

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE MEL SOBRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS DO SÊMEN EQUINO REFRIGERADO

(Influence of honey addition on the kinetic parameters of refrigerated equine semen)

Ramon Barros da CUNHA¹; Leonardo Reis SILVA^{1*}; Gabriela Gonçalves LOBATO¹;
Sebastião Tavares Rolim FILHO¹; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO¹;
Arthur Irlan Lima da MOTA¹; Giovana Aiko Ueoka OSTERNACK¹

¹Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Av. Tancredo Neves, nº 2501,
Terra Firme. Cep: 68.904-660. *E-mail: leoreisreis94@gmail.com

RESUMO

A performance reprodutiva de um garanhão depende de diversos fatores inter relacionados, portanto, a fim de maximizar o desempenho reprodutivo desses animais, são utilizadas diversas técnicas para incremento da qualidade do sêmen, dentre elas, a centrifugação com posterior remoção do plasma seminal e a adição de mel ao diluidor, mostram-se favoráveis. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de 1% de mel orgânico ao diluente Botu Sêmen Transporte, sobre o vigor, motilidade total e progressiva de sêmen refrigerado a 5 °C em diferentes tempos. O experimento foi realizado em um Haras em Soure, na Ilha do Marajó/PA, com quatro garanhões Quarto de Milha, submetidos a cinco coletas cada, utilizando vagina artificial. As amostras foram divididas em grupos controle (apenas com diluente) e experimentais (com ou sem centrifugação e adição de 1% de mel orgânico), sendo avaliadas após 12, 24 e 36 horas de armazenamento. Os resultados de vigor ($2,75 \pm 0,50$; $p < 0,05$) e motilidade total ($26,25 \pm 14,71$ e $23,75 \pm 4,78$) dos grupos 36h que receberam suplementação de mel, apresentaram diferença estatisticamente significativa, em comparação ao grupo controle. Já na motilidade progressiva os grupos não diferiram entre si. Nos resultados comparativos entre os grupos centrifugados e não centrifugados não houve diferença estatística. Concluiu-se que a adição de 1% de mel pode contribuir para a manutenção dos parâmetros seminais durante a refrigeração em períodos longos, mas a centrifugação não foi um fator que gerou alterações significativas para conservação dos parâmetros cinéticos do sêmen.

Palavras-chave: Garanhões, mel orgânico, parâmetros seminais, sêmen refrigerado.

ABSTRACT

The reproductive performance of a stallion depends on several interrelated factors. Therefore, to maximize the reproductive performance of these animals, various techniques are used to enhance semen quality, among which centrifugation with subsequent removal of the seminal plasma and the addition of honey to the extender have shown favorable results. The objective of this study was to evaluate the effect of adding 1% organic honey to the Botu Sêmen Transporte extender on the vigour, total motility, and progressive motility of semen refrigerated at 5 °C at different times. The experiment was conducted at a stud farm located in Soure, on Marajó Island, PA, with four Quarter Horse stallions, each subjected to five collections using an artificial vagina. The samples were divided into control groups (extender only) and experimental groups (with or without centrifugation and the addition of 1% organic honey), being evaluated after 12, 24, and 36 hours of storage. The results for vigor (2.75 ± 0.50 ; $p < 0.05$) and total motility (26.25 ± 14.71 and 23.75 ± 4.78) in the 36h groups that received honey supplementation showed a significant difference in the statistical analysis compared to the control group. However, for progressive motility, the groups did not differ from each other. Regarding the comparative results between centrifuged and non-centrifuged groups, there was no statistical difference. It is concluded that the addition of 1% honey can contribute to the maintenance of seminal parameters during prolonged refrigeration, whereas centrifugation did not significantly affect the conservation of the kinetic semen parameters.

Keywords: Stallions, organic honey, seminal parameters, refrigerated semen.

