



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
Curso de Medicina Veterinária

TALYTA LUIZA MIRANDA LIMA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO NONI (*MORINDA*
CITROFILIA) EM SÊMEN DE OVINO SOBRE A CINÉTICA
ESPERMÁTICA**

São Luís – MA

2017

TALYTA LUIZA MIRANDA LIMA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO NONI (*MORINDA
CITROFILIA*) EM SÊMEN DE OVINO SOBRE A CINÉTICA
ESPERMÁTICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Medicina Veterinária da
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA,
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária.

Local, ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Ricardo de Macêdo Chaves (Orientador)
Departamento das Clínicas Veterinárias / CCA / UEMA

Profº Drº Danilo Cutrim Bezerra
DC/UEMA

Profº Drº Absai de Oliveira Sousa
DC/CCA

Samara Cristine Costa Pinto
Samara Cristine Costa Pinto (Co-Orientadora)
Departamento de Reprodução Animal/VRA/ USP

Profº Drº Cícero Soares dos Santos
DC/CCA

Lima, Talyta Luiza Miranda.

Efeito de suplementação do Noni (*Morinda citrifolia*) em sêmen de ovino sobre a cinética espermática / Talyta Luiza Miranda. – São Luís, 2017.

53 p.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Prof. Ricardo de Macedo Chaves.

1. Antioxidantes. 2. Células espermáticas. 3. Ovino. 4. *Morinda citrifolia* Linn. I. Título.

*"Quando alguém encontra seu caminho,
precisa ter coragem suficiente para dar passos errados.
As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus
utiliza para mostrar a estrada."*

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado me dando força, coragem e garra para lutar, conseguindo assim atingir meus objetivos.

À minha família por estar sempre ao meu lado, apoiando as minhas decisões, em especial ao meu pai, Sebastião Miranda Lima, que sem medir esforços me proporcionou a oportunidade de estudar. À minha mãe, Maria Socorro Miranda Lima, que é um exemplo de amor, bondade e dignidade. Vocês sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado quando precisei. Aos meus irmãos Renato Bruno Miranda Lima e Ricardo Bruno Miranda Lima, por todos os momentos que estiveram ao meu lado sejam estes de alegria, festa, lágrimas e em tantos outros que precisei.

À toda minha família, materna e paterna, pelo apoio e carinho. E à minha vovó Maria de Jesus, agradeço pelo exemplo de fé e força.

À Universidade Estadual do Maranhão por ter fornecido os conhecimentos necessários, por meio de seu corpo docente, técnicos administrativos e infraestrutura física, para que eu pudesse concretizar com êxito o curso de Medicina Veterinária.

A meu professor e orientador, Ricardo de Macedo Chaves pela ajuda e atenção na realização e prática da monografia, além de auxílio nos momentos difíceis. E pelas práticas e ensinamentos a área que me faz ser maravilhada em futuramente trabalhar com.

À minha Co-orientadora, Sâmara Cristine Costa Pinto, por me proporcionar conhecimentos ímpares e pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela dedicação, apoio, ajuda, por estar sempre disposta a me orientar independente de dia ou hora, sem sua orientação e conselhos este trabalho certamente teria um grau de dificuldade maior. Agradeço pelos aprendizados obtidos sobre trabalho, dedicação, amizade, valores e conhecimento sobre a vida em geral. Momentos singulares foram vividos e evoluções pessoais e em grupo também.

À Wayllba Assunção Barcelos, que nos ajudou a concretizar o trabalho de Conclusão de Curso, sendo essencial para conclusão de todas as fases e processos nessa atividade, dedicando bastante seu tempo em prol de efetivar nosso trabalho. Obrigada pelo desempenho, força, apoio, carinho e compartilhamento de sua sabedoria em nossa empreitada. Percebo que os momentos que realizamos juntas foi grandioso e obrigada por participar mais dessa vitória. Torço pelo seu sucesso hoje e sempre.

Aos meus amigos, a quem sempre dedicarei amizade e carinho, e o meu desejo de que o sucesso permeie suas vidas e ilumine seus caminhos. Aos meus queridos e todos que compartilharam esses cinco anos ao meu lado, que nossa amizade resista e se fortaleça com o tempo e deixo meus sentimentos sinceros de carinho e gratidão.

A todos aqueles a quem conheci por onde passei, a todos aqueles a quem amei e que me amaram, muito obrigada pela participação na construção da minha história.

RESUMO

O Noni (*Morinda citrifolia L.*) é considerado um fruto com potencial antioxidante, concluído por meio de experimentos em laboratórios empregando extratos, promovem à eliminação de radicais livres, é um fruto que vem sendo consumido no mundo por apresentar propriedades nutricionais e terapêuticas possuindo alta quantidade de compostos fenólicos, instigando a atenção da comunidade científica. Muitos experimentos têm relatado o papel dos oxidantes na fisiologia espermática, como a possibilidade de se adicionar substâncias antioxidantes aos diluentes e indiretamente ao sêmen, preservando a integridade destes gametas. Com o intuito de buscar novas fontes naturais de antioxidantes objetivou-se avaliar o desempenho do Noni (*Morinda citrifolia L.*) em sêmen de ovinos sobre as características espermáticas, como motilidade, integridade de membranas e morfologia espermática durante o teste de termorresistência rápido. Nas análises estatísticas, foram utilizados os testes paramétricos e não paramétricos: teste t, teste de Tukey, teste de Friedman, teste de normalidade Shapiro-Wilk e Lilliefors. Os tratamentos diferiram quanto à concentração do extrato aquoso do Noni adicionado ao meio diluidor: controle, sem adição do extrato; e com três concentrações 2, 0 μ l; 3,5 μ l e 5,0 μ l. Para tanto, 9 animais foram utilizados, onde cada ejaculado foi, diluídos de acordo com os tratamentos e submetidos ao teste de termorresistência (TTR) e avaliado quanto a motilidade, vigor espermático, teste de integridade da membrana plasmática pelo teste Eosina - Nigrosina. O resultado encontrado para o TTR mostrou a concentração 5 μ l foi capaz de manter a motilidade progressiva espermática até o final sem ter diferença entre o momento zero e último comparando ao tratamento controle, nos tempos estudados (0, 20, 40 e 60 minutos). Conclui-se que a utilização do Noni é uma fonte promissora de antioxidantes, que pode ser utilizada na suplementação durante o processo de diluição e o que o mesmo preserva a motilidade espermática e as membranas espermáticas segundo o presente estudo.

Palavras-Chave: antioxidantes, células espermáticas, ovino, *Morinda citrifolia L.*

ABSTRACT

The noni (*Morinda citrifolia* L.) is considered a fruit with antioxidant potential, concluded through experiments in laboratories employing extracts, promote the elimination of free radicals, it is a fruit that has been consumed in the world because it presents nutritional and therapeutic properties having high Phenolic compounds, instigating the attention of the scientific community. Many experiments have reported the role of oxidants in sperm physiology, such as the possibility of adding antioxidant substances to the diluents and indirectly to the semen, preserving the integrity of these gametes. The objective of this study was to evaluate the performance of Noni (*Morinda citrifolia* L) in sheep semen on sperm characteristics, about motility, membrane integrity and sperm morphology during the rapid thermoresistance test. In the statistical analyzes, were used the parametric and non-parametric tests: t test, Tukey test, Friedman test, Shapiro-Wilk and Lilliefors normality tests. The treatments differed as to the concentration of the Noni aqueous extract added to the dilution liquid: control, without addition of the extract; And with three concentrations 2,0 μ l; 3.5 μ l and 5.0 μ l. For this, 9 animals were used, where each ejaculate was diluted according to the treatments and submitted to the thermoresistance test (TTR) and evaluated for motility, sperm vigor, and plasma membrane integrity test using the Eosin-Nigrosine test. The results found for the TTR showed that the concentration 5 μ l was able to maintain progressive sperm motility until the end without any difference between the zero and the last moment compared to the control treatment at the times studied (0, 20, 40 and 60 minutes). It is concluded that the use of Noni is a promising source of antioxidants, which can be used in the supplementation during the dilution process and what is even preserving sperm motility and as sperm membranes according to the present study.

Keywords: Fruit, diluent, antioxidants, sperm cells, sheep, *Morinda Citrifolia* L

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Cadeia de Formação das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	25
Figura 2 – Fruto maduro do Noni sendo descascado, despolpado e retirado as sementes.....	26
Figura 3 – Extrato do Noni.....	27
Figura 4: Teste de Eosina-Nigrosina	29

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	Pág.
Tabela 1- Valores Médios e seus respectivos desvios padrões (DP) em porcentagem da Motilidade Espermática Progressiva (MP) e Vigor Espermático	29
Tabela 2- Porcentagem de Espermatozóides com a Integridade da Membrana Espermática Íntegra (IM)	33
Tabela 3 – Media e desvio padrão para defeitos maiores avaliados durante o TTR segundo os tratamentos.....	35
Tabela 4 - Média e desvio padrão avaliados durante o TTR segundo os tratamentos.....	35
Gráfico 1 – Valores de Média e erro padrão da Motilidade Progressiva Espermática na concentração 5 μ l nos tempos estudados.....	31
Gráfico 2 – Valores de Média e erro padrão da Motilidade Progressiva Espermática na concentração controle nos tempos estudados.....	31
Gráfico 3 - Valores de Média e erro padrão da Motilidade Progressiva Espermática na concentração 2 μ l nos tempos estudados.....	32
Gráfico 4 - Valores de Média e Erro padrão da Motilidade Progressiva Espermática na concentração 3,5 μ l nos tempos estudados.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
SOD	Desmutase Superóxida Extracelular
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Sptz	Espermatozoide
GPx	Glutationa Peroxidase
°C	Grau Celsius
OH°	Hidroxila
I.A.	Inseminação Artificial
µg	Microgramas
Mg/ml	Miligramas por mililitro
ml	Milímetros
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
O₂ –	Radical Superóxido
REDOX	Reduções Oxidativas
O₂ –	Superóxido
TTR	Teste de Termo resistência

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Ovinocultura	14
2.2 Meio diluidor	16
2.3 Estresse Oxidativo (EO)	18
2.4 Antioxidantes	21
2.4.1 Noni (<i>Morinda citrifolia</i>)	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 Animais e Local de Estudo	24
3.2 Preparo do Extrato	25
3.3 Diluição	25
3.4 Avaliações do Sêmen	26
3.4.1 Teste de Termo Resistência Lento Modificado	26
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1

2 **1. INTRODUÇÃO**

3 No âmbito nacional, a ovinocultura tem demonstrado um potencial crescente para
4 o agronegócio, principalmente na produção de carne por esta atividade ser caracterizada
5 pelos seus rebanhos de diferentes tamanhos e produtividades com leve tendência para
6 médios e grandes produtores. Incorporar novos campos produtivos não tradicionais,
7 principalmente nas regiões Sudeste e Centro-oeste, gerou um crescimento na produção nos
8 últimos anos, porém não é competente para suprir a demanda no mercado interno (VIANA,
9 2008). Estes fatores justificam interesse em intensificar a exploração econômica dos ovinos
10 por compor principal atividade produtiva de diversas propriedades (SALAMON et al,
11 2000).

12 Ovinos foram um dos primeiros animais a serem domesticados pelo homem e, há
13 séculos, vêm sendo explorados pela qualidade de carne e lã (HAFEZ et. al., 2004). Segundo
14 Fonseca, (2005), a ovinocultura está em crescimento mundial e intensificado,
15 principalmente nas últimas décadas, com destaque nos países em desenvolvimento.
16 Seguindo esta disposição mundial, há probabilidade de multiplicar em cinco vezes o
17 rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos. Considerando 100 milhões de cabeças
18 de ovinos, havendo assistência à reprodução, para permitir o aumento da eficiência
19 reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos e para a multiplicação mais competente dos
20 genótipos (FONSECA, 2005).

21 Os ovinos são animais que atualmente vem sofrendo um racional e prudente
22 manejo que envolve sanidade, nutrição, reprodução e melhoramento genético. Com isso,
23 os produtores têm acessibilidade a procedimentos biotecnológicos que visam maior
24 produtividade, dentre elas a inseminação artificial (I.A.) com sêmen congelado. Porém
25 ainda não se obteve uma técnica em que se conseguiu resultados quanto à fertilidade sem
26 variações, devido às particularidades do sêmen após descongelamento; às próprias
27 características fisiológicas da fêmea e ou qualidade seminal do macho. No entanto, a
28 biotécnica de IA aliada a criopreservação oferta benefícios, como por exemplo, a manutençã
29 do germoplasma masculino dos bons reprodutores por tempo ilimitado fornecendo um
30 programa de melhoramento animal. (SALAMON e MAXWELL, 1995).

