996; VIANNA et al., 2002; MATTOS et al., 2003).

A sensibilidade ao choque frio também varia consideravelmente entre garanhões e mesmo entre ejaculados. Em alguns animais, a fertilidade do sêmen refrigerado por 24 horas pode reduzir a ponto de inviabilizar seu uso para transporte, sendo então recomendado a inseminação logo após a colheita (AURICH, 2005).

De acordo com a suscetibilidade do sêmen a refrigeração, Brinsko et al., (2000a) classificaram o ejaculado dos garanhões variante entre baixa e alta qualidade. Os garanhões com sêmen de baixa qualidade apresentam redução superior a 40% da motilidade progressiva inicial após 24 horas de armazenamento.

Metcalf (1998), ao usar sêmen refrigerado na inseminação artificial, verificou que a qualidade do ejaculado interferia nas taxas de prenhez. O autor analisou a motilidade progressiva, morfologia espermática, número de espermatozoides viáveis e concentração, então classificou o sêmen em excelente, bom, regular ou ruim, que obtiveram índices de gestação de 87,5% (14/16), 62% (18/29), 33% (6/18) e 11% (2/18), respectivamente.

3.6 O mel

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2000), mel é [...] o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia [...] A hipótese de que este produto possua propriedades terapêuticas tem contribuído para que seja utilizado como agente de terapia natural devido às suas ações antibacteriana, antibiótica, anticárie, anti-inflamatória, antimicrobiana, bioestimulante, depurativa, emoliente, energética, imunoestimulante e cicatrizante (WAILI-AL, 2004; AL et al., 2009).

A composição do mel depende, principalmente, das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também de diferentes fatores, como o solo, a espécie da abelha, o estado fisiológico da colônia, o estado de maturação do mel, as condições meteorológicas por ocasião da colheita, entre outros. A Tabela 1 apresenta a composição química e físico-química de algumas variedades de méis. A legislação brasileira define os padrões para o mel de abelhas melíferas, estabelecendo os requisitos mínimos de qualidade que o mel destinado ao consumo humano deve possuir: açúcares redutores (calculados como açúcar invertido), mínimo de 65g:100g, para o mel floral, e mínimo de 60g:100g, para o melato ou mel de melato e sua mistura com mel floral; umidade máxima de 20g:100g; sacarose aparente para o mel floral máxima de 6 g:100g e para o melato ou mel de melato e sua mistura com mel

floral máximo 15g:100g; sólidos insolúveis em água máximo de 0,1g:100g ., exceto no mel prensado, que se tolera até 0,5g:100g, unicamente em produtos acondicionados para sua venda direta ao público; minerais (cinzas) máximo de 0,6g:100g para o mel floral e máximo de 1,2g:100g no melato ou mel de melato e suas misturas com mel floral. Além disso, o mel deve necessariamente apresentar grãos de pólen. Em relação à deterioração, o mel não deve ter indícios de fermentação, apresentar acidez máxima de 50 mil equivalentes por quilograma, atividade diastásica: como mínimo, 8 na escala de Göthe e teor de hidroximetilfurfural máximo de 60 mg:kg.

Tabela 1 - Variação dos parâmetros químicos e físico-químicos de mel de abelha por diferentes autores.

Parâmetros	Alves et al. 2005	Evangelista et al. 2005	Souza et al. 2004	Silva et al. 2004	Marchini et al. 2005
Umidade (%)	23,14-32,50	18,06-25,26	26,80-32,00	17,6-19,7	16,00-23,40
Hidroximetilfurfural (mg.Kg-1)	0,52-16,54	18,92-23,90	0,52-7,93	0,30-8,96	1,00-122,00
Açúcares redutores (%)	64,29-82,10	n.d.	66,00-76,20	68,92-85,49	53,20-80,00
Sacarose (%)	0,61-6,19	n.d.	1,13-8,35	1,57-3,07	0,20-27,40
Viscosidade (mPa.s)	24,00-116,00	n.d.	36,00-168,00	n.d.	n.d.
Condutividade (S.cm-1)	267,50-462,00	n.d.	287,50-525,00	n.d.	160,71-1251,67
pH	3,16-3,54	3,85-4,66	3,14-3,40	3,54-5,30	2,30-5,00
Acidez (meq.Kg-1)	18,50-62,50	28,33-41,66	21,50-80,50	10,10-31,03	14,00-75,50
Índice de formol (mL.Kg-1)	3,16-3,54	n.d.	3,50-10,00	n.d.	5,00-20,50

n.d. = não determinado

A composição exata de qualquer mel depende principalmente das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também do tempo, solo e outros fatores, por isso dois méis nunca são idênticos. O mel varia muito de uma região para outra, tanto em conteúdo polínico como em características físico-químicas, e isso é explicado por ele ter origem em mais de 2500 tipos de flores de plantas diferentes.

3.7 Avaliação de sêmen de garanhões

Existem muitas características inerentes à célula espermática e etapas necessárias para que o espermatozoide possa fecundar o oócito, entre elas, destacam-se: motilidade progressiva, morfologia normal, metabolismo suficiente para produção de energia, integridade

das membranas plasmática e acrossomal, capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação do acrossoma, penetração no citoplasma e capacidade do núcleo se descondensar e permitir o desenvolvimento embrionário (AMANN e HAMMERSTEDT, 1993). Uma estimativa do potencial de fertilização da amostra de sêmen pode ser obtida pela identificação e avaliação dessas características, correlacionando-as com a fertilidade *in vivo* (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

Ainda não existe um teste capaz de prever a capacidade fecundante dos espermatozoides. Assim, pesquisadores têm buscado a melhor associação de testes estruturais e funcionais para estimar a integridade das células espermáticas e que apresente alta correlação com as taxas de prenhez (JANUSKAUSKAS et al., 2001).