INTRODUÇÃO

A performance reprodutiva de um garanhão depende de vários fatores inter relacionados, dentre eles o manejo, a fertilidade das éguas inseminadas, presença de patógenos

venéreos no aparelho reprodutor de machos e fêmeas, libido, habilidade de monta e qualidade seminal (AMANN, 2005). Com a finalidade de maximizar o desempenho reprodutivo, a utilização de métodos avançados para o processamento e para a seleção do sêmen de garanhões, são boas ferramentas para o uso de sêmen de baixa qualidade ou para obter espermatozoides para programas de reprodução assistida (LOOMIS, 2006).

Dentre diversas técnicas desenvolvidas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões a centrifugação com posterior remoção do plasma seminal é uma das principais para reprodutores cujo ejaculado sofre uma redução acentuada da motilidade progressiva, quando processado da maneira convencional, especialmente para sêmen refrigerado por mais de 24 horas (BRINSKO *et al.*, 2000)

Dessa forma, diversos pesquisadores têm buscado meios alternativos para utilização em sêmen resfriado de garanhões, como água de coco, açúcares, leite em pó desnatado, glicose e tampão bicarbonato. Atualmente o mel tem sido considerado por suas propriedades terapêuticas e também como suplemento alimentar, sem a adição de outras substâncias durante a sua elaboração. Este fato se justifica visto que a simples análise do mel demonstra claramente a riqueza nutritiva de sua composição em vitaminas e minerais (AZEREDO *et al.*, 2003).

A partir disso, o mel demonstrou-se como uma alternativa viável para incremento da fertilidade de garanhões. El-Sheshtawy *et al.* (2016) em trabalho realizado no Egito com garanhões da raça árabe, observou que a suplementação com mel em diversas concentrações (2%, 3% e 4%) apresentou diferença sobre a motilidade, integridade da membrana e percentagem do acrossoma intacto ($p < 0,001$) a 0, 1, 2 e 3 horas pós-descongelção.

Ademais, a composição diversificada do mel, o torna um produto de elevado potencial científico, no processo de criopreservação do sêmen. Considerando suas propriedades antioxidantes, antibacterianas (Al-WAILI, 2014), presença de carboidratos (como frutose, glicose e maltose), de vitaminas e de minerais (MEO, 2017; BALL, 2007), supõe-se que tais aspectos do mel possibilitem a manutenção da cinética, a integridade funcional dos espermatozoides, a proteção contra subprodutos nocivos ao metabolismo, o fornecimento de energia, a proteção contra choque térmico e a redução do desenvolvimento bacteriano (AURICH *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2011).

De acordo com Brinsko *et al.* (2000) e Ramires-Neto *et al.* (2013), quando se remove o plasma seminal, de garanhões com baixa resistência espermática à refrigeração, ocorre um aumento da qualidade do sêmen após a refrigeração, relacionada principalmente à integridade e funcionalidade celular. Assim sendo, observa-se a centrifugação, como técnica visando a separação do plasma seminal e concentraando os espermatozoides. Ela consiste na utilização da força centrífuga, para sedimentar os componentes mais densos (espermatozoides) no fundo do tubo e possibilitando a remoção do sobrenadante (plasma seminal). A influência na qualidade final do ejaculado processado pode ser benéfica, pelo aumento da concentração de espermatozoides viáveis, porém o tempo e a força de centrifugação podem afetar de forma negativa os parâmetros do sêmen (Sieme *et al.*, 2003).