31 Os espermatozoides e o plasma seminal, apresentam naturalmente um sistema de
32 defesa constituído por antioxidantes responsáveis por manter a capacidade espermática
33 (CÂMARA e GUERRA, 2011). Porém quando o sêmen é diluído para congelamento, a
34 defesa inerente é afetada. Se torna então, fundamental a busca de novos componentes com

1 ação contrária a atuação dos agentes oxidativos que podem ser incluídos no meio diluidor,
2 nivelando a ação dos agentes oxidantes para que as células permaneçam viáveis por mais
3 tempo. Em termos fisiológicos, os antioxidantes encontram-se numa situação equilibrada.
4 Havendo um desequilíbrio entre a produção das EROs e os antioxidantes, ocorre o estresse
5 oxidativo e na reprodução, pode provocar efeitos deletérios ao sistema reprodutor
6 masculino como distúrbios durante a espermatogênese (LOPES, 2010). Para reverter este
7 quadro, é preciso reduzir a produção de ERO ou aumentar a quantidade de antioxidantes
8 disponíveis. Nesse sentido, vários estudos têm sido desenvolvidos.

9 A pesquisa acerca de compostos antioxidantes vem evoluindo nos últimos 10
10 anos. A busca por compostos antioxidantes fenólicos de origem natural teve por finalidade
11 o emprego na conservação de alimentos ou que mostraram ser eficientes em testes *in vitro*,
12 inibindo a reação de oxidação celular. Dentre os compostos fenólicos naturais destacam-se
13 os flavonóides e os ácidos fenólicos.

14 Dessa forma, produtos advindos da natureza, como plantas e ervas, têm sido e são
15 usados por muito tempo, por diferentes locais em todo o mundo, como parte do acervo dos
16 conhecimentos tradicionais. E o uso de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo
17 na assistência à saúde em função de sua fácil receptividade, disponibilidade e custo
18 razoavelmente barato (VARANDA, 2006; BALUNAS et al., 2006). Os compostos
19 bioativos mais comumente encontrados em vegetais, frutas e hortaliças, formadas no meta-
20 bolismo secundário das plantas, denominada de substâncias fenólicas, as quais são en-
21 contradas livres ou ligadas a açúcares e proteínas, são responsáveis pelo desenvolvimento
22 da planta, germinação da semente, proteção contra pragas, perdas oxidativas e auxilia nos
23 processos sensoriais (LIU, 2007).

24 Em variadas regiões do mundo, estudos têm caracterizado os vários produtos
25 naturais com o intuito de identificar e quantificar os componentes bioativos destes vegetais
26 a fim de utilizá-los na alimentação da população e, com isso, reduzir o risco de surgimento
27 de doenças (NEVES, 2012). Nesse contexto, as frutas exóticas, como o Noni (*Morinda*
28 *citrifolia* Linn), têm ganhado cada vez mais reconhecimento, pela busca das vantagens que
29 estas possam ofertar, como na procura por diferentes tipos de fontes alimentares e pelos
30 resultados satisfatórios que foram se destacando ao longo dos estudos científicos, como os
31 efeitos antidiabéticos do suco de fruta Noni, fermentado em modelos animais, ainda mais
32 com incidência de doenças metabólicas inflamatórias crônicas, incluindo dislipidemia,
33 hipertensão ou disfunção endotelial vascular, que está aumentando em todo o
34 mundo. (MIRMIRAN, 2014). Além de tradicionalmente, a casca de Noni e as raízes serem

1 usadas como corante ou roupa, enquanto que o uso medicinal de todas as partes de plantas,
2 incluindo folhas e frutos, foram restringidos principalmente para tratar feridas, infecções,
3 cólicas menstruais, irregularidades intestinais, diabetes, hipertensão ou purgativa
4 (MCCLATCHEY e WANG, 2002). Nesse contexto, as frutas exóticas, como o Noni
5 (*Morinda citrifolia* Linn), têm ganhado cada vez mais espaço, tanto pela busca de
6 benefícios que estas possam oferecer.

7 Devido ao potencial de ação antioxidante do Noni aliado a necessidade da redução
8 dos danos causadas a célula espermática, durante os processos de manipulação, objetivou-
9 se com este estudo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de extrato aquoso
10 de Noni em meio diluente para sêmen ovino.

11

12 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

13 **2.1 Ovinocultura**

14 O Brasil apresenta um efetivo de aproximadamente 17,2 milhões de cabeças
15 ovinas, distribuídas em todo território nacional e cerca de aproximadamente 233 mil
16 cabeças no Maranhão ocupando a 13ª posição de um grupo com 20 municípios da
17 Federação que possuíram os maiores efetivos, em ordem decrescente (IBGE, 2013). A
18 baixa oferta interna e o aumento da demanda pelo consumo da carne ovina no Brasil, vem
19 encorajando o crescimento e fortalecimento da ovinocultura brasileira e estimulando vários
20 pesquisadores a ampliar e moldar às novas condições de criação técnica para incrementar
21 a produtividade. (GARCIA et al., 2000; BARROS et al., 2003 e 2005; VIANA e
22 SILVEIRA, 2009).

23 A criação de ovinos é uma atividade agropecuária de importância social e
24 econômica em definidas regiões do Brasil, enquanto em outras, mostra-se em fase
25 emergente, com aspectos apontando para o desenvolvimento desta cadeia produtiva no
26 país, como a produção nacional de carne e leite, que sequer abastece o mercado interno.
27 Admite-se que em pouco tempo a demanda aumentará, requerendo sistemas de criação
28 focados na produtividade, em função da qualidade e diferencial dos produtos de origem
29 ovina. Assim, torna-se considerável desenvolver e adequar tecnologias voltadas ao
30 incremento produtivo. Para tanto, devem estar e operar concomitantemente recursos
31 humanos, meio ambiente, nutrição, sanidade, genética e reprodução. Dentre eles, a
32 eficiência reprodutiva desempenha papel de destaque, por ser uma área de intensos estudos,
33 avanços e que vem sendo cada vez mais explorada em seu aspecto aplicado (FONSECA,
34 2014).

1 A ovinocultura vem sendo estimulada e submetida à diversificadas estratégias de
2 manejo para se obter uma maior produtividade na área, principalmente as reprodutivas e às
3 voltadas para mudanças em sua genética animal. E neste último caso, a melhor ferramenta
4 acessível para os produtores ou interessados em melhorar seu rebanho (NASCIMENTO et
5 al., 2015), é inserir as biotécnicas associadas à reprodução, como a inseminação artificial
6 (IA) em sêmen congelado, destacando-se como uma das tecnologias que sofreu mais
7 ampliações em seu uso (PAULA, 2011). Ao longo das últimas décadas, a produção de
8 ovinos obteve alterações em suas conexões dentro de sua cadeia produtiva, devido a uma
9 ampliação dos mercados interno e externo. Explorados de forma tradicional e extensiva, os
10 ovinos aumentaram seu contingente populacional e sua qualidade genética, sendo
11 observadas graças ao êxito das biotécnicas que vêm sendo aplicadas (SILVA, 2010).

12 A criopreservação de sêmen dos animais domésticos contribui para a expansão
13 das biotécnicas, como a inseminação artificial (IA) e a fertilização *in vitro*. É uma
14 importante técnica reprodutiva que contribui no armazenamento sêmen de animais de alto
15 potencial zootécnico por tempo indeterminado, favorecendo a capacidade reprodutiva do
16 macho, mesmo após morte, permitindo reduzir custos com a criação de reprodutores
17 (CASTELO, 2008).

18 Apesar da criopreservação de sêmen e a IA estarem consolidadas na espécie
19 bovina, em ovinos, caprinos, suínos e equinos existem dificuldades técnicas, econômicas e
20 socioculturais que dificultam a utilização dessas técnicas em larga escala.

21 A inseminação artificial com sêmen congelado é essencial num programa de
22 melhoramento genético. Para isso, é fundamental estar correlacionada às taxas de prenhez,
23 que podem ser restringidas pela tecnologia ou pelas características fisiológicas e
24 reprodutivas do animal. Nas ovelhas, as taxas de prenhez pós IA vaginal ou cervical com
25 sêmen criopreservado, são baixas e recomenda-se a inseminação laparoscópica, que
26 permite a deposição do sêmen no interior do útero, alcançando cerca de 60 a 80% da taxa
27 de prenhez (LUZ et al., 2000).

28 Apesar dos avanços com a inseminação cervical, os resultados inerentes à
29 congelação de sêmen são insatisfatórios em ovinos, já que com a manipulação dos
30 espermatozoides com o intuito de preservá-los e utilizá-los por longos períodos, ocasiona
31 danos à estrutura espermática, cerca de 40 a 50% dos espermatozoides não sobrevivem à
32 congelação comprometendo suas funções biológicas como a diminuição da capacidade
33 respiratória, motilidade e integridade dos componentes estruturais, afeta sua composição
34 lipídica e organizacional da membrana plasmática de espermatozoides ovinos,

1 predispondo-os a defeitos morfológicos, afetando a fertilização. (WATSON, 2000;
2 HINKOVSKA-GALCHEVA 1989; SOARES, 2009; SILVA 2011).

3 A concentração espermática da dose inseminante está relacionada aos motivos que
4 se interpõem na fertilidade do sêmen congelado. Mann (1981 apud LEAHY et al., 2010)
5 relatou o efeito da diluição com a perda de motilidade e viabilidade quando os
6 espermatozoides são diluídos de forma excessiva. A diluição exagerada tem sido relatada
7 como causa de desestabilização da membrana devido à retirada dos agentes protetores o
8 plasma seminal, como fatores antioxidantes, intervindo na fertilidade após a inseminação.

9 Estes eventos, certamente incitados pela concentração de produtos do
10 metabolismo, que levam ao estresse oxidativo, influenciam a qualidade espermática,
11 transporte e sobrevivência dos espermatozoides no trato genital da fêmea. E devido à
12 presença de substâncias antioxidantes em partes da planta, o Noni tem sido estudado como
13 um provável ingrediente capaz de equilibrar ou reduzir a produção de ERO intensificados
14 durante o processo de manuseio na congelação. (SALAMON, 2000; AISEN 2005
15 TOMBOLATO, 2005).

16

17 **2.2 Meio diluidor**

18 Os meios diluidores são constituídos de substâncias que permitem a preservação
19 da membrana plasmática mediante a estabilização do pH no meio, neutralização e produtos
20 tóxicos produzidos pelos espermatozoides e proteção contra-choque térmico. Além disso,
21 possibilitam o equilíbrio osmótico e eletrolítico, fornecimento e energia e inibição do
22 crescimento bacteriano, preservando a motilidade e a integridade da membrana dos
23 espermatozoides, neutralizando produtos tóxicos produzidos atuando como fonte de
24 energia e inibindo o crescimento bacteriano (AMANN e PICKETT, 1987;

25 De maneira geral, nestes meios devem estar presentes uma fonte de energia como
26 carboidratos, tampões para manter a estabilidade do pH e da pressão osmótica,
27 crioprotetores não penetrantes, responsáveis pela nutrição e à medida que os
28 espermatozoides são refrigerados a 5°C, protege-los do choque frio e dos efeitos deletérios
29 da congelação (SILVA, 2010).

30 Diluentes para congelação geralmente possuem um crioprotetor não permeável
31 (gema de ovo ou leite), um crioprotetor penetrante (glicerol), um tampão (Tris), um ou
32 mais açúcares (glucose, lactose, rafinose, sacarose ou trealose), sais (citrato de sódio, ácido
33 cítrico) e antibióticos (penicilina e estreptomicina) (EVANS e MAXWELL, 1987), com
34 valor de pH entre 6,75 e 7 (BARBAS e MASCARENHAS, 2009).

1 Baseando-se na composição e na dinâmica das membranas espermáticas, existem
2 propostas para a adição de diversas substâncias aos meios diluidores, na tentativa de
3 minimizar os danos impostos pela criopreservação aos espermatozoides e põem ser
4 classificados de acordo com a sua permeabilidade à membrana celular: não penetrantes –
5 macromoléculas, como as proteínas presentes no leite e na gema do ovo, e sacarose, lactose,
6 manose, rafinose, trealose, entre outros; e penetrantes – pequenas moléculas que podem
7 transpor as membranas dos espermatozoides, agindo no meio intra e extracelular- glicerol,
8 etilenoglicol, imetilsulfóxido (DMSO)., propanodiol, acetamidas e outras amidas
9 (COTTORELLO e HENRY, 2002; FURST, 2006 BICUDO et al., 2007).

