



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

ANA JULLYA DA COSTA CLARINDO

**VIABILIDADE DE SÊMEN CAPRINO REFRIGERADO A 5° C DILUIDO EM SORO
FISIOLÓGICO ADICIONADO DE CLARA DE OVO**

FORTALEZA

2024

ANA JULLYA DA COSTA CLARINDO

**VIABILIDADE DE SÊMEN CAPRINO REFRIGERADO A 5° C DILUIDO EM SORO
FISIOLÓGICO ADICIONADO DE CLARA DE OVO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Zootecnia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do grau em bacharel em Zootecnia.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C542v Clarindo, Ana Jully da Costa.
Viabilidade de sêmen caprino refrigerado a 5° C diluído em soro fisiológico adicionado de clara de ovo /
Ana Jully da Costa Clarindo. – 2024.
21 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Zootecnia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Aderson Martins Viana Neto.

1. Caprinos - Reprodução. 2. Diluição do sêmen. 3. Reprodução animal. 4. BotuFLEX. I. Título.
CDD 636.08

ANA JULLYA DA COSTA CLARINDO

**VIABILIDADE DE SÊMEN CAPRINO REFRIGERADO A 5° C DILUIDO EM SORO
FISIOLÓGICO ADICIONADO DE CLARA DE OVO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Zootecnia no Centro de
Ciências Agrárias da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial a obtenção do grau
em bacharel em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Aderson Martins Viana
Neto.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Dr. Aderson Martins Viana Neto
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA -UFC

Dr. Airton Alencar de Araújo
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA – UECE

Dr. Danilo Rodrigues Fernandes
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA – UFC

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele nada disso seria possível, por iluminar meus caminhos e por ser bom o tempo todo.

Aos meus pais, Juliana e Joacy, por compartilharem comigo toda essa trajetória, vocês são a fonte inesgotável de amor, paciência e sabedoria. Obrigada por todo apoio e incentivo, amo vocês.

À minha irmã, Ana Joyce, que foi luz na minha vida e o meu maior presente, os dias são mais coloridos depois da sua chegada. Como é bom te ver crescer, mana.

Aos meus avós, Ângela Maria, Júlio Galdino, Célia Regina e José Joacy, por serem sempre carinhosos, incentivadores e por todas as brincadeiras ao longo dos anos. São exemplos de fé, união e sabedoria.

Ao meu tio (*in memorian*), Sérgio, por todo carinho, presença e incentivo durante a infância, que se perpetua no meu coração.

Aos meus Bisavós (*in memorian*), Antônia e Cauípe, por serem tão carinhosos, amorosos e cuidarem tão bem de mim na infância.

Ao meu namorado, Isaac Levi, pelo apoio, incentivo e positividade em todos os momentos felizes e turbulentos. Sou grata pelo seu carinho, cumplicidade e amor.

Às minhas tias, Vivianne, Tainá e Selma, por serem incentivadoras na vida acadêmica e comemorarem comigo as conquistas.

À minha madrinha e a minha tia, Julianny (Aninha) e Josiane, pois são como mães, ombros amigos e a sempre presentes em todas as etapas e conquistas na minha trajetória.

Às minhas primas, Marjorie e Yasmin, pela nossa irmandade, amo demais ter vocês, meus grudes.

Aos meus amigos, Roberta Maria, José Ricardo, Dara Barbosa e Lucas Silva, amizade essa que só cresceu e que foi incentivo no decorrer da graduação. Agradeço a parceria, risadas, puxão de orelha e toda ajuda, vocês foram essenciais e que nossa amizade continue firme e forte ao longo dos anos.

À minha amiga, Vitória de Fátima que em foi fundamental nessa jornada, obrigada por ser incentivadora, amiga e por não desistir. Saiba que a sua presença foi a lucidez em dias difíceis. Não foi fácil, mas conseguimos.

À minha amiga, Larissa Baia, que mesmo na distância se faz presente. Agradeço à amizade, companheirismo, ajuda e inspiração em ser uma pessoa melhor.

As amizades feitas ao decorrer do curso, Marcos Lins, Ana Beatriz (Dot), Rafaela Pantuzzi, Bruna Alves, Marta Costa, foram ímpares no final do curso, que nossa amizade continue leve ao longo dos anos.

À minha amiga de infância, Maria Iorrana, por sempre se fazer presente em todos os momentos, por celebrar comigo cada passo dado em busca desse sonho.