A pesquisa buscou determinar se o mel, devido às suas propriedades antioxidantes e nutritivas, poderia melhorar a preservação da qualidade do sêmen equino durante o resfriamento, oferecendo uma alternativa viável para otimizar técnicas de reprodução assistida. A motivação para essa investigação baseou-se na necessidade de encontrar métodos eficazes para prolongar a viabilidade do sêmen refrigerado, especialmente em contextos como o

transporte para inseminação artificial, onde a manutenção da qualidade espermática é crucial. Portanto, este estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito da adição de 1% de mel orgânico ao diluente Botu Sêmen Transporte[®] sobre os parâmetros cinéticos do sêmen refrigerado de equinos a 5 °C.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais e métodos de coleta

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia, sob o protocolo nº 6957170620. O experimento foi conduzido em um haras, localizado em Soure, na Ilha do Marajó/PA. Foram utilizados quatro garanhões Quarto de Milha, com idade entre quatro e cinco anos, selecionados por meio de exame andrológico e histórico reprodutivo de fertilidade comprovada. Os animais foram mantidos em baias de 5,0 × 3,0m, alimentados com capim-elefante triturado, duas vezes ao dia e concentrado três vezes ao dia, totalizando 4,0kg por animal/dia, além de sal mineral e água de boa qualidade *ad libitum*, conforme recomendações do NRC (2007).

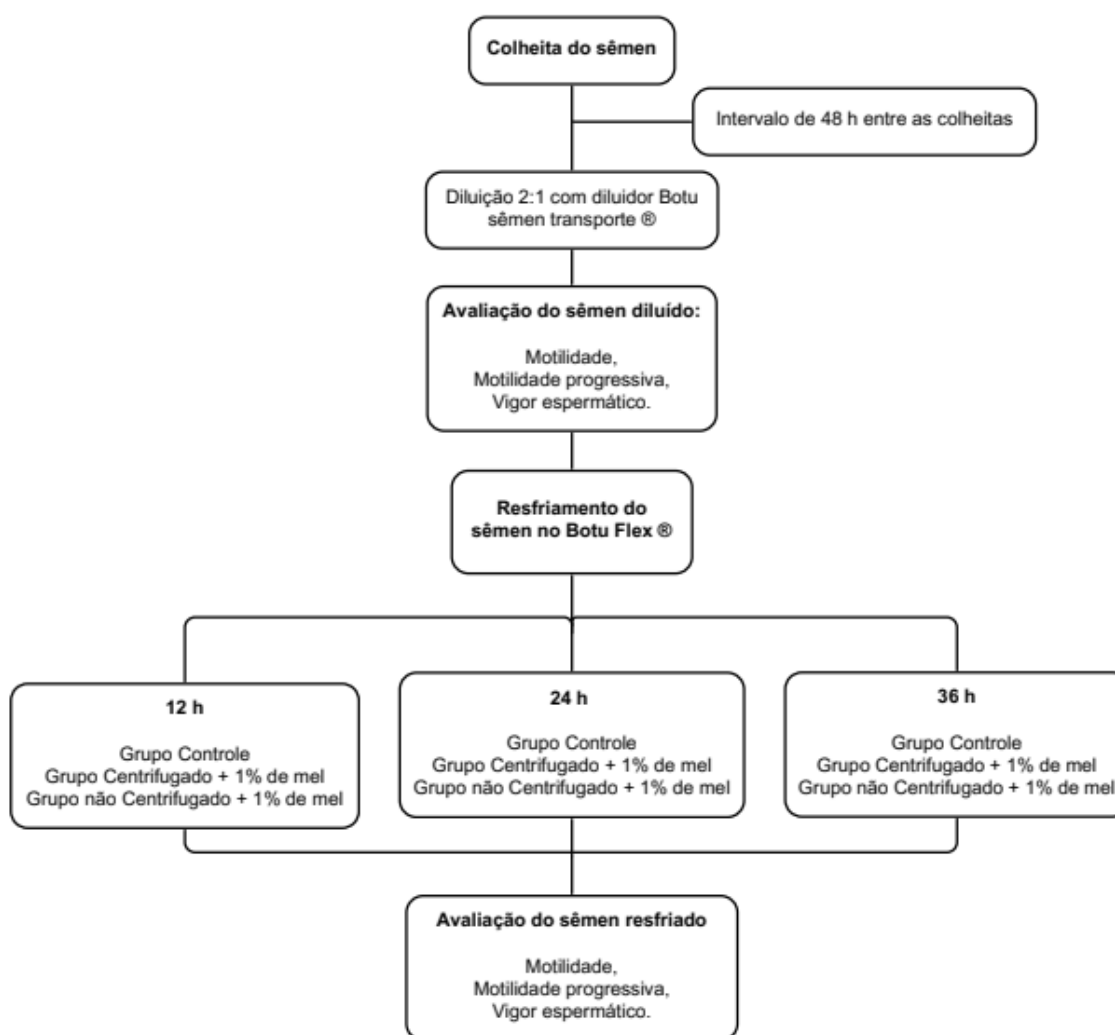
Foram realizadas cinco coletas de sêmen de cada garanhão, três vezes por semana, com intervalo de 48 horas, com o auxílio de vagina artificial modelo Botucatu, camisa sanitária descartável e copo coletor com filtro de nylon acoplado para obtenção da fração livre de gel. A vagina artificial foi mantida a uma temperatura entre 42 e 44 °C, utilizando uma égua em estro induzido como manequim, mediante aplicação de 10mg de cipionato de estradiol (ZoetisBR, ECP). No momento da monta, o pênis ereto era direcionado à vagina artificial. A ejaculação foi detectada pelos jatos ejaculatórios, verificados com a palma da mão na porção ventral do pênis ou pela observação dos movimentos da cauda. Imediatamente após as coletas, foram realizadas as avaliações macroscópicas do sêmen (volume, cor, aspecto).