10 Atualmente os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen dos ovinos
11 são macromoléculas como o glicerol, a caseína do leite, as proteínas da gema do ovo, nas
12 quais protegem do choque térmico causado pelo frio, permitem que a motilidade pós-
13 descogelamento permaneça alta e diminuam as trocas metabólicas que desestabiliza a
14 motilidade (MOUSSA et al., 2002; ABOAGLA e TERADA, 2004; AHMAD et al;
15 CASTELO et al., 2008; VALENTE et al., 2010).

16 Ainda não está elucidada, porém acredita-se que as lipoproteínas de baixa
17 densidade (LDL) das macromoléculas presentes na gema de ovo e no leite, protegem o
18 espermatozoide dos danos causados pela alteração na temperatura, justamente pela
19 formação de um filme protetor sobre a membrana do espermatozoide, protegendo-os dos
20 cristais de gelo formados durante a criopreservação (MOUSSA et al. 2002).

21 Com a descoberta da ação protetora do glicerol, este permaneceu como o
22 crioprotetor de eleição para os espermatozoides na maioria das espécies, caracterizado por
23 ajudar a estabilizar a membrana plasmática diminuindo a concentração de sais no interior
24 o espermatozoide, que em alta concentração é nociva à membrana e pode ocasionar
25 mudanças na estrutura e permeabilidade da membrana celular (MORAES et al., 1998
26 HOLT, 2000; CURRY, 2000).

27 O componente básico dos diluentes de sêmen dos pequenos ruminantes utilizados
28 na rotina é o Tris (Tris – hidroximetil - aminometano), substância com ação tamponante
29 iônico em pH de 7 a 9. Os carboidratos que são adicionados ao diluente, interagem com os
30 fosfolipídeos da membrana alterando a pressão osmótica, induzindo a desidratação celular
31 e ocasionando baixa formação dos cristais e gelo. Outro componente importante são os
32 açúcares, fornecedores de nutrientes para o metabolismo das células espermáticas.
33 Basicamente, é mais eficaz quando os monossacarídeos, como a glicose, frutose e manose,

1 são combinados ao Tris por fornecer um efeito crioprotetor maior (AISEN et al., 2000;
2 HAFEZ, 2004; BARBAS e MASCARENHAS, 2007).

3 A diluição do sêmen, constantemente empregada no manuseio das células
4 espermáticas em procedimentos biotecnológicos da reprodução animal, resultam no
5 desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, e, conseqüentemente, no comportamento
6 quando a célula se encontra no seu limite (BILODEAU et al., 2000). Visando melhorar o
7 equilíbrio, vem-se estudando o efeito da adição de antioxidantes aos diluidores de
8 preparação, manutenção e criopreservação espermática (MORTIMER, 2004), e até mesmo
9 com produtos naturais facilmente encontrados, que podem se aderidos às técnicas
10 reprodutivas.

11 Os diluentes permitem o aumento do volume total do ejaculado, facilitam sua
12 divisão em doses inseminantes proporcionando um ambiente favorável para a
13 sobrevivência dos espermatozoides, que de forma fisiológica juntamente com o plasma
14 seminal apresentam um sistema de defesa antioxidante que desempenha papel importante na
15 viabilidade espermática, tais como o ácido ascórbico, o tocoferol, a taurina, a hipotaurina e
16 o ácido úrico, que ocasiona uma proteção antioxidante ao espermatozoide (VAN
17 OVERVELD et al., 2000; CÂMARA e GUERRA, 2011), visando a melhora na prática
18 quando utiliza-se sêmen, analisando sua qualidade na questão de resistência em todas as
19 fases e procedimento em que esse estará incluso.

20 Então, alguns autores recomendam suplementar os meios de diluição com
21 substâncias antioxidantes, como algumas enzimas, proteínas, minerais ou vitaminas
22 (BICUDO et al.,2007; MAIA et. al.,2009; TONIOLLI, 2012), permitindo prover energia e
23 conseqüentemente um abastecimento de nutrientes essenciais que poderão favorecer uma
24 melhor manifestação das características fisiológicas (FURST, 2006).

25 Assim, faz-se necessária a identificação de componentes com ação antioxidante
26 que possam ser incluídos no meio diluidor de sêmen para equilibrar a ação dos agentes
27 oxidantes produzidos durante os procedimentos que envolvam a fertilização ou uso
28 mecânico do ejaculado.

29 **2.3 Estresse Oxidativo (EO)**

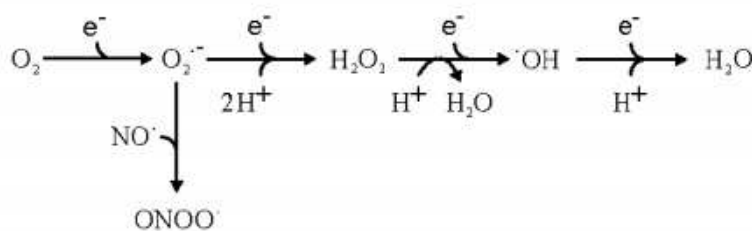
30 Para abordar sobre estresse oxidativo (EO), é necessário entender o significado de
31 radical livre: uma molécula, ou átomo com elétron(s) desapareados com afinidade de
32 ligação. O EO é o fruto em decorrência do desequilíbrio entre a concentração de
33 antioxidantes e a de radicais livres. Esse desequilíbrio pode ser causado por muitos fatores
34 relativos ao aumento da sua produção e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes.

1 Entre eles, podemos citar a nutrição inadequada e animais que são submetidos a condições
2 de estresse. (NICHI, 2003).

3 As espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERO) mais importantes são: o
4 ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($OH\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o
5 óxido nítrico (NO) nas quais são utilizadas como meio identificador dos intermediários
6 químicos reativos provenientes do metabolismo do oxigênio (AGARWAL, IKEMOTO e
7 LOUGHLIN, 1994. BICUDO e MAIA, 2009).

8 O peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido são as ERO formadas
9 primariamente, sendo o H_2O_2 gerado através da dismutase (enzimática ou não enzimática)
10 do ânion superóxido (NICHI, 2003).

11 Porém a mais facilmente reativa e que traz malefícios é o radical hidroxila, que
12 pode ser produzida através do peróxido de hidrogênio e do ânion superóxido com o óxido
13 nítrico, formando o peroxinitrito ($OONO\cdot$), que então irá se dividir para NO_2 e $OH\cdot$ (Figura
14 1) (BARROS, 2008).



15

16 Figura 1 – Cadeia de Formação das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

17

18 Embora, quando as ERO apresentam-se em abundância do que os antioxidantes e
19 num determinado instante ocasionar EO, estas moléculas instáveis, em determinada
20 concentração, participam também de processos fisiológicos tais como: hiperativação,
21 capacitação e ligação do espermatozoide à zona pelúcida (NICHI, 2003).

22 Pesquisas demonstram que as células e os leucócitos presentes no sêmen são
23 capazes de formar ERO e que os prejuízos causados são determinados por uma alta
24 quantidade de ácidos graxos poli-insaturados oxidáveis. Nos quais torna os
25 espermatozoides mais sensíveis à ação dos agentes oxidantes quando há uma elevada
26 porcentagem dos radicais livres, e, desse modo, torna-os também suscetíveis à peroxidação
27 lipídica. (BILODEU et al., 2002).

28 Isso se deve ao fato dos colesteróis poli-insaturados serem moléculas com mais
29 de uma ligação entre átomo de hidrogênio e carbono e do ponto de vista eletroquímico,

1 ligações múltiplas possuem menor força de ligação individual e ficam com moléculas mais
2 instáveis por estarem sujeitas às perdas de átomos (e elétrons). Então, ácidos graxos
3 insaturados, conseqüentemente estão mais sujeitos à ação das ERO as quais promovem a
4 peroxidação lipídica (NICHII, 20003).

5 Quando as espécies reativas de oxigênio atacam as duplas ligações associadas aos
6 ácidos graxos insaturados, uma reação em cadeia de peroxidação lipídica é iniciada, a qual,
7 não sendo paralisada, leva a uma perda da permeabilidade da membrana e
8 conseqüentemente da função espermática (AITKEN e KRAUSZ, 2001). Ainda há
9 possibilidade de mudanças na fluidez e na permeabilidade seletiva das membranas
10 ocasionadas pela alteração dos lipídios presentes, liberando ainda maior quantidade de
11 ERO para o sistema no qual elas estão dispostas, já que as células podem ser submetidas a
12 um estado de necrose ou degeneração, ação que pode determinar danos mais extensos e
13 conseqüências de reparação difícil por ocorrer em formato cascata; um pequeno evento
14 desencadeia uma série de outros, de proporção crescente. Esta cascata pode determinar o
15 EO (PEREZ, 2009).

16 Há muito tempo, a perda de motilidade espermática estava relacionada a efeitos
17 do estresse oxidativo. Pois sua interferência no estresse oxidativo do sistema reprodutor
18 masculino é permitida graças à presença de antioxidantes nas secreções produzidas na
19 cabeça e cauda do epidídimo, como as enzimas secretadas no espaço extracelular
20 (glutathiona peroxidase – GPx e a desmutase superóxida extracelular - SOD),
21 respectivamente (VERNET et al., 1996, 1997). Porém Jones et al. (1976) demonstraram
22 que os mecanismos responsáveis por esse acontecimento em mamíferos, infere em danos
23 peroxidativos à membrana plasmática do espermatozoide, composta por ácidos graxos
24 poli-insaturados, compostos fundamentais para dar à membrana celular a permeabilidade
25 correta para colaborar com a fecundação.

26 Sabe-se que há a indução para formação de ERO na criopreservação, nas quais
27 diminuem o desempenho espermático (WATSON, 2000). O principal fator de redução da
28 motilidade espermática e fertilidade do sêmen criopreservado está sobre efeito da oxidação
29 sobre o DNA mitocondrial e sobre a arquitetura da membrana espermática pois a
30 mitocôndria é o principal local de produção das ERO e grande parte da energia produzida
31 no organismo é gerada por meio de fosforilação oxidativa. Como destino final uma
32 molécula de oxigênio é produzida. Normalmente o oxigênio converte-se em água e a
33 energia é estocada e usada para a produção de ATP, porém, uma pequena porcentagem do
34 oxigênio consumido pela mitocôndria durante esse processo se converte numa das várias

1 ERO, em vez de água. (CUMMINS et al., 1994; BARJA, 2007; DOWNLING e
2 SIMMONS, 2009).

3 Na descongelação, ocorre um aumento na elaboração de ERO (CHATTERJEE et
4 al., 2001) devido a um acréscimo na síntese de superóxido, o qual está relacionado a uma
5 queda nos níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD) e a uma redução da
6 concentração de glutathione, desencadeia a peroxidação lipídica e conseqüentemente
7 desencadeia a perda da função espermática (VALENÇA e GUERRA, 2007).

8

9 **2.4 Antioxidantes**

10 A longo do tempo, vem se desenvolvendo métodos alternativos para aperfeiçoar
11 a qualidade espermática após a criopreservação do sêmen de ovinos, no campo da
12 biotecnologia reprodutiva animal. Nestas circunstâncias, estudos utilizando antioxidantes,
13 substâncias responsáveis por regenerar a base essencial do meio ou evitar a oxidação do
14 meio, que são inseridos aos diluidores e empregam uma importância em estudos para
15 evidenciar qual o melhor composto dentre eles e qual a melhor dose a ser adicionada ao
16 sêmen no controle do estresse oxidativo. E conta-se, com um sistema antioxidante que
17 quando adicionados ao diluidor seminal ovino mostraram-se eficientes na sobrevivência e
18 integridade do acrossoma dos espermatozoides desta espécie, além de incrementar na
19 qualidade espermática pós-descongelação, como por exemplo: a catalase, a glutathione
20 peroxidase, o superóxido dismutase e a cisteína, denominados de antioxidantes
21 enzimáticos; a vitamina E (Tocoferol), vitamina C e resveratrol, caracterizadas como não
22 enzimáticas. (AGARWAL et al., 2005; HALLIWELL e CHIRICO, 1993; HALLIWELL,
23 1996; MAXWELL e STOJANOV, 1996; SILVA et al., 2012 e 2013).