Às Big Three, Beatriz Tito e Maria Salveline, pela amizade, pela parceria, pelas risadas e pelos conselhos, cujo a amizade ajudou a superar adversidades.

Ao Vôlei Feminino e Masculino UFC, pelas amizades conquistadas, pelos jogos e oportunidades dadas, onde pude conhecer Gisele Nogueira, Gabrielly Paz e Eduarda Almeida e construir uma linda amizade. Sempre estarei na torcida dentro e fora de quadra. “Um, dois, três, UFC”.

Ao Vôlei Feminino e Masculino de São Gonçalo do Amarante, pelas amizades construídas, pelos incentivos dentro e fora de quadra, onde pude conhecer Cláudia e Anne Mickelly, obrigada pela compreensão e pelo incentivo. Sempre estarei na torcida dentro e fora de quadra. “Aê, São Gonçalo”.

Aos amigos, Rafael Mesquita, Socorro Fernandes e Lucas Linhares, que em tempos difíceis reduziram o estresse, que mesmo na correria do trabalho os dias eram mais leves com vocês. Obrigada pelo incentivo, consolo e por toda ajuda. Pessoas positivas e ímpar na vida de quem os cercam.

Ao meu orientador, Dr. Aderson Viana Neto por ter acreditado em mim, pelas orientações, pelas correções, pelos ensinamentos e pela amizade construída. O senhor foi muito importante para a minha formação e só tenho a agradecer por todas as oportunidades proporcionadas.

Aos integrantes da banca examinadora, Dr. Airton Araújo e Dr. Danilo Fernandes, pelas colaborações, correções e ensinamentos, que foram de suma importância para minha formação profissional.

Aos membros do corpo técnico do departamento Ana Roberta, Luiz Marcelo e José Clécio Bezerra, pelo auxílio nas questões administrativas, pela atenção e ajuda durante a graduação.

Ao Setor de Ovinocaprinocultura, alunos, professores e terceirizados, que me proporcionaram amizades, momentos e experiências técnicas, pelos conhecimentos práticos adquiridos para a vida profissional. Serei eternamente grata.

À Universidade Federal do Ceará e ao corpo docente, pelas oportunidades e capacitações durante a graduação.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficiência do uso de diluidor contendo clara de ovo e solução fisiológica, no processo de resfriamento do sêmen de caprino nativos. Para tanto, foram utilizados três bodes (2 da raça Marota e 1 da raça Azul), avaliados conforme exame clínico-andrológico, vacinados e vermifugados, alojados em baias individuais (9 m²), alimentados com feno de capim Tifton e concentrado (NRC, 2007), tendo acesso a água e sal mineral *ad libitum*, no Setor de Ovinocaprinocultura (DZ/CCA/UFC), em Fortaleza - CE. O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial e avaliado em microscopia óptica quanto a sua motilidade e morfologia espermática. Após avaliação, partes iguais das amostras foram agrupadas em *pool* e diluídos, 1:9, com diluidores a base de solução fisiológica contendo 0, 10%, 20% e 30% de inclusão de clara de ovo. Alíquotas de 0,25 ml de sêmen diluído foram refrigeradas a 5 °C, utilizando **BotuFLEX**®, de modo que o *pool* foi avaliado nos horários de 0, 2, 6, 12 e 24 h, ao longo do processo da refrigeração. Para a motilidade individual progressiva dos espermatozoides os diluidores com 0 e 30% de inclusão mostraram-se diferenças (0h: 4,5 vs. 4,0; p<0,05). A concentração de 10% entre os horários de 2 a 12 h apresentaram valores acima de 3. Quanto à motilidade total, a concentração de 10% sobressaiu estatisticamente em comparação com 30% (0h:72,5% vs. 62,5%; 24h: 30% vs. 12,5%). No que se refere aos parâmetros morfológicos, a quantidade de espermatozoides normais foi diferente estatisticamente para todas as concentrações nos horários de 0 e 24 h. Observou-se que no flagelo, as concentrações de 0 e 10% nos horários de 12 e 24 h mostraram-se diferentes estatisticamente a 0 horas, devido ao aumento superior a 20% de defeitos, com exceção da concentração de 20%. Destaca-se a facilidade e baixo custo do uso de solução fisiológica, estimam diluidores bem mais elaborados e de maior custo. Assim, a utilização de solução fisiológica, adicionada ou não de clara de ovo (10%) como diluidor de sêmen caprino, conservado sob refrigeração, mostrou-se uma opção de baixo custo e eficaz.