Desenho Experimental

No procedimento experimental, esquematizado na Fig. 01 abaixo, a metodologia iniciou com a coleta de sêmen de cada garanhão. Para o grupo controle, 1,5mL de sêmen foram diluídos na proporção 2:1 (diluente:sêmen) com Botu Sêmen Transporte[®], totalizando 4,5mL por amostra. Essa solução foi fracionada em três alíquotas de 1,5mL, acondicionadas em microtubos individualmente com a identificação do garanhão (G1, G2, G3 e G4) e os períodos de avaliação (12, 24 e 36 horas).

Para os grupos experimentais, utilizou-se uma amostra do mesmo ejaculado, mas com modificações no protocolo. Preparou-se uma solução de 30mL de diluente enriquecida com 0,3 mL de mel orgânico (1% do volume total), adicionado com seringa de insulina. Dessa solução, 6mL foram alocados para cada garanhão, esses 6mL foram divididos entre os 6 grupos (12, 24 e 36 horas, centrifugados ou não centrifugados). Para a formação do grupo não centrifugado foi utilizado 0,5 mL de sêmen foram diluídos na proporção 2:1 (diluente + 1% de mel:sêmen).

No processo de centrifugação, 5mL de sêmen fresco foram diluídos em 10mL de diluente sem mel e centrifugados a 1200g por 10 minutos. Após a remoção completa do sobrenadante, o sedimento espermático foi ressuspenso em diluente com 1% de mel na proporção de 2:1 diluente + 1% de mel:sêmen).



(Fonte: O autor, 2025)

Figura 01: Esquema mostrando o desenho experimental do trabalho.

As amostras dos grupos controle, centrifugados e não centrifugados de 12, 24 e 36 horas foram armazenadas em tubos de 5mL, com tampa, os quais foram acondicionados em caixa de isopor contendo água a 25 °C. Esta caixa, contendo água e as amostras de sêmen, foram colocadas, sem tampa, em geladeira a 5 °C.

No total, obtiveram-se 10 amostras por ejaculado, que foram organizadas cronologicamente e armazenadas no contêiner Botuflex® a 5 °C por 12, 24 e 36 horas. Após cada período, as amostras foram retiradas, aquecidas em banho-maria a 40 °C e avaliadas em microscópio óptico (400x) quanto aos parâmetros de vigor, motilidade total e motilidade progressiva, permitindo uma análise comparativa entre todas as amostras do mesmo animal.