24 As células espermáticas são variáveis quanto ao seu metabolismo na utilização do
25 oxigênio, sendo assim, podem sobreviver em ambientes com a presença de oxigênio ou
26 não (CUMMINS et al., 1994).

27 As ERO, quando se encontram em quantidades relativamente fisiológicas, tem
28 como principais funções, sinalizador de importantes fases da fertilização, como a reação
29 acrossômica, capacitação espermática, e fusão com o oócito (DE LAMIRANDE et al.,
30 1997; DESAI et al., 2009). Porém, devido ao processo de manipulação seminal, como por
31 exemplo, a criopreservação, o sistema de defesa antioxidante inerente do espermatozoide
32 tenta metabolizar essas substâncias, tornando-o mais sensível ao estresse oxidativo
33 implicando num excesso de produção dos radicais livres (MAIA e BICUDO, 2009). Que
34 de modo indireto, apresentará prejuízos ao metabolismo celular espermático, diminuindo

1 seus caracteres espermáticos, como motilidade e vigor (AITKEN et al., 2001). Logo, para
2 se manter sua capacidade do espermatozoide ativa, o ideal seria um equilíbrio entre a
3 quantidade de ERO produzida e a removida pelo sistema antioxidante, substâncias
4 presentes no sêmen que atuam contra o resultado prejudicial das ERO, podem ser
5 moléculas compostas por substâncias com enzimas ou não, atuando na remoção das ERO
6 impedindo a formação das lesões e reparando as injúrias causadas, e quando esta correlação
7 não está estável, a situação é denominada de estresse oxidativo (SIKKA, 1996; FERREIRA
8 e MATSUBARA, 1997, HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, FOOTE et al., 2002). E a
9 capacidade deste é de ocasionar rupturas às membranas espermáticas, quando fora
10 primeiramente relatada em 1943 por MacLeod, através da análise do conteúdo reduzido do
11 citoplasma destas células, definindo uma porção disponível de substância de qualidade
12 antioxidante e reconhecendo o impacto negativo de altas concentrações de oxigênio na
13 motilidade espermática (AITKEN et al., 1998; VERNET et al., 2004).

14 Além disso, nas membranas dos espermatozoides ovino, há grande quantidade de
15 ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), responsável pela fluidez e fusão de membranas
16 no processo da fecundação (LENZI et al., 2000; AGARWAL et al., 2003), torna esses
17 gametas mais vulneráveis, devido a sua característica insaturada, criando uma tendência do
18 espermatozoide à ação de radicais livres e à peroxidação lipídica na membrana plasmática.
19 E também, potencializa o estresse oxidativo, contribuindo na antecipação da capacitação e
20 reação acrossomal, após o processo de manipulação do sêmen após coleta (ZINI et al.,
21 2009; CURRY, 2000; BRENER et al., 2003).

22 Peixoto et al (2008), avaliando o efeito do tempo de incubação pós-
23 descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos em diluente Tris-Gema
24 suplementado com vitamina C e Trolox, constataram que a vitamina determinou menor
25 percentual de espermatozoides com estresse oxidativo.

26 Maia et al (2009) verificaram que o uso de antioxidantes é eficaz para remover o
27 excesso de ERO e manter o equilíbrio do sistema. Ao adicionar antioxidantes Trolox-C ou
28 catalase ao diluidor, os autores constataram que houve efeito benéfico sobre a integridade
29 das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides ovinos, em relação ao
30 controle (TRIS), assim como o potencial de espermatozoides viáveis com acrossomo
31 intacto também foi maior.

32 Desta forma, a adição de antioxidantes ao diluente visa aumentar a viabilidade
33 espermática, reduzindo o grau e danos celulares, melhoria da motilidade espermática e

1 integridade acrossomal (SARLOS et al., 2002). No entanto, a concentração ideal de
2 antioxidantes ainda precisa ser determinada. (MAIA et al.,2009).

3

4 **2.4.1 Noni (*Morinda citrifolia*)**

5 O uso empírico de medicamentos derivados de plantas tem sido disseminada
6 desde os tempos antigos para tratar uma ampla gama de doenças. Nas últimas décadas, o
7 interesse pelas terapias alternativas marcadamente em forma mundial. A ocorrência de
8 efeitos colaterais em medicações derivadas de plantas, quando usadas de forma apropriada,
9 são relativamente menos frequentes quando comparados com drogas sintéticas. Contudo,
10 dados experimentais demonstraram que não estão ausentes reações adversas mesmo nestes
11 casos, o que torna seu estudo em várias áreas necessário para avaliar sua segurança
12 (CALIXTO, 2000).

13 As distintas partes do Noni apresentam teores variáveis dos compostos bioativos
14 (vitamina C e carotenoides totais), principalmente em comparação com outras frutas que
15 já foram estudadas e que possuem altas quantidades de antioxidantes, como o Açaí, Bacuri
16 e entre outras (CANUTO et al., 2010), que possuem, dentre as frutas, as que mais
17 constituem antioxidantes. E estes, que mesmo presentes no sêmen, tornam-se reduzidos
18 com a adição do diluidor, diminuindo consideravelmente o efeito benéfico do antioxidante
19 natural. Assim, a adição de antioxidantes, ainda que em pequenas concentrações, pode
20 melhorar a função espermática no sêmen manipulado.

21 E ainda existem relatos, quando na prática ou método de adicionar antioxidantes
22 ao diluidor, melhora-se as características dos espermatozoides, como motilidade e a
23 viabilidade, nas espécies: bovina, ovina, equina, e também em relação à capacidade
24 fertilizante (*in vitro*) das células espermáticas do ovino (KRZYZOSIAK et al., 2000;
25 BILODEAU et al., 2002; BAUMBER et al., 2002; UPRETI et al., 1998; MAXWELL e
26 STOJANOV, 1996).

27 Devido à presença de determinados compostos com função antioxidante em várias
28 partes da planta, o Noni (*Morinda citrifolia* Linn) tem sido estudado como um provável
29 ingrediente capaz de equilibrar ou reduzir a produção de ERO intensificados durante o
30 processo de manipulação, congelação/descongelação. Com destaque para o fruto que
31 contém os componentes proxeronina, precursora do alcalóide xeronina que ativa as
32 enzimas catalisadoras do metabolismo celular, altos teores de vitamina C e carotenoides
33 (SANTOS, et al 2015.)

1 Dessa forma, o Noni é considerado um antioxidante natural apresentando muitos
2 percursores que ativam as proteínas catalisadoras do metabolismo celular (TOMBOLATO
3 et al., 2005), além de ser considerada fonte de vitamina C e compostos fenólicos,
4 responsáveis pela atividade antioxidante, esperando-se que com a inclusão do Noni no
5 meio diluidor promova uma diminuição nos danos celulares (CORREIA, 2010).

6 O emprego tradicional do Noni, usado há mais de 2.000 anos pelos polinésios,
7 está atribuído aos efeitos relacionados com atividade antibacteriana, antioxidante, antiviral,
8 antifúngica, antitumoral, anti-helmíntica, analgésica, anti-inflamatória, hipotensora e
9 imunoestimulante (WANG et al., 2002). O Noni foi testado em vários bioensaios, *in*
10 *vitro* e *in vivo* , para indicar a ausência e/ ou avaliar o seu potencial genotóxico, incluindo
11 mutação genética (HPRT), síntese de ADN não programada (UDS), ensaio de Comet, teste
12 de Ames (WESTENDORF et al. 2007), micronúcleo no rato, aberração cromossômica em
13 linfócitos humanos (EDWARDS 2002, 2003). E Diante da relevância que tem alcançado
14 os estudos sobre as propriedades medicinais da *Morinda citrifolia* Linn, são de
15 fundamental importância pesquisas que avaliem os reais benefícios que este fruto pode
16 trazer à pesquisa.

17 Atualmente, o uso de *Morinda citrifolia* tornou-se generalizado, e seus produtos
18 estão comercialmente disponíveis em lojas de alimentos saudáveis, mercearias de cadeia
19 especializadas em alimentos naturais e na internet. As folhas e as frutas são processadas e
20 vendidas como cápsulas, chá, e formas do suco, embora o suco de fruta seja a formulação
21 predominante (CHAN-BLANCO et al., 2006 , YU et al., 2008).

22 Estudos em todo o mundo têm caracterizado os vários produtos naturais com o
23 intuito de identificar e quantificar os componentes bioativos destes vegetais a fim de
24 utilizá-los na alimentação da população e, com isso, reduzir o risco de surgimento de
25 doenças (NEVES, 2012). Nesse contexto, as frutas exóticas, como o Noni, têm ganhado
26 cada vez mais espaço, tanto pela busca de benefícios que estas possam oferecer, como pela
27 procura por diferentes tipos de fontes alimentares.

28 29 **3. METODOLOGIA**

30 **3.1 ANIMAIS E LOCAL DE ESTUDO**

31 Foi coletado sêmen de nove ovinos provenientes da Baixada Maranhense, sem raça
32 definida, com média de 3 anos. Estes pertencem ao núcleo de pesquisa de grandes Animais,
33 da Universidade Estadual do Maranhão, localizada no Polo VI, Campus São Luís, a 02°
34 31' 48" Latitude Sul e 44° 18' 10" Longitude Oeste.

1 Foi realizado o exame dos órgãos genitais externos, com inspeção e a palpação,
2 sendo avaliados escroto e testículos (circunferência escrotal, largura e comprimento). Para
3 a colheita de sêmen, utilizou-se Eletroejaculador (Boijector[®]) de acordo com as normas
4 preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução, para a espécie ovina (CBRA, 2013).
5 O sêmen foi colocado em tubos Falcon (15 ml) e em seguida, transportado para o
6 laboratório em estrutura isolante térmica com água destilada à temperatura 37°C.

8 3.2 PREPARO DO EXTRATO

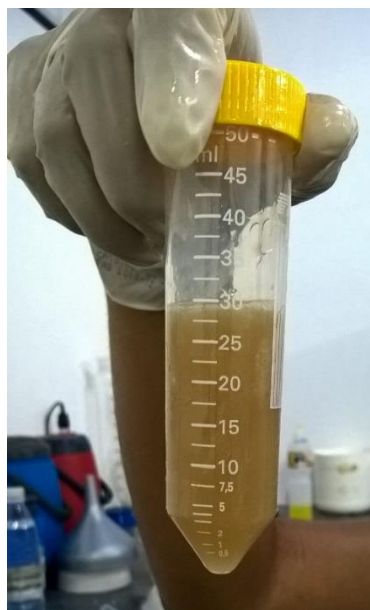
9 Para a obtenção do extrato do Noni (*Morinda citrifolia*) a ser adicionado ao meio
10 diluidor do sêmen ovino, foi seguida a metodologia adaptada a partir da proposta de
11 KUTVOELGYI (2008). O Noni foi colhido e lavado cuidadosamente com água destilada
12 antes da separação das partes, posteriormente descascado, despolpado e retirado as
13 sementes (Figura 1). Em seguida passado por uma peneira de 400 micras e centrifugado a
14 600G durante 6 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante, filtrando-o em
15 copo coletor com filtro de 75 micra, segundo Nascimento (2014).



17
18 Figura 1 – Fruto maduro Noni sendo descascado, despolpado e retirado as sementes.

1 3.3 DILUIÇÃO

2 Após a colheita o sêmen foi diluído (25×10^6 spz/mL) para suplementação do
3 extrato de Noni (Figura 2). O diluidor foi elaborado a base de Tris-Gema (composto por
4 Tris, Ácido Cítrico, Frutose, Penicilina G, Estreptomicina e Água Destilada). Cada
5 ejaculado dividido em quatro frações iguais, correspondente aos tratamentos: Grupo
6 controle (G_{cont}) somente diluidor Tris-Gema; Grupo 1 (G_1) diluidor acrescido de $2,0 \mu\text{g/mL}$
7 do extrato; Grupo 2 (G_2) diluidor acrescido de $3,5 \mu\text{g/mL}$ do extrato; Grupo 3 (G_3) diluidor
8 acrescido de $5,0 \mu\text{g/mL}$ do extrato, seguindo a metodologia de Nascimento (2014).