Palavras-chave: Espermatozoide; BOTUFLEX; bromofenol; albumina.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of using an extender containing egg white and saline solution in semen cooling process of native bucks. To this end, three goats were used, evaluated according to clinical andrological examination, vaccinated and dewormed, housed in individual stalls (9 m²), fed with Tifton hay and concentrate (NRC, 2007), having access to water and mineral salt *ad libitum*, reared at Fortaleza-CE. The semen was collected by artificial vagina and evaluated using optical microscopy for sperm motility and morphology. After evaluation, equal parts of the samples were pooled and diluted (1:9), with physiological solution-based diluters containing 0, 10%, 20% and 30% of egg white inclusion. Aliquots of 0.25 ml of diluted semen were refrigerated at 5 °C, using BotuFLEX®, so that the *pool* was evaluated at 0, 2, 6, 12 and 24 hours, throughout the refrigeration process. Thus, the progressive individual sperm motility of extenders with 0 and 30% inclusion showed differences (0h: 4.5 vs. 4.0; $p < 0.05$). The egg white inclusion of 10% between the hours of 2 and 12 hours presented values above 3. As for total motility, the 10% concentration stood out statistically compared to 30% (0h: 72.5% vs. 62.5%; 24h: 30% vs. 12.5%). With regard to morphological parameters, the quantity of normal spermatozoa were statistically different for all concentrations at 0 and 24 hours. It was observed that in the flagellum, concentrations of 0 and 10% at 12 and 24 hours were statistically different at 0 hours, due to an increase of more than 20% in defects, with the exception of the 20% concentration. The ease and low cost of using saline solution stands out, estimating much more elaborate and higher-cost diluters. Thus, the use of physiological solution, whether or not added with egg white (10%) as a goat semen extender, kept under refrigeration, could be an alternative to be a low-cost and effective option.

Keywords: Sperm; BOTUFLEX; bromophenol; albumin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. METODOLOGIA	9
2.1 Comitê de ética.....	9
2.2 Animais e local	9
2.3 Coleta de sêmen	9
2.4 Diluição do sêmen	10
2.5 Resfriamento	10
2.6 Análise estatística.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4. CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

1. INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes são indispensáveis para a economia mundial. Seu potencial produtivo, aliado à sua capacidade de adaptação às diversas condições climáticas (TEDESCHI *et al.*, 2010), corroboram com a difusão desses animais no mundo. Além disso, a eficiência reprodutiva é um dos pilares que influenciam o sucesso do processo produtivo desses animais. No sentido de que a qualidade espermática influi a taxa de fertilização e qualidade embrionária, e conseqüentemente a produção (THUNDATHIL *et al.*, 2012).

No que diz respeito à reprodução, a adoção de biotécnicas reprodutivas é um dos meios para se alcançar uma maior produtividade (FONSECA, 2006), destacando-se a inseminação artificial, que atualmente é a técnica mais empregada, tendo como características sua fácil execução e capacidade de gerar resultados favoráveis pela rápida disseminação de genes benéficos (NUNES; SALGUEIRO, 2011), permite uma maior produção de descendentes (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004) advindos de reprodutores de alto mérito genético, com problemas fisiológicos ou físicos (ENGLAND; VERSTEGEM, 1996), transferência de genes entre populações (DURRANT, 2009) sem transmitir doenças (em situação ideal), sendo uma ferramenta de grande importância para reprodução, em especial, para sistemas de produção intensivos (LEBOEUF *et al.*, 2000).

Ademais, o reprodutor atua diretamente sobre os resultados da inseminação artificial (BURGUETE *et al.*, 1998) e seu desempenho reprodutivo é resultante de fatores genéticos e não genéticos, com isso, é necessário realizar avaliações individuais para aperfeiçoar a eficiência reprodutiva (FURSTOSS *et al.*, 2010; KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). Existe entre os machos, variações individuais, relacionadas a anormalidades espermáticas (ROCA *et al.*, 1992a), a viabilidade quando incubado, ao processamento (RITAR; SALAMON, 1983), a habilidade do sêmen em permanecer viável após o processo de resfriamento e/ou congelamento (BATISTA *et al.*, 2009a).

A diluição do sêmen atua benéficamente sobre os espermatozoides, podendo ser capaz de melhorar a motilidade e o poder fecundante dos espermatozoides (ARAÚJO *et al.*, 2000, além de resultar em maior número de doses de um mesmo reprodutor, permitindo um maior aproveitamento e disseminação de sua genética (MIAN *et al.*, 1990), favorecendo ainda a sanidade do sêmen (SOUZA *et al.*, 2006). Assim, é necessário que a diluição resulte em um adequado volume de diluidor e suficiente número de espermatozoides para obtenção de sucesso,

sendo realizada com base na concentração espermática ou adicionando quantidade específica de diluente (PURDY, 2006).