Análise Estatística

As variáveis dependentes consideradas foram: motilidade, motilidade progressiva do sêmen e vigor espermático. Os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas e posteriormente submetidos à análise estatística por meio do software especializado SAS University Edition, onde foram analisados pelo teste ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na avaliação do vigor espermático (Tab. 01), a maioria dos grupos não diferiu estatisticamente entre si ($p>0,05$). A exceção foi o grupo controle avaliado no momento da coleta (0h), que apresentou valor significativamente maior ($2,75\pm0,5$; $p<0,05$) em comparação a todos os outros grupos. Após 36 horas de armazenamento, os grupos suplementados com mel (Grupo centrifugado: $1,75\pm0,5$ e Grupo não centrifugado: $2,25\pm0,5$) apresentaram vigor significativamente melhor ($p<0,05$) ao grupo controle no mesmo período. O maior vigor no tempo 0h era esperado, refletindo a qualidade seminal *in natura* superior em relação às amostras refrigeradas (12 e 24 horas).

Tabela 01: Vigor espermático (Média $\pm$ Desvio padrão) de sêmen de cada garanhão (G1 até G4), de acordo com a hora de avaliação (12, 24 e 36 h) das amostras centrifugadas ou não, com adição de mel a 1%.

GRUPOS	VIGOR ESPERMÁTICO			
	G1	G2	G3	G4
Controle 0h	$2,75\pm0,5^a$	$2,75\pm0,50^a$	$3,00\pm0^a$	$3,00\pm0^a$
12h	$2,50\pm0,57^b$	$2,00\pm0^b$	$2,50\pm0,57^b$	$2,50\pm0,7^b$
24h	$2,25\pm0,5^b$	$2,00\pm0^b$	$2,00\pm0,81^b$	$2,00\pm0^b$
36h	$1,75\pm0,5^b$	$1,25\pm0,5^b$	$1,75\pm1,25^b$	$2,00\pm0^b$
Não centrifugado (12h)	$2,75\pm0,5^b$	$2,50\pm0,5^b$	$2,75\pm0,5^b$	$2,00\pm0^b$
Não centrifugado (24h)	$2,50\pm0,57^b$	$2,50\pm0,57^b$	$2,50\pm0,57^b$	$2,50\pm0,7^b$
Não centrifugado (36h)	$2,25\pm0,5^c$	$2,25\pm0,5^c$	$2,00\pm0,81^c$	$2,00\pm0^c$
Centrifugado (12h)	$2,75\pm0,5^b$	$2,50\pm0,57^b$	$2,50\pm0,57^b$	$2,50\pm0,7^b$
Centrifugado (24h)	$2,25\pm0,50^b$	$2,25\pm2,25^b$	$2,75\pm0,5^b$	$2,50\pm2,0^b$
Centrifugado (36h)	$1,75\pm0,5^c$	$2,25\pm0,5^c$	$2,25\pm0,5^c$	$2,50\pm0,7^c$

A melhor manutenção do vigor nos grupos de 36h que foram centrifugados e não centrifugados pode ser atribuída à sua composição, que inclui açúcares (frutose e glicose) (VENIR, 2010), minerais (magnésio, potássio, cálcio, sódio, enxofre, ferro, fosfatos) e compostos bioativos com propriedades antioxidantes, como ácido cafeico, éster fenético de ácido cafeico e flavonoides (GÜL e AZIZ, 2018).

A propriedade antioxidante do mel, apresenta como principal função a eliminação dos radicais livres e a proteção contra danos celulares ocasionados por eles (CHEEPA, 2022). No estresse oxidativo, ocorre a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais ocasionam lesões na membrana lipídica das células (PISOSCHI, 2015). Os antioxidantes presentes na composição do mel são diversos, dentre eles aminoácidos (como ácido aspártico e glutamina), compostos fenólicos (como ácidos fenólicos e flavonoides), vitamina C (como galasina e crisina) e enzimas (como catalase e glicose oxidase) (GÜL e AZIZ, 2018). Portanto,

no processo de resfriamento, o mel torna-se uma substância de interesse científico, devido aos seus efeitos nutricionais, antimicrobiana, antioxidante e antitoxina, antimutagênica e anti-inflamatória (BOGDANOV *et al.*, 2008; MANYI-LOH *et al.*, 2011).