Avaliações convencionais do sêmen fresco ou processado incluem a determinação do volume do sêmen livre de gel, da concentração de espermatozoides por mL, da motilidade, do vigor (velocidade) e da morfologia espermática. Outros testes complementares, como o supravital, o hiposmótico, o de sondas fluorescentes e o de termorresistência, podem e são utilizados em laboratórios e em centrais de reprodução. Todos os testes laboratoriais são utilizados visando prever a capacidade fecundante do sêmen. Entretanto, esses parâmetros de avaliação muitas vezes não são correlacionados à fertilidade do garanhão. As avaliações laboratoriais permitem diferenciar um sêmen de boa e de má qualidade, porém a boa qualidade de um sêmen bom não é garantia de fertilidade aceitável (COLENBRANDER et al., 2006).

Vigor é a intensidade de movimentação do espermatozóide individualmente. A avaliação normalmente é realizada em conjunto com a motilidade sendo definido como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozoides móveis. A escala de avaliação varia de zero a cinco, em que zero representa células paradas e cinco, movimento vigoroso e de alta velocidade (BARBOSA et al., 2005).

A motilidade espermática é o parâmetro espermático mais utilizado na avaliação do sêmen, definida como a avaliação subjetiva do percentual de espermatozoides móveis (SEAGER e FLETCHER, 1972). O exame é realizado em microscópio óptico com objetiva de 10 ou 40 vezes de aumento, observando-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas, podendo ser avaliada imediatamente após a colheita ou após a refrigeração do sêmen (BARBOSA et al., 2005).

Pressupõe-se, com base nesses estudos, que as características seminais podem determinar em muitos casos a fertilidade do garanhão e principalmente sua eficiência reprodutiva. Muitos aspectos, no entanto, ainda são contraditórios e inviabilizam o

diagnóstico preciso da fertilidade de determinados garanhões (VOSS et al., 1993).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período de experimentação

O experimento foi desenvolvido durante o mês de outubro de 2019, na cidade de Ceará-Mirim mais precisamente na comunidade rural de Muriú, localizada na região leste potiguar na microrregião de Macaíba no estado do Rio Grande do Norte, nas coordenadas 5°33'22.6"S 35°15'06.6"W, temperatura média de 25.7 °C e a pluviosidade média anual de 1107 mm, com classificação de savana tropical sendo classificado como Aw (fonte: Instituto de Geociências Aplicadas –IGA, 2019).

Figura 1 - Esquema de funcionalidade da propriedade: (A) Pista de treinamento dos animais, (B) casa sede da propriedade, (C) baias dos garanhões e almoxarifado de rações, (D) Galpão de forragem.



Fonte: Modificado Google Earth (2019)

4.2 Animais e alimentação

Foram utilizados no presente trabalho cinco reprodutores Quarto de Milha, todos de disputa na modalidade vaquejada, com idade entre quatro a quinze anos de vida selecionados antes do início do experimento por exame andrológico e histórico reprodutivo de fertilidade

comprovada, mantidos em baia com 5.0×3.0 m, onde foram alimentados com capim-elefante triturado previamente sendo fornecido duas vezes ao dia, concentrado três vezes ao dia totalizando 4.0 kg por animal dia, além de sal mineral e água de boa qualidade *ad libitum* conforme recomendações do NRC (2007).

4.3 Delineamento experimental

4.3.1 Colheita e diluição do sêmen

Foram realizadas cinco colheita de sêmen de cada garanhão três vezes por semana, com intervalo de 48 horas, com auxílio de vagina artificial, modelo Botucatu, composta por um tubo rígido de PVC, tubo flexível de látex, camisa sanitária descartável e copo coletor com filtro de náilon acoplado para obtenção da fração livre de gel. A metodologia empregada foi a colheita fechada e a temperatura da vagina artificial em torno de 42 – 44 °C utilizando uma égua em estro induzido com aplicação de 10mg IM profundo de cipionato estradiol (Zoetis^{BR}, ECP), como manequim, no momento da monta, o pênis ereto foi desviado em direção da vagina artificial. A ejaculação foi detectada pelos jatos ejaculatórios, verificados com a palma da mão na porção ventral do pênis ou observação dos movimentos da cauda. Após as colheitas eram separados uma alíquota de 1,5ml de sêmen para formação de grupo controle, estes eram diluídos em 3ml de diluidor Botu sêmen transporte® sem o acréscimo de mel orgânico, diluente a base de gema de ovo e leite desnatado, a metodologia de diluição seguia a ordem de 2:1 (diluidor: sêmen), o total resultante de 4,5 ml de amostras foi distribuída em três micro tubos de 1,5 ml cada com identificação do reprodutor, formando assim os grupos controle de avaliação 12, 24 e 36 horas.

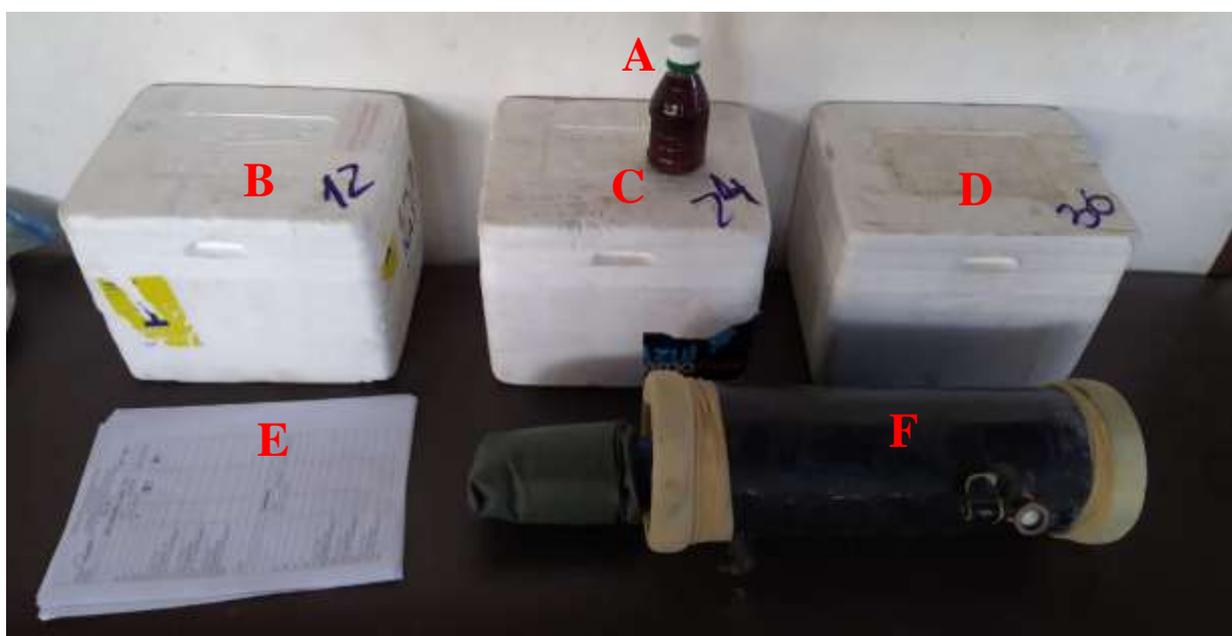
Posteriormente o mesmo ejaculado era utilizado para formação de grupos de experimentais, sendo separados o equivalente a 30ml de diluidor Botu sêmen transporte® e adicionado com auxílio de seringa de insulina um total de 0,3 ml de mel de abelha equivalente a 1,0% como extensor do diluidor, deste volume será utilizado o 6,0ml por garanhão para formulação de grupos com centrifugação 3,0ml, grupos 1,3 e 6, e sem centrifugação 3,0 ml, grupos 2,4 e 5 ou seja 1,0 ml por micro tubo de armazenamento, obedecendo a regra de diluição adotada no presente experimento os mesmo tubos recebiam uma quantidade de 0,5 ml de sêmen cada amostra, finalizando assim a formulação de 2:1 (diluidor: sêmen).