21 **Figura 2 – Extrato do Noni.**

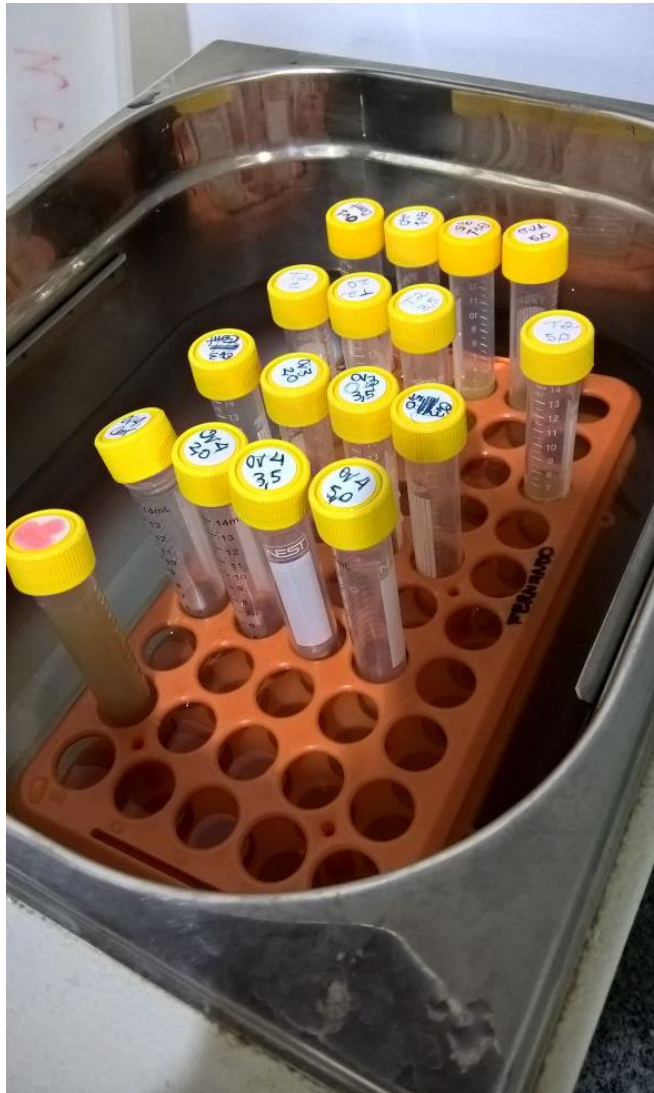
22 23 3.4 AVALIAÇÕES DO SÊMEN

24 Após a diluição, o sêmen foi avaliado nos intervalos de tempo quanto a questões
25 convencionais, como motilidade espermática progressiva e vigor pelo teste de termo
26 resistência rápido, integridade de membranas e morfologia espermática.

27

28 3.4.1 TESTE DE TERMO RESISTÊNCIA LENTO MODIFICADO

1 O TTR foi realizado em banho-maria, primeiramente a 37 °C para avaliação da
2 motilidade inicial, logo depois, o sêmen fora mantido em banho-maria, a temperatura de
3 45 °C, sendo avaliada a motilidade progressiva dentro dos tempos 0, 20, 40, 60 minutos
4 (Figura 3), com objetivo de determinar a resistência dos espermatozoides às condições
5 impostas, segundo proposto por Arruda (2000).



6
7 Figura 3 – Grupos controle e grupos com o extrato submetidos ao teste de termo
8 resistência.

10 **Motilidade espermática progressiva e vigor**

11 Para motilidade e vigor espermático, depositou-se 5 μ L de sêmen em lâmina pré-
12 aquecida, sob microscopia de contraste de fase, sendo avaliada por único operador numa
13 única escala entre 0 a 100%, de acordo com a proporção de espermatozoides móveis nos
14 campos observados em microscópio convencional sob aumento de 100 vezes, considerando

1 0% para nenhuma célula espermática móvel no campo e 100% para todas as células
2 espermáticas móveis.

3 O vigor foi analisado quanto ao movimento progressivo retilíneo os
4 espermatozoides numa escala de 0 a 5, na qual 0 representa ausência de movimento e 5,
5 movimentos progressivos intensos.

6

7 **Integridade das membranas**

8 Para a avaliação da integridade das membranas plasmáticas, utilizou-se a coloração
9 de Eosina-Nigrosina segundo Barth e Oko (1989). Dessa forma, quando há alteração na
10 permeabilidade das membranas das células espermáticas corando-as de rosa. A entrada do
11 corante é barrada nos espermatozoides com membrana íntegra, contrastando com o plano
12 de fundo de coloração escura da Nigrosina, apresentam-se brancas. Desta maneira, a
13 coloração, foi depositada sobre sêmen aliquotado (10 µL) e homogeneizado para posterior
14 preparo do esfregaço sobre lâmina e lamínula e 10 µL do corante realizando-se durante os
15 tempos 0, 20, 40, 60 minutos. Após 10 minutos de secagem da lâmina, foi realizada a leitura
16 em microscópio com aumento de 100 vezes sob óleo de imersão.

17 Foram contadas 100 espermatozóides por lâmina e em seguida classificado com
18 membrana íntegra (brancos ou não corados) e não íntegra (rosas ou coradas).



19

20

Figura 4: Teste de eosina-nigrosina

21

22 **Morfologia espermática**

23 A morfologia espermática foi realizada em microscopia de contraste de fase, sob
24 lâmina e lamínula em aumento de 1000x, contadas 100 células com resultados expressos
25 em porcentagem, classificados em defeitos maiores e menores, segundo o CBRA (HENRY
26 e NEVES, 2000), sendo esta realizada obedecendo o mesmo período do teste de termo
27 resistência modificado.

1 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

2 Os dados foram agrupados e tabulados, com posterior apresentação em forma de
3 tabela e figuras.

4 Foi aplicado os desvios padrões e suas médias para descrição dos resultados
5 (média \pm erro padrão da média) dos dados originais – sêmen fresco;

6 As avaliações de motilidade espermática e vigor espermático no momento da
7 coleta foram apresentadas de forma descritiva, utilizando à média e o desvio padrão de
8 cada resposta. As variáveis paramétricas testadas por ANOVA, comparando-se as médias
9 pelo teste de Friedmann, tratadas como não paramétricas.

10 Quanto aos valores da integridade da membrana espermática, todas as variáveis
11 passaram pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors. As variáveis que tinham
12 respostas subjetivas ou não entraram na normalidade após transformação foram analisadas
13 como não paramétricas, comparando-se os ranqueamentos pelo teste de Friedamn.

14

15 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

16 A média para motilidade espermática dos animais anterior aos testes foi de 80,56
17 \pm 10,13 e vigor espermático de 3 ± 0 . Os valores escritos referentes às características
18 seminais obtidas neste experimento, estão de acordo com os valores preconizados pelo
19 CBRA (2013).

20 Quanto a motilidade espermática ao vigor espermático, não houve diferença
21 estatística ($P \geq 0,05$) comparando os resultados entre os tempos estudados na incubação –
22 (Tabela 1).

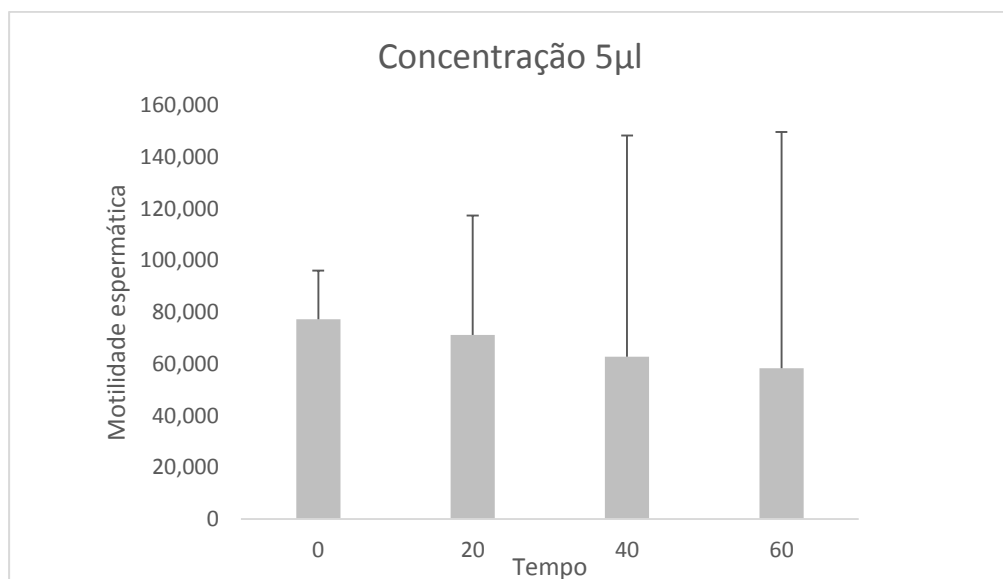
23 **Tabela 1 – Valores Médios e seus respectivos desvios padrões (DP) em porcentagem**
24 **da Motilidade Espermática Progressiva (MP) e Vigor Espermático.**

[Noni] (μ L)	Sêmen Fresco	Controle	2	3,5	5
	80,56				
% VE 0'		72,22 \pm 11,75	76,66 \pm 9,01	77,22 \pm 5,65	77,22 \pm 5,65
% VE 20'		72,23 \pm 12,01	75,56 \pm 6,82	77,23 \pm 6,18	71,12 \pm 13,86
% VE 40'		66,67 \pm 11,18	60 \pm 16,58	63,89 \pm 18,67	62,78 \pm 25,63
% VE 60'		52,23 \pm 24,38	55,56 \pm 17,40	59,45 \pm 17,03	58,34 \pm 27,38
VE	Sêmen Fresco	Controle	2	3,5	5
	3				
% VE 0'		3 \pm 0	3 \pm 0	3 \pm 0	3 \pm 0
% VE 20'		3 \pm 0	3 \pm 0	3 \pm 0	3 \pm 0
% VE 40'		3 \pm 0	3 \pm 0	3 \pm 0	2,67 \pm 1
% VE 60'		2,67 \pm 1	2,78 \pm 0,44	2,67 \pm 0,5	2,56 \pm 1,01

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Os resultados de motilidade realizadas com o sêmen descongelado com suplementação do extrato do Noni, foram semelhantes aos encontrados por outros autores que adicionaram substâncias definidas como antioxidantes, como Maia (2009) não observou diferenças significativas quando adicionou 6,25mg/ml (0,0935 U/mL) de catalase ao meio diluidor, e Silva (2013) que inseriu 0,5 mg/mL de ácido ascórbico ao diluidor. E consideraram quanto aos diluidores adicionados de catalase preservou a membrana plasmática e acrossomal e quanto a concentração de ácido ascórbico pode-se inferir que melhorou o desempenho da IA e as características *in vitro* do sêmen criopreservado. Apesar da não resposta em relação a suplementação do Noni entre os grupos, verificou-se que ele não foi deletério a motilidade espermática, pois ao final do TTR a motilidade espermática manteve dentro do esperado para sêmen fresco após o insulto, como preconizado para a espécie ovina, segundo o CBRA (2013).

Porém, com relação a variável tratamento, as amostras tratadas com concentração 5µl mostrou-se superior as demais, justamente por ser a única que manteve a motilidade até o final sem ter diferença entre o momento zero e último (Gráfico 1). Em relação aos tempos estudados (0, 20, 40 e 60 minutos), os dados estatísticos demonstraram nenhuma alteração ao proceder o teste de termo resistência.



21
22
23
24

Gráfico 1 – Valores de Média e erro padrão da Motilidade Progressiva Espermática na concentração 5µl nos tempos estudados. Teste de Friedman.