Consoante ao trabalho desenvolvido por El-Sheshtawy, em 2016, O mel utilizado com diluente crioprotetor para garanhões árabes, contribuiu para o aumento da motilidade espermática, do índice de viabilidade, da integridade da membrana e do acrossomo após a criopreservação de espermatozoides, porém, apenas nas concentrações de 2%, 3% e 4%, sendo as concentrações de 1% e 5%, sem diferenças significativas.

Não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) no vigor quando se compararam os grupos centrifugados com os não centrifugados em um mesmo tempo de avaliação. Da mesma forma, não houve diferença significativa no vigor entre os diferentes garanhões utilizados no estudo ($p>0,05$). A melhoria do vigor, quando foi acrescentado mel como suplemento do diluente e refrigerado por até 72h, corrobora com trabalho desenvolvido por Jerez-Ebensperg *et al.* (2015), em que esses concluíram que a adição de mel ao extensor de carneiro reduziu a deterioração e contribuiu com o melhor vigor do espermatozoide quando armazenado a 4 °C.

Diversos autores demonstraram que o baixo volume de plasma seminal promove uma melhor conservação do vigor durante o armazenamento refrigerado do sêmen de garanhões (JASKO *et al.*, 1992; KELLER *et al.*, 2001; TODD *et al.*, 2001; SCHMITT *et al.*, 2003). A centrifugação removeu a maior parte do plasma seminal juntamente com o diluente no sobrenadante. Embora a concentração de plasma residual não tenha sido quantificada, apenas uma quantidade mínima permaneceu no sedimento. Apesar disso, não foi observada diferença no vigor espermático durante o armazenamento entre as amostras centrifugadas e não centrifugadas.

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

Analisando os resultados de motilidade espermática (Tab. 02), interpretou-se que o grupo controle (0h) apresentou média de $65,00\pm12,90\%$, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) de todos os demais grupos. Os grupos controles, centrifugados e não centrifugados avaliados as 12h e 24h não mostraram diferença significativa entre si ($p>0,05$). Contudo, ao se confrontar o grupo controle de 36h com os grupos suplementados com 1% de mel no mesmo tempo os quais obtiveram médias de $26,25\pm14,71\%$ e $23,75\pm4,78\%$, respectivamente, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

A motilidade das amostras acrescidas de mel até às 36 horas quando comparadas ao grupo controle é um dado a ser considerado, resultado esse interligado ao substrato energético e ao protetor contra choque térmico, além de seu potente efeito antioxidante contra danos aos espermatozoides durante o resfriamento. além disso, a presença de flavonoides que possuem atividade de eliminação de radicais livres (RL), inibindo assim os danos ao DNA induzidos por RL (CHEN *et al.*, 2004).

Tabela 02: Motilidade de sêmen de cada garanhão (G1 a G4), de acordo com a hora de avaliação (12, 24 e 36h) das amostras centrifugadas ou não centrifugadas, com aditivo de mel a 1%.

