

EFEITOS DA ADIÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE EM DILUENTE PARA ACONDICIONAMENTO A 5°C DE SÊMEN OVINO

TAVARES, Georgia da Cruz^{1*}; GHELLER, Stela Mari Meneghello¹; DUVAL, Luzia Hallal¹; FERREIRA, Carlos Eduardo Ranquetat¹; CORCINI, Carine Dahl^{1,2}

¹Grupo de pesquisa ReproPel - Faculdade de Veterinária – UFPel
Departamento de Patologia Animal-FV/UFPel
*E-mail: georgiadacruz.tavares@gmail.com
Site: <http://www.ufpel.edu.br/fvet/repropel-pigpel>

1. Introdução

O uso de biotecnologias aplicadas a reprodução foram introduzidas na ovinocultura com o objetivo de acelerar o ganho genético, visando o incremento da eficiência reprodutiva (Smith, 1986). Segundo Maxwell e Salamon (1993), os vários diluentes utilizados para a conservação do sêmen ovino resfriado a 4° ou 15°C não permitem um armazenamento prolongado, sendo a sua utilização limitada há 48 horas para obtenção de boas taxas de fertilidade. Após 12-24 horas de armazenamento, o poder fecundante do sêmen diminui (30% ou mais) e, conseqüentemente, a fertilidade após a inseminação artificial.

Assim se faz necessária a busca por substratos que quando adicionados ao diluente melhorem suas características e consigam manter as células espermáticas viáveis por um período de tempo mais prolongado. Uma alternativa para a conservação do sêmen é a utilização de extrato de própolis verde incorporado ao diluente, se diferenciando por ser de origem natural. A própolis possui um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antibiótica, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral e efeitos antioxidantes (Castilho et al, 2009). Resultados evidenciam que o efeito protetor exibido por este composto natural aos espermatozoides humanos está relacionado, pelo menos em parte, pela capacidade antioxidante de seus ativos componentes, demonstrando possuir a capacidade de proteger a membrana do espermatozoide a partir da ação deletéria do ataque oxidativo reduzindo a peroxidação lipídica (Russo et al, 2006).

A manutenção da viabilidade e um maior tempo de sobrevivência das células espermáticas requerem diluentes que promovam uma maior proteção à membrana celular, exercendo um papel fundamental na conservação do sêmen no processo de refrigeração (Figueirêdo, 2006; Figueirêdo et al., 2007). A adição de própolis mostra ser uma alternativa para que possa se obter esses resultados. Este trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações de própolis ao diluente para sêmen ovino refrigerado.

2. Material e Métodos

Foram utilizados 4 carneiros com fertilidade conhecida, realizando-se 10 coletas de sêmen para cada macho, através do método de coleta por vagina artificial totalizando 40 ejaculados. Foram avaliados os parâmetros de motilidade e vigor espermático, durante os períodos de 0h, 2h, 24h, 48h, 72h e 96h de armazenamento sob refrigeração a 5°C. Os diluentes utilizados foram: tratamento controle constituído de tris-gema-glicerol (T1) (Evans & Maxwell, 1987) para avaliação da toxicidade a

mesma constituição do controle acrescido de 2,5% (T2), 5% (T3), 7,5% (T4), 10% (T5) de extrato de própolis verde, cada amostra tem uma concentração final de 1×10^8 espermatozóides viáveis/ml. A motilidade foi determinada pelo percentual de células móveis identificadas no campo do microscópio, em aumento de 200x (Bearden e Fuquay, 1997) com escala de motilidade (0 – 100%) e vigor de (0-5) (CBRA, 1998). Estas avaliações foram realizadas por um único técnico treinado. Antes das análises todas as amostras acondicionadas foram aquecidas em banho maria (5 min por 37°C). Somente se utilizou neste estudo, ejaculados que quando coletados apresentassem motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 (1-5).

As análises estatísticas foram conduzidas através do *software* Statistix 8.0® (2003), foi realizada análise de variância (ANOVA) com comparação de médias pelo teste de Tukey.