1

2

3

4

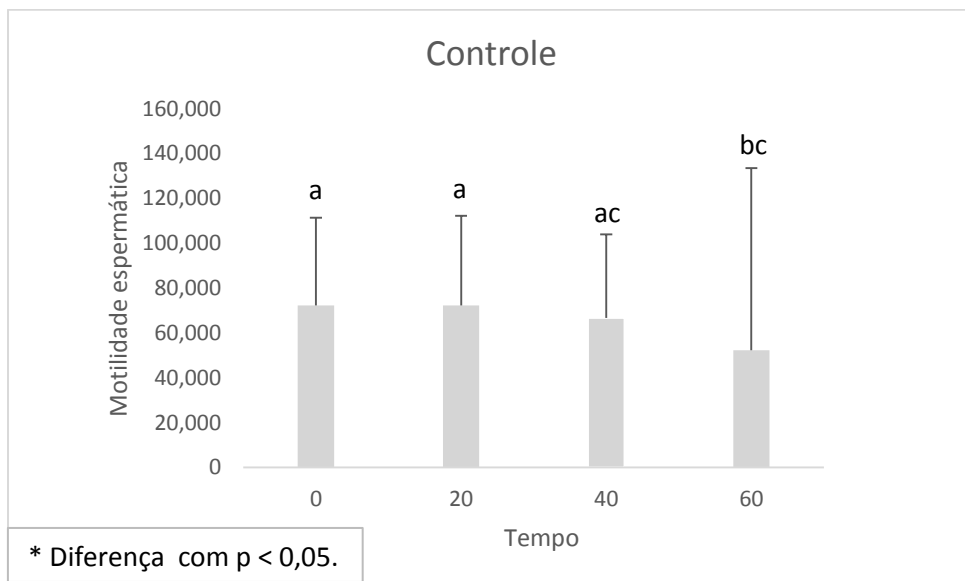
5

6

7

8

Dentro do tratamento controle, após 60 minutos observou-se uma diminuição da motilidade espermática ($P \leq 0,05$), como demonstrado no gráfico 2. Enquanto que no grupo com suplementação de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ verificou-se também uma diminuição do percentual de células móveis, demonstrando diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação a todos os tempos (Gráfico 3). Quanto ao grupo com concentração de 3,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, observou-se que só houve diferença ($P \leq 0,05$) na motilidade espermática entre os tempos de 20 minutos e 60 minutos, gráfico 4.



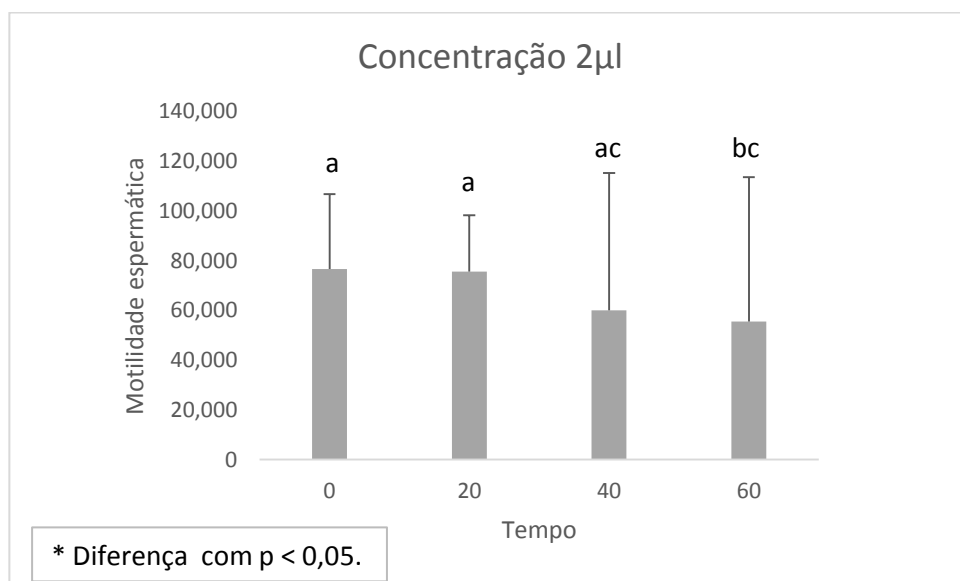
9

10

11

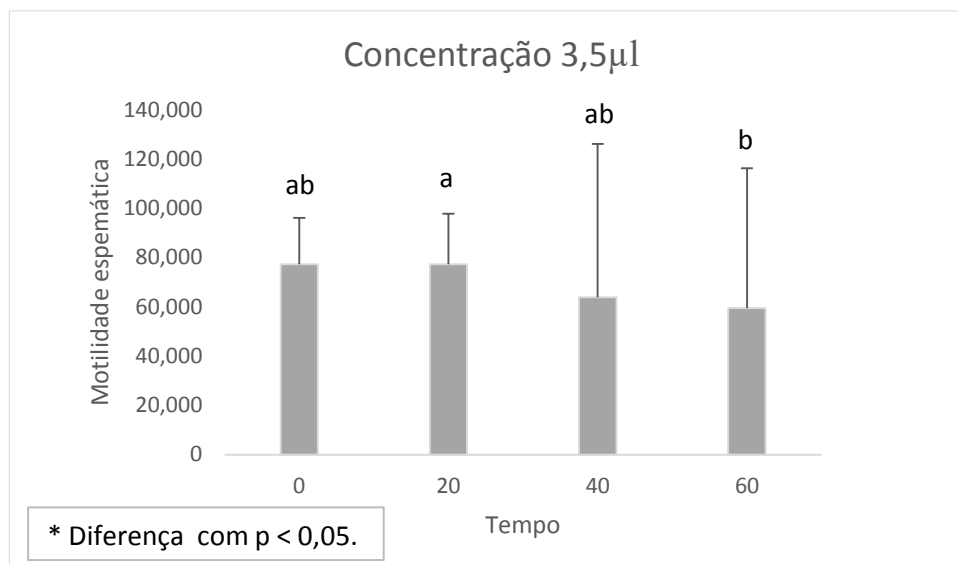
12

Gráfico 2 – Valores de Média e erro padrão da Motilidade Progressiva Espermática na concentração controle nos tempos estudados. Teste de Friedman



13

1 Gráfico 3 – Valores de Média e erro padrão da Motilidade Progressiva
2 Espermática na concentração 2 μ l nos tempos estudados. Teste de Friedman
3
4



5 Gráfico 4 – Valores de Média e Erro padrão da Motilidade Progressiva
6 Espermática na concentração 3,5 μ l nos tempos estudados.
7
8

9 De maneira geral foi constatada que o aumento na concentração do extrato aquoso
10 de Noni manteve as velocidades de deslocamento progressivo dos espermatozoides, sendo
11 um ponto positivo para que ocorra o movimento deste direto ao oócito para que a
12 fecundação ocorra, corroborando com o descrito por OBERST et al. (2003) e COX et al.
13 (2006), pois segundo esses autores a variável velocidade progressiva está diretamente
14 relacionada à habilidade do espermatozoide em alcançar o local de fecundação, sendo que
15 um dos requisitos mínimos para concretizar este processo, de fundamental importância para
16 o funcionamento das células espermática, é a reação de enrolamento e/ou dobramento da
17 cauda, considerada como uma reação positiva ao teste de característica de integridade
18 funcional da membrana, sendo que observou-se uma manutenção da motilidade
19 progressiva em todos os grupos avaliados com a suplementação de Noni.

20 Na tabela 2 são encontrados os valores médios e seus desvios padrão para a
21 integridade de membranas avaliadas pelo teste de eosina- nigrosina avaliadas durante o
22 TTR em cada período estudado.
23

1 **Tabela 2- Porcentagem de Espermatozóides com a Integridade da Membrana**
 2 **Espermática Íntegra (IM).**

Tempo	Controle	2	3,5	5,0
% IM ± DP 0	66,45 ± 20,50	54,45 ± 22,54	70,11 ± 11,56	67,67 ± 17,82
% IM ± DP 20''	62,12 ± 25,43	59,89 ± 22,89	63,89 ± 15,83	58,23 ± 24,40
% IM ± DP 40''	68,34 ± 19,31	65,23 ± 11,15	75,45 ± 14,38	61,34 ± 28,01
% IM ± DP 60''	66 ± 23,10	67,56 ± 15,44	69,11 ± 17,74	65,78 ± 21,72

3 Em linha, Teste de Lilliefors e Shapiro-Wilk $P \geq 0,05$.

4

5 Observou-se no momento inicial (tempo 0), no teste de integridade de membranas
 6 pelo eosina-nigrosina, encontrou-se os valores médios de 66,45%, 54,45%, 70,11% e
 7 67,67% para os tratamentos G_{cont} , G_1 , G_2 , e G_3 , respectivamente. Não havendo diferença
 8 estatística quanto à integridade de membranas em relação ao tratamento e tão pouco dentro
 9 do tratamento ($P \geq 0,05$).

10 Contudo, numericamente, houve diferença na concentração 3,5 μ l de extrato
 11 aquoso de Noni, apresentando maior percentual de células com integridade de membranas
 12 em relação aos demais grupos. A ausência de efeito significativo pode ter sido influenciada
 13 pelo número reduzido de repetições ($n=9$), ou devido a concentração dos antioxidantes
 14 presentes no extrato em questão, na qual não tenha sido o satisfatório para apresentar seus
 15 efeitos benéficos ou a produção de espécies reativas ao oxigênio não tenha sido alta o
 16 bastante para as células entrarem em estresse oxidativo, envolvendo as estruturas de
 17 membrana com o percurso da lipoperoxidação oxidativa, ocasionando a necessidade de
 18 acrescentar agentes antioxidantes. Entretanto, demonstra que a polpa pode-se apresentar
 19 como protetor de membrana plasmática.

20 A manutenção da integridade das membranas pode ter sido influenciada pelos
 21 compostos fenólicos existentes no extrato ou em outros compostos antioxidantes presentes
 22 com capacidade de reduzir a peroxidação lipídica da membrana como a Vitamina C,
 23 antraquinonas, escopoletina e óxido nítrico e esteróis (WANG, 2002; e CHAN-BLANCO,
 24 2006). Há a possibilidade de as concentrações utilizadas exercerem função pró-oxidante
 25 nos meios ou ocorrer interação entre os antioxidantes e o diluidor, estabelecendo com que
 26 os compostos com ação antioxidante do Noni atuassem como protetores da peroxidação
 27 lipídica quando avaliado isoladamente no meio.

28 Foi relatado que no sêmen fresco humano que os antioxidantes não enzimáticos,
 29 característica semelhante à do Noni e pela presença dos constituintes do diluidor (gema de

1 ovo) utilizados na nossa pesquisa, podem ser responsáveis pela preservação da membrana
2 por retardarem ou até mesmo prevenir a oxidação espermática, através da habilidade de
3 inibir a peroxidação lipídica *in vitro* (AGARWALL et al, 2004), fornecendo maior
4 preservação das propriedades da membrana espermática e acarretando melhores resultados
5 na qualidade do sêmen . Entretanto, diversas pesquisas têm demonstrado respostas
6 contraditórias. AGARWALL et al (2004) realizaram uma ampla revisão da literatura
7 abordando os tratamentos da infertilidade do homem à base de antioxidantes. Variadas
8 pesquisas utilizaram suplementação oral, enquanto outros acrescentaram agentes
9 enzimáticos e não enzimáticos nas preparações espermáticas. Algumas pesquisas
10 descreveram melhoras nos parâmetros espermáticos (motilidade, concentração e
11 morfologia), contudo, os autores evidenciam que muitos fatores tornam estes resultados
12 frágeis, como por exemplo, as variadas patologias dos pacientes (varicocele, azoospermia,
13 astenozoospermia, teratozoospermia), as diferentes concentrações e o tempo de tratamento
14 compreendidos.

15 Em relação ao sequestro dos radicais livres, os extratos são classificados como
16 sendo forte (acima de 70%), moderada (70 – 50%) e fraca (abaixo de 50%) capacidade de
17 sequestro (MELO et al., 2008). Em Nascimento (2015), observou-se que o extrato aquoso
18 do Noni apresentou uma ótima habilidade em dificultar a produção da lipoperoxidação na
19 concentração de 10 µg.mL⁻¹, sendo semelhantes ao controle positivo sintético Trolox, um
20 antioxidante semelhante a Vitamina E. No entanto, o Noni apresentou um comportamento
21 de redução de eficiência em prevenir a lipoperoxidação em concentrações mais elevadas,
22 constatando uma reversão pró-oxidativa, como observou-se no experimento atual.

23 BITTENCOURT et al. (2008) realizaram experimentos com a utilização de um
24 meio à base de lecitina de soja para a congelação do sêmen ovino e bovino, e relataram
25 valor de 27% para motilidade espermática com este diluidor, valor inferior (P<0,05) ao
26 tratado com TRIS gema (47%) no mesmo trabalho e inferior também aos 56% relatados
27 por GIL et al. (2003), e o que correlaciona com o Noni.

28 Quanto a morfologia espermática os resultados para defeitos maiores e menores
29 estão expressos nas tabelas 3 e 4, respectivamente. Os percentuais dos defeitos foram
30 descritos com média e desvio padrão, pois não foi possível analisar todos as partidas
31 quantos aos tempos e animais, devido a grumos formados durante o armazenamento
32 impossibilitando a leitura, assim foram colocados de maneira geral os achados.