	GARANHÃO / MOTILIDADE			
Grupos	G1	G2	G3	G4
Controle 0h	65,00±12,90 ^a	60,00±8,16 ^a	62,50±5,00 ^a	50,00±0,0 ^a
Controle 12h	46,25±4,78 ^b	41,25±11,81 ^b	56,25±7,50 ^b	40,00±0,0 ^b
Controle 24h	35,00±10,00 ^c	31,25±8,53 ^c	36,25±13,14 ^c	37,50±3,53 ^c
Controle 36h	25,00±12,90 ^e	20,00±9,12 ^e	27,50±21,01 ^e	22,50±3,53 ^e
Centrifugado (12h)	53,75±8,53 ^b	46,25±11,08 ^b	46,25±4,78 ^b	42,50±10,60 ^b
Não centrifugado (12h)	48,75±13,14 ^b	53,75±22,86 ^b	51,25±15,47 ^b	45,00±7,07 ^b
Centrifugado (24h)	42,50±14,43 ^c	41,25±31,25 ^c	47,50±6,45 ^c	45,00±40,00 ^c
Não centrifugado (24h)	37,50±11,90 ^c	42,50±12,58 ^c	40,00±14,71 ^c	45,00±7,07 ^c
Centrifugado (36h)	26,25±14,71 ^d	33,75±11,08 ^d	41,25±8,53 ^d	37,50±10,60 ^d
Não centrifugado (36h)	23,75±4,78 ^d	27,50±8,66 ^d	28,75±13,76 ^d	20,00±14,14 ^d

Os resultados obtidos estão em consonância com os de estudos anteriores realizados em diversas espécies. Pesquisas com cabras (OLAYEMI *et al.*, 2011), ovinos (JEREZE *et al.*, 2013), bovinos (EL-SHESHTAWY *et al.*, 2014), camelos (EL-NADY *et al.*, 2022) e garanhões árabes (EL-SHESHTAWY *et al.*, 2016) também observaram que a adição de mel a diluidores para refrigeração e criopreservação resulta no aumento da motilidade espermática e na melhoria geral da qualidade do sêmen.

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

Outrossim, outros estudos apontam que a baixa motilidade do semen depois da refrigeração, melhorou após a retirada do plasma por meio da centrifugação antes da refrigeração (BRINSKO *et al.*, 2000), no entanto, no trabalho em questão, não houve diferença estatística entre as amostras refrigeradas após 36h, que possuíam aditivo de mel a 1%, apenas diferiram com o grupo controle de (36h), logo a centrifugação não corroborou significativamente para a diferença entre o grupo controle e os grupos com mel, mas não diferenciou a motilidade entre as amostras que receberam mel a 1%, esse resultado corrobora com a conclusão feita por Reda *et al.* (2016), em que a adição de mel, em diversas concentrações, ao diluidor de congelamento resultou no aumento da motilidade espermática.

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

Além disso, o resultado positivo presente no grupo centrifugado (36h) está de acordo com o resultado obtido por Pagl *et al.* (2006), o qual relata que a centrifugação do semen refrigerado por até 72 h apresentava a motilidade aumentada e que a centrifugação não trouxe danos ao vigor dos espermatozoides.

Ao ser avaliada a motilidade progressiva, Tab. 03, pode ser observado que o grupo controle 0h com média e desvio padrão de $42,50 \pm 15,00$, apresentou diferença estatística quando contraposto com os demais grupos ($p<0,05$), os demais grupos e garanhões não apresentaram diferença estatística ao serem contrapostos de acordo com o momento de avaliação ($p>0,05$), concluindo assim que o acréscimo de 1% de mel orgânico e a realização da centrifugação não interferem quanto a motilidade progressiva de garanhões.

Tabela 03: Motilidade progressiva de sêmen de cada garanhão (G1 a G4), de acordo com a hora de avaliação (12, 24 e 36h) das amostras centrifugadas ou não centrifugadas com aditivo de mel a 1%.