3. Resultados e Discussão

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na motilidade espermática entre os tratamentos nas 72h de resfriamento (Tab. 1).

No sêmen avaliado nas 0 hs não houve diferença entre os tratamentos, o que corrobora com resultados encontrados em sêmen de caprinos que a motilidade espermática não diferiram entre si (Castilho et al, 2009).

Tabela 1. Motilidade espermática nas diferentes concentrações de própolis durante o período de acondicionamento (média \pm erro padrão da média).

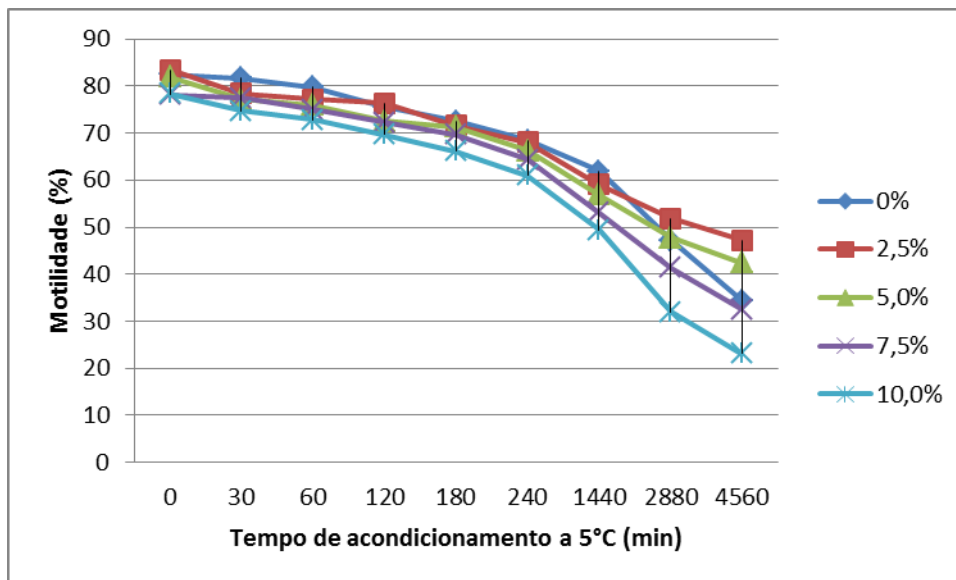
Horas	Concentração de extrato de própolis verde				
	Controle	2,5%	5%	7,5%	10%
0hs	82,5 \pm 2,0 ^A	83,4 \pm 1,1 ^A	81,9 \pm 1,5 ^{AB}	78,1 \pm 2,6 ^{ABCD}	78,4 \pm 2,0 ^{ABCD}
2 hs	75,6 \pm 1,6 ^{ABCDE}	76,3 \pm 1,5 ^{ABCDE}	72,5 \pm 1,6 ^{ABCDEF}	72,2 \pm 1,8 ^{ABCDEF}	69,7 \pm 1,9 ^{BCDEFG}
24 hs	61,9 \pm 1,8 ^{FGHIJK}	59,1 \pm 2,4 ^{GHIJKL}	56,9 \pm 2,3 ^{HIJKL}	53,1 \pm 2,0 ^{IJKLM}	49,4 \pm 2,2 ^{KLMN}
48 hs	47,2 \pm 2,8 ^{LMN}	51,9 \pm 2,8 ^{JKLM}	47,8 \pm 2,6 ^{LMN}	41,3 \pm 2,7 ^{MNO}	31,9 \pm 2,6 ^{OPQR}
72 hs	47,2 \pm 2,8 ^{OPQ}	51,9 \pm 2,8 ^{LMN}	47,8 \pm 2,6 ^{MNO}	41,2 \pm 2,8 ^{OPQ}	31,9 \pm 2,6 ^{QRSTU}

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferiram significativamente ($p < 0,05$).