33

34 **Tabela 3.** Média e desvio padrão para defeitos maiores avaliados durante o TTR segundo

1 os tratamentos

Defeitos maiores				
Tempo	Controle	2	3,5	5
0	11,11± 13,66	9,66± 12,02	0,88±2,02	9,0±11,21
20	6,44±6,67	3,22±6,51	2,44±5,70	1,44±3,0
40	0,77±1,98	4,77±5,01	3,22±4,38	2,11±4,53
60	3,0 ± 4,92	0,66±1,32	4±5,93	3,22±9,29

2 Em linha; Avaliação descritiva.

3

4 Tabela 4. Média e desvio padrão avaliados durante o TTR segundo os tratamentos

Defeitos menores				
Tempo	Controle	2	3,5	5
0	10,88±10,99	6,33±10,40	4,66±10,29	10,88±10,42
20	10,88±13,70	2,66±6,26	11,77±27,77	4,44±7,10
40	6,22±8,34	19,66±22,65	4,33±5,70	4,66±7,28
60	5,22±10,41	6±10,40	7,33±10,14	7,66±17,80

5 Em linha; Avaliação descritiva.

6

7 Apesar da avaliação descritiva para os defeitos maiores e menores, sabe-se que os
8 antioxidantes suplementados não exercem funções sobre a morfologia espermática, as ROS
9 formadas são responsáveis por alterações metabólicas e na liberação de componentes
10 intracelulares, desencadeando perda acentuada da motilidade espermática, como verificado
11 por Castilho et al. (2009). Apesar do que foi exposto, os defeitos tanto maiores quanto
12 menores estão superiores ao recomendado para espécie ovina CBRA (2013), e esse
13 aumento é devido ao TTR, onde com passar dos minutos vários espermatozoides vão
14 morrendo e estes levam a apoptose dos demais.

15 Diante dos resultados do presente estudo, evidenciam que o efeito protetor exibido
16 pelo extrato aquoso do Noni aos espermatozoides ovinos está relacionado, em parte, pela
17 capacidade antioxidante de seus ativos componentes, demonstrando possuir a habilidade
18 de proteger a membrana do espermatozoide a partir da ação deletéria do ataque oxidativo
19 reduzindo a peroxidação lipídica. Com estes resultados encontrados sugere-se que novas
20 análises sejam realizadas sobre os padrões de funcionalidade da célula espermática como
21 integridade de membrana, mitocôndria e acrossoma, bem como avaliação do poder
22 antibacteriano durante o processo de armazenamento através da realização de culturas
23 bacterianas, escolhendo a melhor concentração aceita.

24

25 6. CONCLUSÕES

1 Conclui-se que a utilização do Noni é uma fonte promissora de antioxidantes, que
2 pode ser utilizada na suplementação durante o processo de diluição e o que o mesmo
3 preserva a motilidade espermática e as membranas espermáticas segundo o presente estudo.

6 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 ABOAGLA, E. M., TERADA T. Effects of egg yolk during the freezing step of
8 cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1160-
9 1172, 2004.

10 AGARWAL, A.; IKEMOTO I, LOUGHILINK. R. Effect of Sperm Washing on Levels
11 of Reactive Oxygen Species in Semen. **Arch Androl**. 1994; 33:157-62.

12 AGARWAL, A.; NALLELLA, K. P.; ALLAMANENI, S. S.; SAID, T. M. Role of
13 antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature.
14 **Reproductive Biomedicine online**, v.8, n.6, p.616-627, 2004.

15 AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species
16 in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility Sterility**, v.79, p.829–843,
17 2003.

18 AISEN E, QUINTANA M, MEDINA V, MORELLO H, VENTURINO A.
19 Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with
20 trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**. 2005; 50(3): 239-249.

21 AISEN E. G.; ALVAREZ, LA H.L.; VENTURINO, A; GARDE, J.J. Effect of
22 trehalose and edta on cryoprotective action of Ram semen diluents. **Theriogenology**,
23 v.53, p.1053-1061, 2000.

24 AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS,
25 Z. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic
26 integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1037-1046, 1998.

1 AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. **Oxidative stress, DNA damage and the Y**
2 **chromosome. *Reproduction***, v. 122, p. 497-506, 2001.

3 ALI AL AHMAD, M. Z. et al. Detection of viral genomes of caprine-encephalitis virus
4 (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. ***Theriogenology***. v. 69, pp.
5 473-480. 2008. Disponível em: << <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082249>
6 >>. Acesso em: 03/12/2016.

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

10 ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o**
11 **espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de**
12 **fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria**
13 **(ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e**
14 **Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.**

15 BALUNAS, M.J., JONES, W.P., CHIN, Y.W., MI, Q., FARNSWORTH, N. R.,
16 SOEJARTO, D.D., CORDELL, G.A., SWANSON, S.M., PEZZUTO, J.M., CHAI,
17 H.B., KINGHORN, A.D. Relationships between inhibitory activity against a cancer
18 cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an
19 anticancer drug discovery project. ***Chemistry & Biodiversity***. v. 3, p. 897-915,2006.

20 BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, E. R. D. Cryopreservation of domestic animal
21 sperm cells. ***Cell Tissue Bank***, v.10, p. 49-62, 2009.

22 BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm
23 cells. ***Cell and Tissue Banking***, 2007 DOI 101007/s10561-008-9081-4.

1 BARJA G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production
2 are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Res**, v.10,
3 p. 215-223, 2007.

4 BARROS, N. N.; VASCONCELOS, V. R.; WANDER, A. E.; ARAÚJO, M R. A.
5 Eficiência bioeconômica e cordeiros F₁ Dorper x Santa Inês para produção de carne.
6 **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 825-831, 2005.

7 BARROS, N. N.; VASCONCELOS, V. R.; WANDER, A. E.; ARAÚJO, M R. A.;
8 MARTINS, E. V. Influência o grupo genético e da alimentação sobre o desempenho os
9 cordeiros em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n. 9, p. 1111-
10 1116, 2003.

11 BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado e**
12 **gado-mato-pequeno (Leopardos tigrinus, SCHREBER, 1775)**, 2008. 130 H. Tese
13 (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e
14 Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.

15 BARTH, A. D.; OKO, R. J.; **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames:
16 Iowa State University Press, 1989. 285 p.

17 BAUMBER J, VO A, SABELUR K, BALL BA. Generation of Reactive Oxygen Species
18 by Equine Neutrophils and Their Effect on Motility of Equine Spermatozoa.
19 **Theriogenology**, v.57, p.1025-1033, 2002.

20 BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, S.M. et al. Avanços na Criopreservação de
21 Sêmen Ovino Visando sua Aplicação em Programas de Inseminação Artificial e em
22 Biotecnologias com Embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v35, n.3, Supl. p. 787-
23 798, 2007.

24 BILODEAU JF, BLANCHETTE S, CORMIER N, SIRAD, M-A. Reactive Oxygen
25 Species-Mediated Loss of Bovine Sperm Motility in Egg Yolk Tris Extender:

1 Protection by Pyruvate, Metal Chelators and Bovine Liver or Oviductal Fluid Catalase.
2 **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.

3 BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of
4 antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and
5 thawing. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

6 BITTENCOURT, R.F.; OBA, E. VASCONCELOS, M.F.; OLIVEIRA, T.M.;
7 BISCARDE; MARTINS, T.; GUSMÃO, A.L.; OLIVEIRA, J.V.L.; BICUDO, S. D.
8 **Avaliação de um meio hiperosmótico a base de trealose, associado ou não ao**
9 **quelante de cálcio edta, para criopreservação do espermatozoide ovino.** In: XXXV
10 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado. Anais. Porto Alegre:
11 SOVERGS, 2008. Disponível em: <
12 <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0532-1.pdf>>. Acesso
13 em 24 de Abril de 2017.

14 BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.;
15 BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm
16 capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v.68, p.837-845,
17 2003.

18 CALIXTO, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory
19 guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of**
20 **Medical and Biological Research** 33, 179–189.

21 CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação de sêmen ovino:
22 danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes
23 sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n.
24 1, p. 33-40, 2011.

1 CANUTO, G. A. B; XAVIER, A. A. O; NEVES, L. C; BENASSI, M. T;
2 Caracterização Físico-Química de Polpas de Frutos da Amazônia e sua Correlação com
3 a Atividade Anti-Radical Livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.
4 32, n.4, dez. 2010.

5 CASTELO TS, FROTA TR, SILVA AR. Considerações sobre a criopreservação do
6 sêmen de caprinos. **Acta Veterinária Brasília**. 2008; 2(3): 67-75.

7 CASTILHO, E.F.; GUIMARAES, J.D.; MARTINS, L.F.; PINHO, R.O.;
8 GUIMARAES, S.E.I.; ESPESCHIT, C.J.B. Uso de própolis e ácido ascórbico na
9 criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.2335-
10 2345, 2009.

11 CHAN-BLANCO Y, VAILLANT F, PEREZ AM, REYNES M, BRILLOUET JM E
12 BRAT P. 2006. **O fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.): Uma revisão da pesquisa**
13 **agrícola, propriedades nutricionais e terapêuticas**. J Food Compos Anal 19: 645-
14 654.

15 CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by
16 spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and**
17 **Development**, v.59, p.452-458, 2001.

18 COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para**
19 **exame andrológico e Avaliação de Sêmen Animal** (2 ed), Belo Horizonte, CBRA,
20 2013. 49p.

21 CORREIA, A. A. da S. **Maceração Enzimática da Polpa de Noni (*Morinda citrifolia***
22 **L.)**. Dissertação. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

23 COTORRELLO, A. C. P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e
24 avaliação do sêmen equino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução**
25 **Animal**, v,26, n. 1, p. 15-25, 2002.

1 COX, J.F. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its
2 relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, .66, p. 860-867,
3 2006.

4 CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KAN, R. Molecular biology of human male
5 infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Molecular**
6 **Reproduction Development**, v.37, p.345-362, 1994.

7 CURRY, M. R. Cryopreservation of sêmen from domestic livestock. **Reviews of**
8 **Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.

9 DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive
10 oxygen species and sperm physiology. **Society for Reproduction and Fertility**, v.2,
11 p.48-54, 1997.

12 DESAI, N.; SHARMA, R.; MAKKER, K.; SABANEGH, E. Physiologic and
13 pathologic levels of reactive oxigen species in neat semen of infertile men.
14 **Fertility and Sterility**, v.92, p.1626-1631, 2009.

15 DOWNLING, D. K., SIMMONS, L. W.; Reactive oxygen species as universal
16 constraints in life-history evolution. **Proc R Soc Lond B**, v.276, p.1737-1745, 2009.

17 EDWARDS, C. N., 2003. **Teste in vitro de aberração cromossômica de mamífero**
18 **realizado com linfócitos humanos**. Relatório de teste. Scantox Biologisk
19 Laboratorium. Lille Skensved, DK (laboratório n.º 48877).

20 EDWARDS, C. N.; 2002. **Tahitian Noni Suco-teste de micronúcleo de rato**.
21 **Relatório de teste**. Scantox Biologisk Laboratorium, Lille Skensved, DK (laboratório
22 n.º 47053).

23 EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goat.
24 **Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

1 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças
2 relacionadas, Sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica**
3 **Brasileira**, v.43, p.1-16, 1997.

4 FONSECA, J. F. ; CRUZ, R. do C.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.
5 de; VIANA, J. H. M. E. Biotecnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos
6 /Jeferson Ferreira [et al.] - Brasília, DF : Embrapa, 2014. **Biotecnologia Aplicada à**
7 **Reprodução de Ovinos e Caprinos**.

8 FONSECA, J. F., **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em**
9 **ovinos e caprinos**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005. Goiânia,
10 GO. Anais: Palestras.

11 FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull
12 sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*,
13 v. 71, p. 13-23, 2002.

14 FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull
15 sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*,
16 v. 71, p. 13-23, 2002.

17 FURST, R. **Efeito de Diferentes Tempos de Equilíbrio, Taxas de Congelamento e**
18 **Concentrações Esperáticas na Fertilidade do Sêmen Equino**. 2006, 96f Tese
19 (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG:2006.

20 GARCIA, I. F. F.; PEREZ, J. R. O.; TEIXEIRA, J. C.; BARBOSA, C. M. P.
21 Desempenho de cordeiros Texel x bergamácia, Texel x Santa Inês e Santa Inês puros,
22 terminados em confinamento, alimentados com casca de café como parte da dieta.
23 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 564-572, 2000.