Um bom diluente deve prover substâncias que mantenham o ambiente adequado para as células espermáticas (PURDY, 2006). Existem diversos diluidores, para diferentes espécies de animais, com múltiplos constituintes, desde os mais elaborados aos mais simples (SALAMON et al., 2000). Nesse contexto, o soro fisiológico, substância de simples aquisição e valor acessível, pode ser utilizado como diluidor seminal gerando resultados favoráveis sobre a qualidade do sêmen e sua longevidade (ENGLAND; VERSTEGEM, 1996).

A clara do ovo é um meio aquoso composto principalmente por proteínas, 10-12%, como ovoalbumina, ovotransferrina, lisozima e ovomucina (Omana *et al.*, 2010). Ovoalbumina é a principal proteína presente na clara, sendo responsável pela maioria de suas funções, e representa cerca de 54% do conteúdo total de proteínas (Croguennec *et al.*, 2000), sendo uma glicoproteína composta por 385 aminoácidos, com peso molecular de 45 kDa e ponto isoelétrico de 4.5 (Stein *et al.*, 1990).

Experimentos iniciais em busca de diluidores simples para sêmen visando a manutenção de seus parâmetros e processamento para inseminação apontaram o potencial e uso da clara de ovo, visto sua composição (LORENZ; TYLER, 1951). Xumsai (1959), ao utilizar sêmen de galo diluído com clara de ovo e solução salina, e resfriado, para inseminação, obtiveram altos índices de fertilidade e de eclodibilidade de ovos, 88,8% e 84,8%, respectivamente. Ademais, Wilcox (1960) observou que a fertilidade foi melhorada com a inclusão de 10% de clara de ovo ao diluente à base de solução tampão elevou a fertilidade dos ovos de galinha em 21% (55 vs. 76%), sendo resultados melhores quando combinada com frutose.

Assim, buscou-se avaliar a inclusão da clara de ovo na composição de diluidor simples e de baixo custo para manutenção da viabilidade espermática de sêmen caprino refrigerado.

2. METODOLOGIA

2.1 Comitê de ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP), decorrente do processo nº 0710202202.

2.2 Animais e local

O experimento foi realizado no Setor de Ovinocaprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (DZ/CCA/UFC; 3°44'33" Sul; 38°34'33"Oeste), sediado no Campus do Pici, nos meses de fevereiro a abril de 2023. Foram selecionados três reprodutores caprinos adultos, das raças Marota e Azul, com idade entre 2,5 e 5 anos, e avaliados conforme exame clínico-andrológico. Quanto a seu estado sanitário, foram previamente vacinados e vermifugados, e mantidos sob confinamento em baias individuais de 9 m², providas de área coberta. Os bodes foram alimentados com volumoso e concentrado a fim de atender suas exigências nutricionais conforme as recomendações do NRC (2007), tendo à disposição água e sal mineral *ad libitum*.

2.3 Coleta de sêmen

Após mensuração da circunferência escrotal, amostras de sêmen dos bodes foram coletadas, por meio de vagina artificial, com auxílio de uma fêmea manequim. Após a coleta, uma gota de sêmen foi posicionada em lâmina pré-aquecida a 37 °C para avaliação da motilidade massal (0-5), onde 0 representa a ausência de movimento de ondas e cinco os movimentos de onda acelerado e traspassando umas pelas outras, em microscopia óptica (100x). Outra gota foi diluída (1:2) em solução fisiológica pré-aquecida a 37° C, e posicionada em lâmina sob lamínula para avaliação da motilidade individual progressiva (0-5), nesse caso 0 representa a ausência de movimentação dos espermatozoides e o cinco o movimento acelerado dos espermatozoides em linha reta, o e do percentual de espermatozoides móveis em microscopia óptica (100 a 400x) (CBRA, 2013). Para a avaliação da morfologia espermática foram produzidos esfregaços de sêmen corados com azul de bromofenol, e estes foram avaliados em microscopia óptica (1000x sob óleo de imersão), contando-se 200 células, conforme metodologia descrita por Moreira, *et al.*, (2001).