Para a centrifugação foi utilizado 5,0 ml de sêmen de cada garanhão acrescido de 10 ml de diluidor, por amostra, esta previa diluição não foi realizada com acréscimo de mel, porém faz se necessária para proteção dos espermatozoides durante o procedimento, a velocidade e tempo utilizada durante foi de (1200g/10min), por fim o plasma seminal foi

retirado juntamente com o diluidor, no sobrenadante, apesar de não ter sido estipulada a concentração de plasma residual, após a centrifugação, permanecendo apenas uma quantidade mínima junto ao sedimento, sendo posteriormente ressuspensionado com diluidor com acréscimo de 1,0% de mel e divididos em grupos de avaliação.

Ao termino as amostras eram colocadas em ordem de tempo para posteriormente avaliação, no container de transporte Botuflex® divididos em 12, 24 e 36 horas, todos com temperatura de conservação de 5 °C onde segundo o fabricante a viabilidade seminal é prolongada até 36 horas.

Figura 2 - Esquema de funcionamento do experimento: (A) Mel, utilizado durante o experimento, (B) Caixa de resfriamento de sêmen modelo Botu Flex, contendo as amostras do grupo controle de cada garanhão para análise com 12 horas e grupos G1 centrifugado e G2 sem centrifugação, (C) Container 24 horas contendo grupo controle e G3c e G4s, (D) Grupo controle e G5c e G6s avaliação com 36horas, (E) Planilha de controle de avaliações, (F) Vagina artificial utilizada no experimento, modelo Botucatu.



Fonte: O Autor

4.3.2 Avaliação do sêmen diluído e resfriado

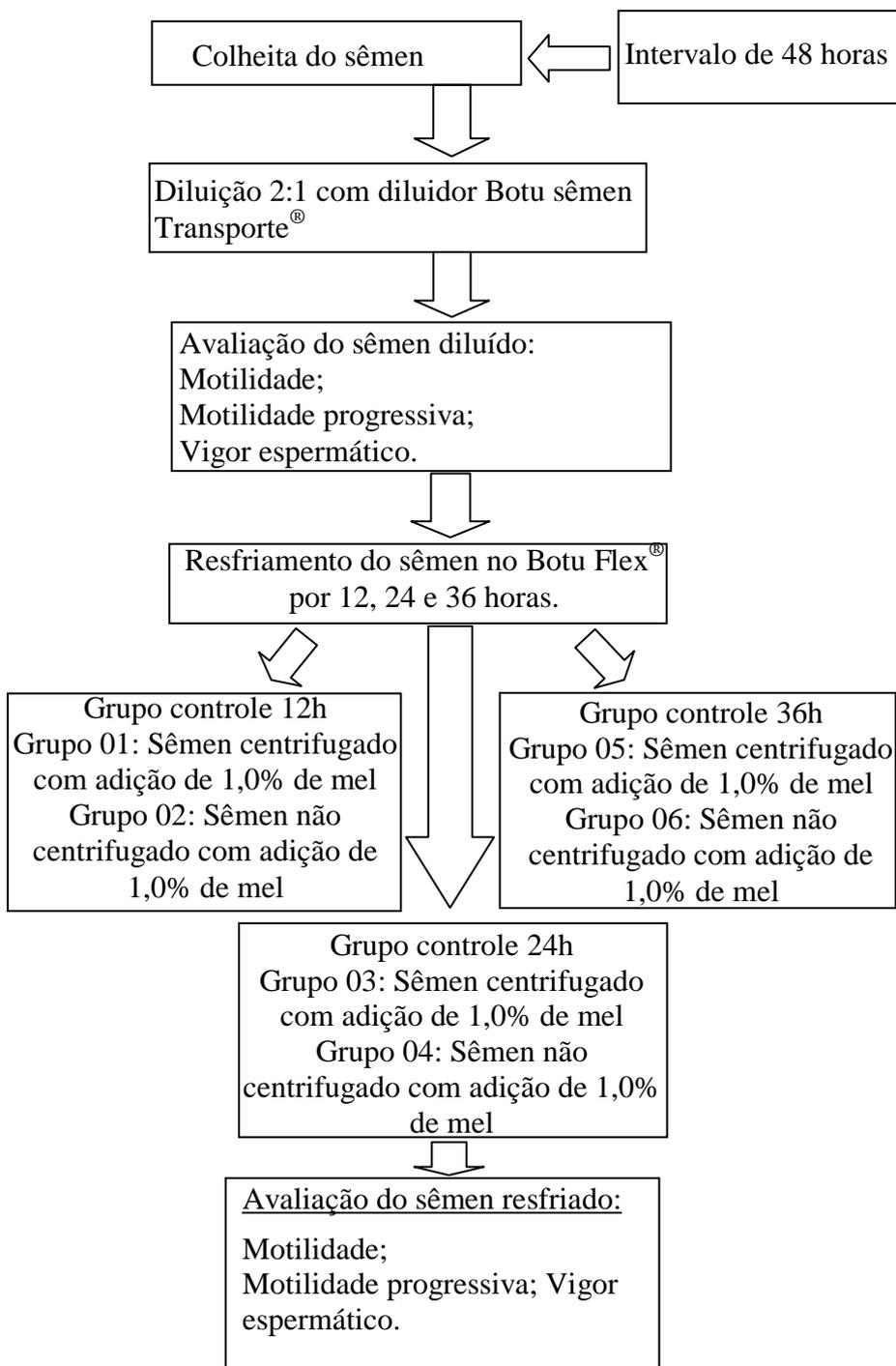
Os parâmetros físicos de motilidade total, motilidade progressiva e vigor do sêmen fresco e diluído e resfriado foram avaliados em microscópio óptico com aumento de 400 vezes, todas as amostras foram avaliadas após a diluição sendo avaliados os parâmetros físicos como vigor, motilidade e motilidade progressiva, todos os parâmetros foram avaliados após 12, 24 e 36 horas, todas as amostras após a retirada das caixas de transporte os micro tubos e