1 GIL, J; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N; SÖDERQUIST, L.;
2 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used
3 for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, n.5-6, p. 1157-1170, 2003.
4 HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.
5 513 p.
6 HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals.
7 **Pathology and Biology**, v.44, n.1, p.6-13, 1996.
8 HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and
9 significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715S-725S, 1993.
10 HALLIWELL, B.; GUTTERIGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**.
11 3ed., Oxford University Press: New York, 936p., 1999.
12 HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação e sêmen**
13 **animal**. 2. Ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 51 p. 1998.
14 HINKOVSKA-GALCHEVA V, PETKOVA D, KOUMANOV K. Changes in the
15 phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma
16 membranes after cryopreservation. **Cryobiology**. 1989; 26:70-75.
17 HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of sêmen. *Animal Reproduction Science*,
18 v. 62, p. 3-22, 2000.
19 HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*,
20 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária**
21 **municipal em 2013**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 03/05/2017.
22 JONES, R. & MANN, T. Lipid peroxides in spermatozoa: formation, role of
23 plasmalogen and physiological significance. **Man**. v.193, p.317-333, 1976.
24 KRZYZOSIAK J, EVENSON D, PITT C, JOST L, MOLAN P, VISHWANATH R.
25 Changes in Ssusceptibility of bOovine Ssperm to Iin Ssitu DNA Desnaturation, During

1 Prolonged Incubation at Ambient Temperature Under Conditions of Exposure to
2 Rreactive Oxygen Sspecies and Nnuclease Iinhibitor. **Reprod Fertil Dev**, v.12,
3 p.251-261, 2000.

4 KUTVOELGYI, G. **Use of *Morinda Citrifolia* (Noni) Extract for Improving Sperm**
5 **Preservation**. EP Pat. WO 2008032132 A2, 2008.

6 LEAHY, T.; MARTI, J. I.; MENDOZA, N.; PÉREZ-PÉ. R. R.; MUIÑO-BLANCO,
7 T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; EVANS, G.; MAXWELL, E. M. C. High pré-freezing
8 dilution improves post-thaw function of RAM spermetazoa. **Animal Reproduction**
9 **Science**, v. 119, p. 137-146, 2010

10 LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI,
11 E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA):
12 scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5,
13 p.1–15, 2000.

14 LIU, R.H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**,
15 Manhattan, v.46, p.207-219, 2007.

16 LOPES, BETHANIA VIEIRA. **Efeito da adição e /ou suplementação de**
17 **antioxidante no processo de congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e**
18 **subfêrteis** /Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
19 Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

20 LUZ, S. L. N.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D. Parâmetro utilizados na
21 avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian**
22 **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, 2000.

23 MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em
24 mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-
25 193, 2009.

1 MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D.
2 B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg
3 yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v.85, p.
4 85-90, 2009.

5 MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In:
6 MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male Reproduction and Semen**. New York:
7 Springer Verlag, p. 23-28, 1981.

8 MAXWELL WMC, STOJANOV T. Liquid Storage Of Ram Semen in the Absence or
9 Presence Of Some Antioxidants. **Reprod Fertil Dev**, v.8, p.1013-1020, 1996.

10 MAXWELL, W. M. C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absenc
11 for presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8,
12 p.1013-1020, 1996.

13 MCCLATCHEY W. Dos curandeiros polinésios às lojas de alimentos saudáveis:
14 Perspectivas em mudança de *Morinda citrifolia* (*Rubiaceae*). **Integr. Câncer**
15 **Ther.** 2002 1 110 120 110-120;

16 MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.A.G.L.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade
17 antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.
18 44, n.2, p. 193-201, 2008.

19 MIRMIRAN P. BAHADORAN Z. AZIZI F. Dieta funcional baseada em alimentos
20 como uma nova abordagem dietética para o tratamento do diabetes tipo 2 e suas
21 complicações: **Uma revisão World J. Diabetes** 2014. 5 267 281 10.4239 /
22 wjd.v5.i3.267 24936248.

23 MORAES, C. N.; NEVES, J P.; GONÇALVES, P. B.; OLIVEIRA, J. F. C.;
24 SCHWEITZER, C. M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glicol.
25 **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.

1 MORTIMER, S.T., MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of
2 frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v.127, p.285–291, 2004.

3 MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M.
4 Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method:
5 cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p 1695-
6 1706, 2002.

7 NASCIMENTO, A. L. C. **Potencial antioxidante do extrato aquoso do fruto do noni**
8 **em diluente para congelação de sêmen ovino**. Sergipe: UFS, 2014 32p. (Dissertação
9 – Mestrado em Zootecnia).

10 NASCIMENTO, A. L. C. **Potencial antioxidante do extrato o fruto do noni em**
11 **diluente para congelação de sêmen ovino**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia),
12 Universidade Federal de Sergipe, 2015.

13 NEVES, L. C. Frutos - O remédio do futuro. **Revista Brasileira de Fruticultura**,
14 Jaboticabal, v. 34, n.4. p. i, 2012.

15 NICHI, M. **Sistema de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos**
16 **lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de**
17 **Dourados**. MS. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –
18 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo,
19 2003.

20 OBERST, E.R. et al. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação
21 da integridade da membrana espermática de carneiro. **Revista Brasileira de**
22 **Reprodução Animal**, v.27, p.375-376, 2003.

23 PAULA, T. A. R. Reprodução de Carnívoros Silvestres. **Revista Brasileira de**
24 **Reprodução Animal**, v 35, n.2, p. 103-132, abr/ jun. 2011. Disponível em:

1 <<https://www2.cead.ufv.br/espacoProdutor/scripts/verArtigo.php?codigo=27&acao=exibir>> Acesso: em 20 de outubro.

2

3 PEIXOTO, A.L.V.A.; MONTEIRO Jr, P.L.J.; CÂMARA, D.R. et al. Efeito do tempo
4 de incubação pós-descongelação sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos
5 criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina c e trolox. **Ciência
6 Veterinária nos Trópicos**, v. 11, no 1, p. 16 - 24, 2008.

7 PEREZ, E. G. A. **Efeito da adição de Glutathione na função e estresse oxidativo em
8 Sêmen ovino criopreservado**. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo.
9 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal.
10 São Paulo, 2009.

11 SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram sêmen: i. processing
12 freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction
13 Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

14 SALAMON, S.; MAXWELL W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction
15 Science**. 2000; 62(1): 77- 111.

16 SANTOS V. S.; SANTOS A. D. F.; OLIVEIRA D. A.; NASCIMENTO A. L. C.;
17 SANTOS E. M. **Revista Eletrônica Scientia Plena**. Adição da polpa liofilizada do
18 Noni em diluente para congelação de sêmen sobre a integridade da membrana
19 plasmática de espermatozoides ovinos, vol. 11, núm. 4, 2015. Disponível em:
20 <<https://scientiaplena.emnuvens.com.br/sp/article/view/2504/1189>>. Acesso em: 03
21 de março de 2017.

22 SARLOS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. et al. Comparative evaluation of the effect
23 of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50,
24 p.235-245, 2002.

1 SILVA SV, GUERRA MMP. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas
2 e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução**
3 **Animal**. 2011; 35(4): 370s-384.

4 SILVA, E. C.; CAJUEIRO, J. F.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M.
5 Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram
6 sperm. **Theriogenology**, v.77, n.8, p.1722-1726, 2012.

7 SILVA, J. C. **Criopreservação e sêmen ovino com diferentes concentrações**
8 **espermáticas associado ou não com ácido ascórbico**. Tese (Doutorado) –
9 Universidade Estadual de Viçosa, MG, 2013.

10 SILVA, J. J. M. **Adubação orgânica e mineral de noni: desempenho agrônômico,**
11 **nutrição da planta, qualidade do fruto e de suco**. Tese. Areia – PB, 2010.

12 SILVA, João José Mendes. Adubação orgânica e mineral de noni: desempenho
13 agrônômico, nutrição da planta, qualidade de fruto e de suco. Tese (Doutorado em
14 Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia,
15 2010.

16 SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.;
17 PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk
18 extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation.
19 **Animal Reproduction Science**, v.137, n.1-2, p.37-44, 2013.

20 SOARES AT, GUERRA MMP. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade
21 espermática. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**. 2009; 3(2): 53-63.

22 SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L, M; SILVA, A. O; MANCINI-FILHO, J; LIMA, A.
23 Caracterização Nutricional e Compostos Antioxidantes em Resíduos de Polpas de
24 Frutas Tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p.554-559, 2011.
25 Sydney: Bulterworths, p.194, 1987.

1 Sydney: Bulterworths, p.194, 1987.

2 TOMBOLATO, F.C.A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R. et al. Noni: Frutífera Edicinal
3 em Introdução e Aclimação no Brasil. Informações técnicas: **O Agrônomo**,
4 **Campinas**. 2005; 57(1):20-1.

5 TONIOLLI, R. Utilização de Antioxidantes na Preservação Seminal em Suínos.
6 **Ciência Animal**, V.22, n.YY1, p. 365-375, 2012.

7 UPRETI G.C; JENSEN K.; OLIVER, J.E; DUGANZICH, D.M; MUNDAY. R;
8 SMITH, J.F. Motility Of Ram Spermatozoa During Storage in Chemically-Defined
9 Diluent Containing Antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.269-278,
10 1998.

11 v.62, p.3-22, 2000.

12 VALENÇA R. M. B.; GUERRA M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a
13 utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Rev Bras Reprod**
14 **Anim**, v.31, p.47-53, 2007.

15 VALENTE, S. S.; PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; MARQUES, C. C.;;
16 VASQUES, M. I.; SILVA PEREIRA, M. V. C. HORTA, A.E.; BARBAS, J. P. *in vitro*
17 and *in vivo* fertility of ram sêmen cryopreserved in diferente extenders. **Animal**
18 **Reproduction Science**, v. 117, p. 74-77, 2010.

19 VAN OVERVELD FW, HAENEN GR, RHEMREV J, Vermeiden JP, Bast A.
20 Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chem**
21 **Biol Interact**, v.127, p.151-161, 2000.

22 VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências**
23 VERNET et al. In vitro expression of a mouse tissue-specific glutathione peroxidase
24 protein lacking selenocysteine can protect stably transfected ammalian cells against
25 oxidative damage. **Biochem Cell Biol**, v.74, p.125-131, 1996.

1 VERNET P, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. Tissue and developmental distribution,
2 dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine
3 epididymis-specific glutathione peroxidase. **Mol Reprod Dev**, v.47, p.87-98, 1997.

4 VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the
5 epididymis. **Molecular Cell Endocrinology**, v.216, p.31–39, 2004.

6 VIANA J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista**
7 **Ovinos**, Ano 4, N° 12, Porto Alegre, Março de 2008.

8 VIANA, J. G. H.; SILVEIRA, V. C. P.; Análise econômica da ovinocultura: estudo de
9 caso na Metade Sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Animal**. V. 39, n. 4, p.1187-1192,
10 2009.

11 WANG M. Y. WEST BJ JENSEN CJ NOWICKI D. SU C. PALU AK ANDERSON
12 G. Morinda citrifolia (Noni): Uma revisão de literatura e avanços recentes na pesquisa
13 de Noni. **Acta Pharmacol**. 2002.

14 WANG, M. Y.; WEST, B.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; SU, C., PALU, A. K.,
15 ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in
16 Noni research. **Acta Pharmacologica Sínica**, Shangai, v. 23, n. 12, p. 1127-1141,
17 2002.

18 WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim**
19 **Reprod Sci**, v.60/61, p.481-492, 2000.

20 WESTENDORF J, EFFENBERGER K, IZNAGUEN H e BASAR S. 2007.
21 Investigações toxicológicas e analíticas de suco de fruta de Noni (*Morinda citrifolia*).
22 **J Agric Food Chem** 55: 529-537. 2007

23 YU H, LI S., HUANG M.T. e HO C.T. 2008. Constituintes antiinflamatórios em frutos
24 de noni (*Morinda citrifolia*), suplementos dietéticos. **American Chemical Society**, p.
25 179-190.

1 ZINI, A.; GABRIEL, M. S.; BAAZEEM, A. Antioxidants and sperm DNA damage:
2 a clinical perspective. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, p.427–
3 432, 2009.