2.4 Diluição do sêmen

Ovos recém postos, de tamanho médio (52 – 55 gramas) foram utilizados, de modo que, após sua obtenção, estes tiveram suas cascas limpas com álcool 70% visando desinfecção e remoção de sujidades. Foi pipetada a porção mais fluida da clara do ovo, visando obter de 10 a 15 mL de clara de ovo. Em seguida, foram preparados diluidores a base de solução fisiológica contendo 0, 10, 20 e 30% de clara de ovo. Após a coleta do sêmen, amostras foram unidas para obtenção de um pool, para serem diluídas, na proporção de 1:9, com os diferentes diluidores a base de solução fisiológica contendo clara de ovo (0 – 30%), sendo alíquota do em microtubos de 0,5 ml, contendo 250 ul das distintas amostras de sêmen diluídas, obtendo 5 amostras para cada diluidor, a fim de retirar e aquecer arriscar a ajustes a ser avaliada nas diferentes horas pós Resfriamento.

2.5 Resfriamento

Por conseguinte, as amostras foram submetidas à resfriamento (PALHARES, 1997; SIQUEIRA *et al.*, 2009) utilizando a caixa **BotuFLEX®**, objetivando alcançar e manter a temperatura de 5 °C, a qual permaneceram por 24 horas. Após o início do resfriamento, retirou-se as alíquotas das quatro amostras de sêmen, e após aquecimento a 37 °C, realizou-se sua avaliação quanto à motilidade total, motilidade individual progressiva, espermatozoides móveis e morfologia espermática, identificando espermatozoide normais e caracterizando defeitos de acordo com a localização entre cabeça, peça intermediária e flagelo. Tais avaliações foram realizadas à 0, 2, 6, 12 e 24 horas após o início da refrigeração.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Jamovi, de modo que os parâmetros seminais sejam expressos em média e erro-padrão; aplicando-se testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade, para aplicação de teste destinado à comparação de amostras pareadas (Anova; Friedman). Assim, comparações entre momentos e níveis de inclusão de clara de ovo foram realizadas pelo teste de comparação de médias (Tukey). As análises estatísticas realizadas adotaram um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos para a motilidade individual progressiva dos espermatozoides mostraram que os diluidores contendo 10% e 20% de inclusão da clara do ovo não apresentaram diferenças significativas entre si ($p>0,05$), enquanto os diluidores com 0 e 30% de inclusão mostraram-se diferenças (0h: 4,5 vs. 4,0%; $p<0,05$). Após duas horas de resfriamento, os diluidores 0 e 10% também não apresentaram diferenças estatísticas (3,9 vs. 4,1%; $p>0,05$), da mesma forma, os diluidores 20% e 30% (3,4%; $p>0,05$). No horário de seis horas, bem como às duas horas, as concentrações 0 e 10%, não mostraram diferenças significativas ($p<0,05$). Nos horários de 12 e 24 horas, todos os diluidores se mostraram iguais ($p>0,05$). Desse modo, a concentração de 10% nos horários de duas, seis e 12 horas apresentaram valores parecidos com os observados por Siqueira *et al.* (2009), com resultados superiores a 3%. Ademais, Leboeuf *et al.* (2000) afirmam que os estudos com sêmen caprino refrigerado demonstram boa viabilidade e fertilidade até oito horas após o início do resfriamento.

Tabela 1. Motilidade individual progressiva de sêmen de caprinos nativos refrigerado durante 24 horas com diluidor contendo clara de ovo.

Concentração	0h	2h	6h	12h	24h
0	4.5 a	3,9 a	3,0 ab	2,9 a	2,8 a
10%	4,3 ab	4,1 a	3,5 b	3,3 a	2.6 a
20%	4,3 ab	3,4 b	3,0 a	2,9 a	2,2 a
30%	4,0 b	3,4 b	2,7 a	2,1 a	1,3 a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatística para a concentração de clara de ovo incluída no diluidor, pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

Fonte: Autora (2024)

Quanto à motilidade total (Tabela 2), às 0 horas, a concentração 10% sobressaiu-se (72,5% de espermatozoides móveis) em comparação com os demais níveis de inclusão, onde o diluidor contendo 30% apresentou a menor porcentagem de espermatozoides móveis (62,5%). Após duas horas de resfriamento, os diluidores contendo 0 e 10% de clara de ovo não apresentaram diferença entre si (52,5%; $p>0,05$), enquanto o diluidor de 20% expressou a menor porcentagem de espermatozoides móveis (30%). Após seis horas, os diluidores 0, 10 e 20% permanecem iguais entre si (47,5%), entretanto o diluidor de 30% apresentou a menor

percentagem para motilidade (20% de espermatozoides móveis). Nas análises após 12 e 24 horas de refrigeração, os diluidores 0 e 10% foram iguais entre si ($P>0,05$), ainda que aquele contendo 10% de clara de ovo tenha apresentado um percentual de espermatozoides móveis de 47,5% (12h) e 30% (24h). Em todos os horários de avaliação, os diluidores de 20% e 30% foram iguais entre si ($P>0,05$), porém não apresentaram bons resultados de motilidade espermática quando comparados ao 0 e 10% ($p<0,05$; com exceção às 0 horas).