colocadas em banho maria a 40 °C, posteriormente era realizada a avaliação dos parâmetros físicos do sêmen.

4.4 Análise estatística

As variáveis-dependentes consideradas foram: motilidade total, motilidade progressiva do sêmen e vigor espermático, sendo os dados tabulados em planilhas eletrônicas e posteriormente submetidos a análise estatística através de software especializado (SAS University Edition), onde foram submetidos ao teste ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos e avaliações realizadas no resfriamento do experimento.



Fonte: O autor

Botu semen transporte®: Diluidor de sêmen utilizado, a base de gema de ovo e leite desnatado, posteriormente acrescido de mel 1,0% como extensor.

Botu Flex®: Caixa de armazenamento, todas amostras foram armazenadas e somente retirada momento da avaliação

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio dos parâmetros de controle adotados neste experimento para avaliar a qualidade espermática, pode-se constatar homogeneidade entre os grupos na avaliação do vigor espermático Tabela 2, com exceção do grupo controle 0 horas, ou seja a avaliação do momento da coleta, que obteve média e desvio padrão de 2.75 ± 0.50 , ($P < 0,05$) quando confrontado com todos os grupos, e o grupos 5 e 6 de avaliação de 36 horas de armazenamento com acréscimo de mel, com média e desvio padrão de 1.75 ± 0.50 , 2.25 ± 0.50 , ($P < 0,05$) respectivamente, se diferenciando estatisticamente do grupo controle 36 horas, o resultado observado foi esperado pois a amostras do tempo zero controle apresentam uma melhor qualidade relacionado ao vigor quando correlacionado com as amostras avaliadas com 12, 24 horas, a diferenciação dos grupos 5 e 6 na avaliação com 36 horas, pode ser explicada devido ao mel possuir princípios ativos que contribuem fornecendo substâncias como açúcares como frutose e glicose; minerais como magnésio, potássio, cálcio, cloreto de sódio, enxofre, ferro e fosfatos, ácido cafeico, éster fenílico de ácido cafeico e glicose de flavonoides, quanto ao vigor ao concatenar os grupos centrifugados e sem centrifugar de acordo com a hora de avaliação não houve diferença

Tabela 02 - Tabela com média e desvio padrão referentes ao vigor de sêmen de garanhões, de acordo com a hora de avaliação e grupos centrifugados e não centrifugados.

Grupos	VIGOR				
	REPRODUTORES				
	G1	G2	G3	G4	G5
Controle 0h	2.75 ± 0.50^a	2.75 ± 0.50^a	3.00 ± 0^a	3.00 ± 0^a	3.00 ± 0^a
Controle 12h	2.50 ± 0.57^b	2.00 ± 0^b	2.50 ± 0.57^b	2.50 ± 0.70^b	3.00 ± 0^b
Controle 24h	2.25 ± 0.50^b	2.00 ± 0^b	2.00 ± 0.81^b	2.00 ± 0^b	2.50 ± 0.70^b
Controle 36h	1.75 ± 0.50^b	1.25 ± 0.50^b	1.75 ± 1.25^b	2.00 ± 0^b	2.00 ± 0^b
01 centrifugado (12h)	2.75 ± 0.50^b	2.50 ± 0.57^b	2.50 ± 0.57^b	2.50 ± 0.70^b	3.00 ± 0^b

02 não centrifugado (12h)	2.75±0.50 ^b	2.50±0.50 ^b	2.75±0.50 ^b	2.00±0 ^b	3.00±0 ^b
03 centrifugado (24)	2.25±0.50 ^b	2.25±2.25 ^b	2.75±0.50 ^b	2.50±2.00 ^b	2.50±0.70 ^b
04 não centrifugado (24h)	2.50±0.57 ^b	2.50±0.57 ^b	2.50±0.57 ^b	2.50±0.70 ^b	1.75±0.50 ^b
05 centrifugado (36h)	1.75±0.50 ^c	2.25±0.50 ^c	2.25±0.50 ^c	2.50±0.70 ^c	2.00±0 ^c
06 Não centrifugado (36h)	2.25±0.50 ^c	2.25±0.50	2.00±0.81	2.00±0	2.50±0.70

estatística ($P>0,05$), os ganhões quando confrontados também não teve diferença estatística entre os mesmos quanto ao vigor ($P>0,05$).

Letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente no teste Tukey, ao nível de significância de 5%.

O acréscimo do vigor, quando acrescentado mel como extensor de diluidor e armazenado a longo prazo neste trabalho, corrobora com trabalho desenvolvido por Jerez-Ebensperg et al., (2015), em que esses concluíram que a adição de mel ao extensor de carneiro reduz deterioração e contribuiu com o melhor vigor do espermatozoide quando armazenado a 4 °C.