Com a adição de própolis pode-se observar que durante o período de armazenamento de 2 hs o T1 não diferiu dos demais exceto na concentração de 10% (T 5), onde este demonstrou uma diminuição na sua motilidade total.

Após 24 hs evidenciou-se que o T1 apresentou motilidade superior aos demais tratamentos porém não diferiu do T2. Nas 48 hs os tratamentos T4 e T5 apresentaram uma maior queda de motilidade quando comparado aos demais tratamentos. E nas 72 hs o T2 apresentou maior motilidade em comparação aos demais tratamentos conforme observado na (Fig. 1). Essa manutenção sugere que pode ter ocorrido proteção da membrana espermática pelo extrato de própolis, da peroxidação lipídica reduzindo a produção de espécies reativas ao oxigênio e a lesão espermática (Ochsendorf, 1999 e Pereira et.al, 2002).

Figura 1: Gráfico da motilidade espermática ao longo do período de avaliação.



No T5 se observou a maior queda de motilidade demonstrando assim que o própolis em maior concentração pode ser tóxico a célula. Este último vem de acordo com o descrito por Oliveira et al. (2007) avaliando o efeito da adição de própolis ao meio diluidor nas concentrações (0,25 e 0,5%) e sua influência nas características físicas do sêmen equino resfriado a 5 °C e concluíram que a própolis não teve efeitos benéficos sobre as características físicas do sêmen resfriado a 5 °C.

Com os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que novas análises sejam realizadas sobre outros padrões de funcionalidade da célula espermática como integridade de membrana, mitocôndria e acrossoma, bem como avaliação do poder antioxidante e antimicrobiano da própolis verde. Foi observado que a mesma não é tóxica aos espermatozoides ovinos para a manutenção da motilidade espermática quando associada ao sêmen fresco, até a concentração de 5%, pois acima desta concentração demonstra uma maior toxicidade a célula durante o armazenamento.

4. Conclusão

Conclui-se que a adição de própolis na concentração de 2,5% manteve a motilidade mais elevada quando comparado aos demais tratamentos inclusive o controle. A adição de própolis na concentração de até 5% pode ocorrer sem perdas na taxa de motilidade.

5. Referências

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: **applied Animal Reproduction**, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp.159-170.

CASTILHO, E.F.; GUIMARÃES, J.D.; MARTINS L.F.; PINHO R.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; ESPECHIT C.J.B. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2335-2345, 2009.

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49 p.

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

FIGUEIRÊDO, E. L. **Avaliação in vitro e in vivo do sêmen Ovino resfriado em diluidores à base de água de coco no estado do Ceará**. 2006, 61p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Ceará.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; CORDEIRO, M.A.; SOUZA, P.T.; DIÓGENES FILHO, R.N.; VIEIRA, V.E.; SILVA FILHO, A.H.S.; MESQUITA, F.L.T.; SALGUEIRO, C.C.M.; FEITOSA, J.V. Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em água de coco in natura e em pó. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 14, n. 2, p. 95-97, 2007.

MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Liquid Storage of Ram Semen: a Review. **Reprod. Fertil. Dev.**, Collingwood, v. 5, p. 613-638, 1993.

OCHSENDORF, F.R. **Infections in the male genital tract and reative oxygen species**. **Human Reproduction**, v.5, n.5, p.399-420, 1999.

OLIVEIRA, R.R.; GUIMARÃES, J.D.; CHAVES, K.A. et al. Efeito da adição de própolis ao meio diluidor e suas influências nas características físicas do sêmen equino resfriado a 5°C. In: **SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 18., 2007, Viçosa, MG. Anais... Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. (CD-ROM).

PEREIRA, S.A.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n.2,2002

RUSSO A., TRONCOSO N., SANCHEZ F., GARBARINO J.A., VANELLA A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, v. 78 (2006) 1401 – 1406

SMITH, C. Use of embryo transfer in genetic improvements of sheep. **Animal Production**, v.42, p.81-88, 1986.