Com base na descrição de Siqueira *et al* (2009), o sêmen refrigerado a 5 °C mostrou-se viável até 24 horas após o início do armazenamento, com a motilidade total superior a 60%. Segundo Roca *et al.* (1997b), os espermatozoides permanecem viáveis por um período de até 36 horas, contendo diluidor com 2% de inclusão de gema de ovo. De tal modo, Batista *et al.* (2014b), o sêmen de bode preservado a 5°C por até 24 horas antes do congelamento, não afetou a viabilidade espermática em comparação com o sêmen congelado, sendo o resfriamento uma alternativa viável a ser realizada antes do congelamento. Ademais, Andrabi *et al.* (2016) observaram que os espermatozoides diluídos à base de leite desnatado, com ou sem plasma seminal, armazenados a 4°C mantiveram-se preservados em até 72 horas. Ressalta-se que os resultados apresentados por estes autores são superiores aos encontrados neste estudo, onde o sêmen mostrou-se viável até 12 horas.

Tabela 2. Percentual de espermatozoides móveis de sêmen de caprinos nativos refrigerado durante 24 horas com diluidor contendo clara de ovo.

Concentração	0h	2h	6h	12h	24h
0	67,5 a	52,5 a	47,5 a	42,5 a	22,5 a
10%	72,5 a	52,5 ab	47,5 a	47,5 a	30 a
20%	65,0 a	30,0 b	30,0 a	30,0 ab	15,0 a
30%	62,5 a	42,5 ab	23,3 b	20,0 b	12,5 a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatística para a concentração de clara de ovo incluída no diluidor, pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

Fonte: Autora (2024)

Em relação aos parâmetros morfológicos, não houve diferença no mesmo horário nas diferentes concentrações ($p>0,05$) (Tabela 3). Entretanto, ao longo do período de resfriamento, a quantidade de espermatozoides normais na mesma concentração ao longo dos

horários avaliados apresentou uma queda significativa, assim 0 e 24 horas foram diferentes estatisticamente para 0, 10%, 20% e 30% de inclusão da clara de ovo junto ao soro fisiológico (Tabela 3).

Mocé *et al.* (2023) observaram que, além de alterações negativas nos parâmetros cinéticos e morfológicos após 24 horas de resfriamento, estando associado à modificações na flora microbiana presente no sêmen diluído (aumento de *Aeromonas* e *Chryseobacterium*), que por sua vez, competem com as células espermáticas por nutrientes e produzem metabólitos danosos a estas.

Tabela 3. Percentual de espermatozoides normais durante 24 horas de conservação sob refrigeração do sêmen de bodes nativos.

Concentração	0h	2h	6h	12h	24h
0	45,4 a	38,9 a	31,9abc	23,4 cd	17,0 d
10%	51,9 a	38,8 b	33,5 bc	25,3 cd	14,3 d
20%	52,0 a	33,6 b	28,1 bc	22,5 c	17,8 c
30%	47,4 a	36,1 ab	20,9 bc	18,8 c	16,2 c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatística para a concentração de clara de ovo incluída no diluidor, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: Autora (2024)

Observou-se que para defeitos de cabeça ao longo do resfriamento (Tabela 4), a concentração de 0% apresentou diferenças estatísticas entre 0 e 24 horas (3,1% vs. 13,5%; $p < 0,05$) e 12 e 24 horas (4,0% vs. 13,5%; $p < 0,05$). Ademais, entre 0 e 12 horas são iguais estatisticamente ($p > 0,05$). No horário de 24 horas (14,8%), a concentração de 10% mostrou-se diferente de 0 horas (1,9%) e 2h (6,1%), assim como a concentração de 20% (15,2 vs. 1,3%) e a de 30% (18,0 vs. 2,1%). Quanto à peça intermediária, não houve diferença estatisticamente significativa das concentrações ao longo do resfriamento ($p > 0,05$). Observa-se que a porcentagem de defeitos aumenta para todas as concentrações ao longo das 24 horas, corroborando a diminuição da porcentagem de espermatozoides normais.