Estudos indicam que quanto menor a concentração do plasma, melhor a manutenção do vigor no sêmen refrigerado (JASKO et al., 1992; KELLER et al., 2001; TODD et al., 2001; SCHMITT et al., 2003). No presente trabalho a maioria do plasma seminal foi retirada juntamente com o diluidor, no sobrenadante, apesar de não ter sido estipulada a concentração de plasma residual, após a centrifugação, permanecendo apenas uma quantidade mínima junto ao sedimento, porém no presente estudo não foi observado diferença no armazenamento com ou sem centrifugação, ao avaliamos o vigor.

Este resultado diverge do resultado de JASKO et al. (1992), que concluírem que a centrifugação e remoção total do plasma seminal, resultou em uma redução significativa da viabilidade espermática, sugerindo que uma pequena concentração de plasma seminal seja essencial para a manutenção da capacidade de fertilização, dos espermatozoides oriundos de sêmen equino refrigerado.

Ao avaliamos a Tabela 3, observamos novamente a similaridade dos grupos e ganhões quanto a motilidade o grupo controle 0h obteve média e desviou padrão de 65.00 ±12.90 apresentando mais uma vez diferença estatística de todos os demais grupos ($P<0,05$), as amostras avaliadas com 12h e 24h não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$), porém quando confrontados o grupo controle 36h com as amostras com acréscimo de 1,0% de mel,

equivalente aos grupos 5 que obteve média e desviou padrão de 26.25 ± 14.71 e 6 com 23.75 ± 4.78 , apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$), ao contrapormos os garanhões e grupos centrifugado e sem centrifugação não foi observado diferença estatística ($P > 0,05$), a longevidade espermática das amostras acrescidas de mel até as 36 horas quando comparadas ao grupo controle é um dado a ser considerado, neste contexto pode ser explicado devido ao mel ser um elemento que possui potentes propriedades antioxidantes e antibacterianas (ZOHEIR et al, 2015). Salientando também a presença de flavonóides neste elemento que possuem atividade de eliminação de radicais livres (RL), inibindo assim os danos ao DNA induzidos por RL (CHEN et al, 2014).

Tabela 03 - Tabela com média e desvio padrão referentes a motilidade de sêmen de garanhões, de acordo com a hora de avaliação e grupos centrifugados e não centrifugados.

MOTILIDADE					
Grupos	REPRODUTORES				
	G1	G2	G3	G4	G5
Controle 0h	65.00 ± 12.90^a	60.00 ± 8.16^a	62.50 ± 5.00^a	50.00 ± 0^a	70.00 ± 14.14^a
Controle 12h	46.25 ± 4.78^b	41.25 ± 11.81^b	56.25 ± 7.50^b	40.00 ± 0^b	57.50 ± 10.60^b
Controle 24h	35.00 ± 10.00^c	31.25 ± 8.53^c	36.25 ± 13.14^c	37.50 ± 3.53^c	45.00 ± 14.14^c
Controle 36h	25.00 ± 12.90^e	20.00 ± 9.12^e	27.50 ± 21.01^e	22.50 ± 3.53^e	37.50 ± 17.67^e
01 Centrifugado (12h)	53.75 ± 8.53^b	46.25 ± 11.08^b	46.25 ± 4.78^b	42.50 ± 10.60^b	60.00 ± 0^b
02 Não centrifugado (12h)	48.75 ± 13.14^b	53.75 ± 22.86^b	51.25 ± 15.47^b	45.00 ± 7.07^b	60.00 ± 0^b
03 Centrifugado (24)	42.50 ± 14.43^c	41.25 ± 31.25^c	47.50 ± 6.45^c	45.00 ± 40.00^c	45.00 ± 7.07^c
04 Não centrifugado (24h)	37.50 ± 11.90^c	42.50 ± 12.58^c	40.00 ± 14.71^c	45.00 ± 7.07^c	26.25 ± 12.50^c
05 Centrifugado (36h)	26.25 ± 14.71^d	33.75 ± 11.08^d	41.25 ± 8.53^d	37.50 ± 10.60^d	27.50 ± 10.60^d
06 Não centrifugado (36h)	23.75 ± 4.78^d	27.50 ± 8.66^d	28.75 ± 13.76^d	20.00 ± 14.14^d	42.50 ± 3.53^d

Letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente no teste Tukey, ao nível de significância de 5%.

Em trabalho desenvolvido por Olayemi et al., (2011) concluiu que a adição de mel ao extensor da gema de ovo melhora a motilidade e a taxa de mortos vivos e a viabilidade do sêmen de reprodutores caprinos para armazenamento. Fakhrildin e Alsaadi (2014), em um experimento desenvolvido também com a suplementação de mel de abelhas (10%) à solução crioprotetora mostra melhorias nos parâmetros do esperma pós-descongelamento no homem, no presente trabalho também foi observado um acréscimo na motilidade espermática do sêmen de garanhões da raça quarta de milha, quando submetidos a longo tempo de resfriamento com acréscimo de 1,0% de mel.

Confrontando os resultados com Jasko et al., (1991) onde obtive motilidade espermática maior no sêmen equino submetido à centrifugação (1200g/10min) e refrigerado por 24h, quando o plasma seminal foi retirado e os espermatozoides diluídos em diluidor de leite desnatado. Os autores ainda relatam que quando o plasma seminal foi mantido após a centrifugação, houve uma redução imediata da motilidade, contrariando o presente trabalho onde não houve diferença estatística do grupo centrifugado e não centrifugado independente do tempo de armazenamento ($P > 0,05$).

Ao avaliarmos a motilidade progressiva Tabela 4 pode-se constatar novamente a uniformidade entre os grupos na avaliação, porém o grupo controle 0h com média e desvio padrão de 42.50 ± 15.00 , apresentou diferença estatística quando contraposto com os demais grupos ($P < 0,05$), os demais grupos e garanhões não apresentaram diferença estatística ao serem contrapostos de acordo com o momento de avaliação ($P > 0,05$), concluindo assim que o acréscimo de 01% de mel orgânico e centrifugação não interferem quanto a motilidade progressiva de garanhões.