Tabela 4. Percentual de espermatozoides com defeitos de cabeça durante 24 horas de conservação sob refrigeração do sêmen de bodes nativos.

Concentração	0h	2h	6h	12h	24h
0	3,1 a	4,9 ab	8,4 ab	4,0 a	13,5 b
10%	1,9 a	6,1 a	6,9 ab	5,3 ab	14,8 b
20%	1,3 a	5,9 ab	9,9 ab	10,3 ab	15,2 b
30%	2,1 a	5,4 a	6,9 ab	7,5 ab	18,0 b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatística para a concentração de clara de ovo incluída no diluidor, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: Autora (2024)

Com relação aos defeitos no flagelo, diferenças estatísticas foram observadas ao longo das 24 horas (Tabela 5), na concentração de 0% houve diferença significativa entre os horários de 0 e 24 horas (43,6 vs. 60,7%). Na concentração de 10%, os horários de 12 e 24 horas (63,8 vs. 61,5%; $p > 0,05$) foram iguais entre si, mas diferentes de 0 horas (38,4%; $p < 0,05$). Durante o resfriamento, a concentração de 20% não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$). Na concentração de 30%, os defeitos no flagelo mostraram-se mais acentuados no horário de 12 horas (68,8%).

O uso de sêmen refrigerado a 5 °C em até 24 horas seria uma opção viável e eficiente para o transporte a longas distâncias (Siqueira *et al.* 2009), na condição de refrigerado, o sêmen apresenta taxa de fertilidade elevada para a inseminação artificial em relação ao sêmen congelado (Traldi, 1994) e apresentam taxas de nascimento de 60 a 80% com o sêmen refrigerado (Ritar; Salamon, 1983; Roca *et al.*, 1997b), quando comparado ao congelado, os valores obtidos foram entre 30 a 70%.

Tabela 5. Percentual de espermatozoides com defeitos cauda durante 24 horas de conservação sob refrigeração do sêmen de bodes nativos.

Concentração	0h	2h	6h	12h	24h
0	43,6 a	46,4 ab	53,4 ab	67,1 b	60,7 b
10%	38,4 a	48,1 ab	52,6 ab	63,8 b	61,5 b

20%	42,9 a	51,9 a	53,0 a	62,0 a	58,2 a
30%	44,8 a	52,1 ab	42,0 a	68,8 b	56,7 ab

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatística para a concentração de clara de ovo incluída no diluidor, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: Autora (2024)

Em relação à interação dos parâmetros cinéticos e morfológicos (Tabela 6), destaca-se que os espermatozoides normais mostraram alta correlação com a motilidade total ($r = 0,744$; $p < 0,001$), com a motilidade individual progressiva ($r = 0,756$; $p < 0,001$) e uma correlação negativa aos defeitos no flagelo ($r = -0,552$; $p < 0,001$). Já a motilidade total apresentou alta correlação com a motilidade individual progressiva ($r = 0,828$; $p < 0,001$) e uma correlação negativa aos defeitos no flagelo ($r = -0,470$; $p < 0,001$). Ademais, a motilidade individual progressiva apresentou correlação negativa apenas com os defeitos no flagelo ($r = -0,502$; $p < 0,001$).

Tabela 6. Correlações entre os parâmetros cinéticos e morfológicos observados durante 24 horas de conservação do sêmen de bodes nativos refrigerado.

	Normais	Motilidade total	Motilidade individual p.
Motilidade total	0,744***	-	-
Motilidade individual p.	0,756***	0,828***	-
Flagelo	- 0,552***	- 0,470***	- 0,502***

Nota. *** $p < .001$

Fonte: Autora (2024)

4. CONCLUSÃO

Conforme os dados obtidos dos parâmetros cinéticos e morfológicos, concluiu-se que não houve efeito benefício da adição da clara de ovo, independente da concentração, sobre o resfriamento do sêmen caprino a 5 °C. Com uso do soro fisiológico o resfriamento é viável a até 6 horas após a diluição e conservação a 5°C, para uso em inseminação artificial. Em adição, a técnica é simples, de fácil preparo e de baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRABI, SM Hassan et al. In vitro viability and longevity of cooled Beetal buck spermatozoa extended in skimmed milk and Tris-citric acid based extenders. *Small Ruminant Research*, v. 143, p. 61-66, 2016

ARAÚJO, Airton Alencar. Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle| Theses. fr. 2000.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, CN Tecnologias avançadas de reprodução assistida (TRA) em cabras. *Animal Reproduction Science*, v. 82, p. 255-266, 2004.

BATISTA, M. et al. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology*, v. 71, n. 8, p. 1307–1315, 2009a.

BATISTA, M. et al. Post-thaw quality of buck semen samples cooled at 5° C up to 2 days before cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 121, n. 1, p. 101-105, 2014b.

BURGUETE, I. *et al.* Effect of buck, year and season of insemination on prolificacy of Murciano–Granadina goats. *Small Ruminant Research*, v. 29, n. 1, p. 121-123, 1998.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 2013.

CROGUENNEC, Thomas et al. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 10, p. 4883-4889, 2000.

DURRANT, B. S. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology*, v. 71, n. 1, p. 113-122, 2009.

ENGLAND, G. C. W.; VERSTEGEN, J. P. Radiographic contrast medium for uterine insemination in the bitch, and its effect upon the quality and fertility of fresh dog semen. *Theriogenology*, v. 46, n. 7, p. 1233-1241, 1996.

FONSECA, J. F. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. 2006.

FURSTOSS, Vincent *et al.* O valor da porcentagem de espermatozoides móveis na predição de uma porção significativa da variação de fertilidade do sêmen de veado congelado-descongelado. *Theriogenology*, v. 74, n. 7, p. 1197-1206, 2010.

KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, v. 53, n. 6, p. 1285-1293, 2000.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science*, v. 62, n. 1-3, p. 113-141, 2000.

LORENZ, F. W.; TYLER, Albert. Extension of motile life span of spermatozoa of the domestic fowl by amino acids and proteins. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 78, n. 1, p. 57-62, 1951.

MIAN, A. A. et al. Effect of dilution of fowl semen with normal saline on the fertility of RIR hens through artificial insemination. 1990

MOCÉ, María Lorena et al. Microbial composition of goat buck's ejaculates is modified by the process of preparing and storing refrigerated semen doses. *Theriogenology*, v. 209, p. 202-212, 2023.

MOREIRA, E.P., MOURA, A.A.A., ARAÚJO, A.A.. Efeito da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. *Rev Bras Zootec*, v.30, p.1704-1711, 2001.

NRC, 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids*, 1st edition. National Academies Press, Washington, DC, USA, 2007.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 98, n. 1-3, p. 176-184, 2011.

OMANA, Dileep A.; WANG, Jiapei; WU, Jianping. Co-extraction of egg white proteins using ion-exchange chromatography from ovomucin-removed egg whites. *Journal of Chromatography B*, v. 878, n. 21, p. 1771-1776, 2010.

PALHARES, M. S. Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I. Características termodinâmicas e funcionais; II. Desempenho reprodutivo das éguas inseminadas. 1997. 246f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. 1983.

ROCA, J. et al. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology*, v. 38, n. 1, p. 115-125, 1992^a

ROCA, J. et al. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5 C. *Small Ruminant Research*, v. 25, n. 2, p. 147-153, 1997b

SALAMON, Steven; MAXWELL, William Maxwell Chisholm. Storage of ram semen. *Animal reproduction science*, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SIQUEIRA, A. P. et al. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p. 66-71, 2009.

SOUZA, Andreia Fernandes et al. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 3, p. 329-336, 2006.

STEIN, Penelope E. et al. Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*, v. 347, n. 6288, p. 99-102, 1990.

TRALDI, A. de S. Tópicos em reprodução e IA em caprinos—Manual técnico. Texto apostilado, 1994.

TEDESCHI, Luis Orlindo; CANNAS, Antonello; FOX, D. Gene. A nutrition mathematical model to account for dietary supply and requirements of energy and other nutrients for domesticated small ruminants: The development and evaluation of the Small Ruminant Nutrition System. *Small Ruminant Research*, v. 89, n. 2-3, p. 174-184, 2010.

THUNDATHIL, J. C. et al. The effects of increased testicular temperature on testis-specific isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in sperm and its role in spermatogenesis and sperm function. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 170-177, 2012.

WILCOX, F. H. Effect on fertility of temperature, handling methods, Lake's solution and the addition of egg white, egg yolk, and sugars to the diluent used in storing chicken semen.

Poultry Science, v. 39, n. 2, p. 459-467, 1960.

XUMSAI, ML Subhanidhi. Albúmen de ovo líquido, um diluente eficaz de sêmen de aves para inseminação artificial. World's Poultry Science Journal, v. 15, n. 3, p. 250-254, 1959.