Jasko et al., (1992) verificaram que a ausência de plasma no sêmen equino diluído em meio à base de leite reduziu significativamente ($p < 0,05$) a motilidade espermática quando refrigerado por 24 horas, contudo, Love et al., (2005) obtiveram melhor preservação da motilidade espermática e da integridade do DNA na ausência de plasma seminal quando o ejaculado foi diluído e refrigerado por 48 horas, no presente trabalho, não houve diferença significativa entre os grupos centrifugados e não-centrifugados divergindo dos trabalhos anteriormente citados.

Entretanto, Moore et al., (2005b), observou que a exposição do sêmen por 15 minutos a concentrações de plasma seminal, variando de 0 a 80% antes da criopreservação, não

Tabela 04 - Tabela com média e desvio padrão referentes a motilidade progressiva de garanhões, de acordo com a hora de avaliação e grupos centrifugados sem centrifugar.

MOTILIDADE PROGRESSIVA					
Grupos	GARANHÃO				
	G1	G2	G3	G4	G5
Controle 0h	42.50±15.00 ^a	52.50±17.07 ^a	77.50±17.07 ^a	37.50±3.53 ^a	62.50±10.60 ^a
Controle 12h	36.25±11.08 ^b	32.50±10.40 ^b	43.75±8.53 ^b	32.50±3.53 ^b	50.00±7.07 ^b
Controle 24h	30.00±5.77 ^b	21.25±6.29 ^b	38.75±18.87 ^b	27.50±3.53 ^b	37.50±17.67 ^b
Controle 36h	27.50±16.58 ^c	25.00±16.83	22.50±17.07	12.50±3.53	32.50±17.67
01 Centrifugado (12h)	40.00±14.71 ^b	38.75±10.30 ^b	40.00±7.07 ^b	32.50±3.53 ^b	50.00±0 ^b
02 Não centrifugado (12h)	37.50±15.54 ^b	2.75±17.07 ^b	47.50±12.58 ^b	37.50±3.53 ^b	50.00±0 ^b
03 Centrifugado (24)	30.00±15.81 ^b	31.25±41.25 ^b	38.75±7.50 ^b	32.50±30.00 ^b	40.00±7.071 ^b
04 Não centrifugado (24h)	29.75±10.34 ^b	33.75±9.46 ^b	32.50±13.22 ^b	40.00±7.07 ^b	30.00±14.71 ^b
05 Centrifugado (36h)	30.00±14.71 ^c	25.00±10.80 ^c	32.50±6.45 ^c	27.50±10.60 ^c	22.50±10.60 ^c
06 Não centrifugado (36h)	17.50±5.00 ^c	18.75±8.53 ^c	22.50±11.90 ^c	37.50±17.67 ^c	35.00±7.07 ^c

tenham afetado a motilidade total, progressiva e integridade da membrana plasmática, ratificando assim o resultado obtido no presente trabalho.

Letras minúsculas diferentes nas colunas diferem estatisticamente no teste Tukey, ao nível de significância de 5%.

Porém foi observado que as amostras com o passar do tempo havia uma queda da motilidade progressiva quando comparados o grupos de acordo com horário de avaliação o mesmo o observado por Nunes (2006), que avaliando diferentes concentrações espermáticas, observou maiores valores medianos ($p < 0,05$) da variável motilidade progressiva (%) no momento pré-refrigeração quando comparados a outros tratamentos as 24 e 48 horas de refrigeração. O que pode ser explicado pelos danos promovidos durante o resfriamento, decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas ou indiretos, por alterações das funções celulares (SQUIRES et al., 1999).

6 CONCLUSÃO

O estudo da utilização de mel no sêmen de equinos e comparação quanto o tempo de conservação evidencia padrões semelhantes a literatura em alguns aspectos como melhora nos parâmetros cinéticos, porém diverge para os aspectos como a influência da centrifugação, evidenciando que o acréscimo de 1,0% de mel como extensor, melhora o vigor e a motilidade total espermática quando estas submetidas ao resfriamento por longo período (36h), porém não apresenta diferença significativa na motilidade progressiva, ressaltando que quando confrontados os grupos centrifugados e não centrifugados, os mesmos não apresentaram diferença significativa na melhora da fertilidade. Nossos resultados auxiliam no entendimento da fisiologia reprodutiva da espécie, e fornece dados comparativos a serem usados como referência à compreensão de alterações que possam afetar na conservação do sêmen. Além disso, o presente trabalho aumenta o acervo literário reprodutivo de equinos, fornecendo subsídios para estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v. 16, n. 4, p. 259-267, 1994.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.581-588, 2004.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Estrutura da membrana. In: **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. 1999.
- ALVES, R. M. O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Cienc. Technol. Alim.** v. 25, n. 4, 644-650, 2005.
- AMANN, R. P. Weaknesses in reports of “fertility” for horses and other species. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 698-715, 2005.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. **Spermatozoal function**. In: McKinnon, A. O. & Voss, J. L. *Equine Reproduction*, 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.80, p.715-745, 1993.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v.14, n.6, p.397-406, 1993.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertilit after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.
- AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.
- AURICH, J. E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p.185-192, 1997.

AVANZI, B. R.; PAPA, F. O.; FARRÁS, M. C.; MELO, C. M.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA JR., J. A.; MEDEIROS, A. S. L.; ARAÚJO, G. H. M. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 152-154, 2006.

AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; DUTRA, V. M. L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, n. 80, p. 249-254, 2003.

BABIAK, I.; GLOGOWSKI, J.; LUCZYNSKI, M. J.; LUCZYNSKI, M.; BACK, D. G.; PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; SEIDEL, G. E. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. **Journal Animal Science**, v.41, p.137-143. 1975.

BARBOSA, R. T., MACHADO, R., BERGAMASCHI, M. A. C. M. A importância do exame andrológico em bovinos. EMBRAPA. **Circular técnica**. p.65. 2005.

BATELLIER, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; ARNAUD, G.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. **Theriogenology**, v. 50, p. 229-236, 1998.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J. M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J. M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BATELLIER, G. F.; DUCHAMP, M.; VIDAMENT, G.; ARNAUD, E.; PALMER, M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 °C under aerobic conditions. **Theriogenology**, v. 50, p. 229-236. 1998.

BERGERON, A.; CRETE, M. H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins from bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BOGART, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. **Journal Animal Science**, v.9, p.143-152, 1950.

BOSSEAU, S.; BRILLARD, J. P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, C. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the 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. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 out. 2000. Seção 1, p.16-17.

BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000a.

BRINSKO, S. P.; ROWAN, K. R.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1641- 1655, 2000b.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; DAY, B. C.; BRUEMMER, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal Animal Science**, v.80, p.12-18, 2002.

BRUEMMER, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal Animal Science**, v. 80, p. 12-18, 2002.

CARVALHO, G. A. Efeito de diferentes diluentes sobre viabilidade espermática, utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino. 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

CHEN, C. N. et al. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 2, p. 175-185, 2004.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v. 66, p. 1115–1122, 2006.

DELL'AQUA, J. A. et al. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Anim Reprod Sci**, v. 68, p. 324-325, 2001.

DEMIANOWICZ, W. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 473- 479, 1999.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, n. 3, p. 291-304, 1984.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: Knobil, E., & J. D. Neill (eds), **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York. p. 29-77, 1994.

EL-SHESHTAWY, R. I. et al. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n. 4, p. 331-334, 2016.

EVANGELISTA, A. R.; et al. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. **Cienc. Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, 2005.

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

FAKHRILDIN, M. M. R.; ALSAADI, R. A. R. Honey Supplementation to semen-freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. **Journal of family & reproductive health**, v. 8, n. 1, p. 27, 2014.

FARRÁS, M. C.; AVANZI, B. R.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 693-699, 2008.

FLIPSE, R. J.; PATTON, S.; ALQUIMST, J. O. Diluters for bovine semen. III. Effect of lactenin and of lactoperoxidase upon spermatozoa viability. **Journal Dairy Science**, v. 37, p. 1205-1211, 1954.

FOGAL, C. L.; KOZINK, D. M.; PINTO, C. R.; DOUGLAS, R. H. Effect of centrifugation on equine semen quality over time during cool storage incubation. **Theriogenology**, v. 66, p. 675-676, 2006.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**. 2th ed. Equiservices Publishing, Cross Plains. 642p. 1992.

GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; McMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 5 C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.112-122, 2004.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v.24, p.42-52, 1987.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed sêmen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GRIGGERS, S., PACCAMONTI, D. L.; THOMPSON, R. A.; EILTS, B. E. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v.56, p.613-622, 2001.

HEISNAKEN, M. L.; PIRHONEN, A.; KOSKINEN, E.; MAENPAA, P. H. Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different Storage conditions. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Suppl.) v.35, p.103-10, 1987.

HOUSEHOLDER, D. D.; PICKETT, B. W.; VOSS, J. L. et al. Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, n. 1, p. 9-13, 1981.

HOYUMPA, A. H.; MCLINTOSH, A. L.; VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M. Normal bacterial flora of equine semen: Antibacterial effects of amikacin, penicillin, and an amikacina penicillin combination in a seminat extender. In: 12th Internat Congr Animal Reprod. **Proceedings...** v. 3, p. 1427-1429, 1992.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality trough fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation of field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-981, 2001.

JASKO, D. J.; HATHWAY, J. A.; SIMPER, W D; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241-1252, 1992.

JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, p. 1059-1067, 1991.

JEREZ-EBENSPERGER, R. et al. The combined use of honey, garlic (*allium sativum l.*) And skimmed milk as an extender for chilling sheep semen. **CryoLetters**, v. 36, n. 4, p. 243-251, 2015.

JOHNSON, P. E.; FLIPSE, R. J.; ALMQUIST, J. O. Diluters for bovine semen. VI. The effect of cysteine hydrochloride on the liveability of bull spermatozoa in unheated skim milk. **Journal Dairy Science**, v. 38, p. 53-57, 1955.

KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 33-38, 2006.

KATILA, T.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.1085-1092, 1997.

KAYSER, J. P. R. **Effects of linear cooling rates on motion characteristics of stallion spermatozoa**. 1991. Dissertation. MS Thesis. Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, 1991.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M.J.; MATTOS, R.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 318-319, 2001.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: American Association equine Practitioners, 1975, **Proceedings...** v.21, p.327-336, 1975.

KING, S. S.; SPEISER, S. A.; JONES, K. L.; APGAR, G. A.; WESSELS, S. E. Equine spermatozoal motility and fertility associated with the incorporation of D-(+)-mannose into semen extender. **Theriogenology**, v. 65, p. 1171- 1179, 2006.

KODAMA, H.; KURBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **J. Androl.**, v. 17, p. 151-157, 1996.

LI, Y.H.; CAI, K.J.; SU, L.; GUAN, M.; HE, X.C.; WANG, H.; KOVACS, A.; JI, W.Z. Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. **Asian Journal of Andrology**, v.7, p.139-144. 2005.

LIMA, R. A. S.; OLIVEIRA, R. A. MENDES, C. Q.; JÚNIOR, P. G. Perfil e Tendências da Equideocultura Brasileira. Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. A produção animal no mundo em transformação. Brasília, 23 a 26 de julho de 2012.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.

LOVE, C. C.; BRINSKO S. P.; RIGBY, S. L.; THOMPSON, J. A.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility

and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, p. 1584-1591, 2005.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.833-839, 1998.

MANJUNATH P, NAUC V, BERGERON A, MENARD M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por **Apis mellifera** L. no Estado de São Paulo. **Cienc. Tecnol. Alim.** v. 25, n. 1, p. 8-17, 2005.

MATTOS, R. C.; SCHMITT, F. L.; OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M. Influência do plasma seminal de garanhões da baixa e alta qualidade espermática na motilidade, integridade e funcionalidade de membrana plasmática de espermatozóides resfriados a +4°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, p. 336-338, 2003.

MATTOS, R.C. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. 1994. 114 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, 1994.

MEIRELLES, L. S.; MALSCHITSKY, E.; NEVES, A. P.; VIEIRA, M. J.; KELLER, A.; HOTT, A. K.; MORAES, I. M. A.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. **Ciência Rural**, v.28, n. 3, p. 467-470. 1998.

MELO, C. M.; ALVARENGA, M. A.; ZAHN, F. S.; MARTIN, I.; ORLANDI, C.; TRINQUE, C. L. A.; DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F.O. Effect of the transport container and cryoprotectant on freezability of equine semen previously cooled for 24h. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.78-81, 2006.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71- 78, 1999.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 757-763, 2005.

METCALF, E. S. Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. In: American Associations Equine Practitioners, 44, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore, p. 16-18. 1998.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v. 51, p. 241–249, 2005b.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.2372-2381, 2005a.

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of horses**. 6 Ed. 2007.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 30, p. 42-56, 2006.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; FERREIRA, C. S.; DePAULA, F. A. L.; COSTA e SILVA, E. V. Fertilidade de éguas inseminadas no ápice do corno uterino utilizando baixa concentração espermática. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, CD-ROM, MR036. 3p, 2004.

OLAYEMI, F. O.; ADENIGI, D. A.; OYEYEMI, M. O. Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. **Global Vet**, v. 7, n. 1, p. 19-21, 2011.

OLIVEIRA, R. A. Fatores que influenciam na fertilidade do sêmen equino congelado. **PUBVET**, v. 7, n. 26, 2013.

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal Animal Science**, v. 39, p. 1144-1149, 1974.

PADILLA, A. W.; FOOTE, R. H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3308-3313, 1991.

PAGL, R.; AURICH, J. E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; A RICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with askim milk N based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v.66, p.1115-1122, 2006.

PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S.; AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response of the endometrium in o estrous mares. *Animal reproduction science*, v. 94, p. 286- 289, 2006.

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.

PICKETT, B. W., SHINER, K. A. Recent developments in artificial insemination in horses. **Livestock Production Science**, v. 40, n. 1, p.31-36, 1994.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Extensionandstorage of stallionspermatozoa: a review. **Journal of EquineVeterinary Science**, Wildomar - California, v.7, n.5, p.289-302, 1987.

PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; JONES, R. L. Control of bacteria in stallions and their semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 7, 1999.

PROVINCE, C. A.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v. 22, p. 409-415, 1984.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 403-407, 1980.

ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Studies on motility and fertility ofcooled stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 39, n. 2, p. 103-9, 2004.

ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILO, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa.

Theriogenology, v. 69, p. 176-185, 2008.

SCHMITT, F. L.; JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; MALSCHITZKY, E.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R. C. A concentração do plasma seminal e o diluente afetam as características espermáticas do sêmen equino resfriado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 334-336, 2003.

SEAGER S. W. J.; FLETCHER W. S. Progress on the use of frozen semen in the dog. **Veterinary Record**, v.92, p.6-10, 1972.

SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, F. A.; PALHARES, M. S.; WANDERLEY, A. T.; OLIVEIRA, H. N. Avaliação de uma técnica de diluição e transporte de sêmen equino, para as condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.1, p.66-74, 1998.

SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; FONSECA, F. A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de equino. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, n. 11, p. 3-112, 1994.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 8, n. 2-3, p. 260-265, 2004.

SOUZA, B. A. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciênc. Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, 2004.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and Frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**. n.9, p.01-38, 1999.

STRYER, L. Introdução ao estudo das membranas biológicas.1992. In: **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. cap. 12, p. 230- 256, 1992.

TODD, P.; ARNS, M. J.; CHENOWETH, P.; SCHULTZ, B. Influence of seminal plasma and processing on cold-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p.335–336, 2001.

TOSIC, J. A.; WALTON. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. **Nature**, v. 158, p. 485–485, 1946.

VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; MELO, M. A., MAGNAGO, L. G. P. Utilização de um container modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p. 505-514, 1999.

VARNER, D. D. Collection and Preservation of Stallion Spermatozoa. In: Annual Meeting of the Society for Theriogenology. **Proceedings...** p.13-33, 1986.

VARNER, D. D. T. L.; BLANCHARD, C. L.; LOVE, M. C.; GARCIA, R. M.; KENNEY. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1054, 1988.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-723, 1987.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, P. J.; MEYERS, S. A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 °C. **Theriogenology**, v.32, n.4, p.515-525, 1989.

VARNER, D. D.; MICINTOSH, A. L.; FORREST, D. W.; BLANCHARD, T. L.; JOHNSON, L. Potassium penicillin G, amikacin sulfate, or a combination in seminal extender for stallions: Effects on spermatozoal motility. In:12th Internat Congr Anim Reprod. **Proceedings...** v.3, p.1496-1498, 1992.

VARNER, D. D.; SCANLAN, C. M.; THOMPSON, J. A.; BMMBAUGH, G. W.; BLANCHARD, T. L.; CARLTON, C. M.; JOHNSON, L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v.50, p.559-573, 1998.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAÏN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: free zability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907-917, 1997.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 4, p. 907-919, 2000.

VOSS, J. L. Breeding Efficiency. In: McKinnow, A. O., Voss, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1114p., 1993.

WAILI-AL, N. S. Natural honey lowers plasma glucose, C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in health, diabetic, and hypelipidemic subjects: comparison with dextrose and sucrose. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 1, p. 100-107, 2004.

WATSON, P. F. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.42, p.105- 111, 1975.

WEBB, G. W.; ARNS, M. J. Influence of modified Tyrode's media on motility of cold-stored stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 15, p. 441–445, 1995.

WEBB, G.; HUMES, R. A comparison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cold-stored stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 135–137, 2006.

ZOHEIR K. M. A.; HARISA G. I.; ABO-SALEM O. M.; SHEIKH, F. A. S. F. Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide induced genotoxicity in albino male mice. **Pak J PharmSci**. v. 28, n. 3 p. 973-981. 2015.