	GARANHÃO / MOTILIDADE PROGRESSIVA			
Grupos	G1	G2	G3	G4
Controle 0h	$42,50 \pm 15,00^a$	$52,50 \pm 17,07^a$	$77,50 \pm 17,07^a$	$37,50 \pm 3,53^a$
Controle 12h	$36,25 \pm 11,08^b$	$32,50 \pm 10,40^b$	$43,75 \pm 8,53^b$	$32,50 \pm 3,53^b$
Controle 24h	$30,00 \pm 5,77^b$	$21,25 \pm 6,29^b$	$38,75 \pm 18,87^b$	$27,50 \pm 3,53^b$
Controle 36h	$27,50 \pm 16,58^c$	$25,00 \pm 16,83^c$	$22,50 \pm 17,07^c$	$12,50 \pm 3,53^c$
Centrifugado (12h)	$40,00 \pm 14,71^b$	$38,75 \pm 10,30^b$	$40,00 \pm 7,07^b$	$32,50 \pm 3,53^b$
Não centrifugado (12h)	$37,50 \pm 15,54^b$	$2,75 \pm 17,07^b$	$47,50 \pm 12,58^b$	$37,50 \pm 3,53^b$
Centrifugado (24)	$30,00 \pm 15,81^b$	$31,25 \pm 41,25^b$	$38,75 \pm 7,50^b$	$32,50 \pm 30,00^b$
Não centrifugado (24h)	$29,75 \pm 10,34^b$	$33,75 \pm 9,46^b$	$32,50 \pm 13,22^b$	$40,00 \pm 7,07^b$
Centrifugado (36h)	$30,00 \pm 14,71^c$	$25,00 \pm 10,80^c$	$32,50 \pm 6,45^c$	$27,50 \pm 10,60^c$
Não centrifugado (36h)	$17,50 \pm 5,00^c$	$18,75 \pm 8,53^c$	$22,50 \pm 11,90^c$	$37,50 \pm 17,67^c$

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

significativa entre os grupos centrifugados e não-centrifugados divergindo dos trabalhos anteriormente citados. Essa discordância pode estar relacionada com fatores inerentes do ganhão ou fatores inerentes da técnica de centrifugação.

Entretanto, Moore *et al.* (2005), observou que a exposição do sêmen por 15 minutos a concentrações de plasma seminal, variando de 0 a 80% antes da criopreservação, não tenham afetado a motilidade total, progressiva e integridade da membrana plasmática, ratificando assim o resultado obtido no presente trabalho. Porém, foi observado que as amostras com o passar do tempo havia uma perda de motilidade progressiva quando comparados os grupos de acordo com horário de avaliação o mesmo o observado por Nunes (2006), que avaliando diferentes concentrações espermáticas, observou maiores valores medianos ($p<0,05$) da variável motilidade progressiva (%) no momento pré-refrigeração quando comparados a outros tratamentos as 24 e 48 horas de refrigeração. O que pode ser explicado pelos danos promovidos durante o resfriamento, decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura das membranas ou indiretos, por alterações das funções celulares (SQUIRES *et al.*, 1999).

CONCLUSÕES

O estudo avaliou o uso de 1% de mel como aditivo ao diluidor no sêmen equino resfriado por 36 horas. Os resultados mostraram que o mel melhorou significativamente o vigor e a motilidade total espermática submetido à refrigeração por até 36 h, mas não a motilidade progressiva. Além disso, a centrifugação do sêmen não resultou em diferenças significativas na fertilidade quando comparados os grupos centrifugados e não centrifugados. Esses achados corroboram a literatura em relação aos parâmetros cinéticos, mas divergem sobre o efeito da centrifugação. O trabalho contribui para o entendimento da fisiologia reprodutiva equina, oferecendo dados de referência para a conservação espermática e subsídios para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P. Weaknesses in reports of “fertility” for horses and other species. **Theriogenology**, v.63, n.3, p.698-715, 2005.
- AZEREDO, L.D.C.; AZEREDO, M.A.A.; SOUZA, S.D.; DUTRA, V.M.L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, v.80, n.2, p.249-258, 2003.
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.129-136, 2000.
- CHEEPA, F.F.; LIU, H.; ZHAO, G. The natural cryoprotectant honey for fertility cryopreservation. **Bioengineering**, v.9, n.3, p.88-95, 2022.
- CHEN, C.N.; WENG, M.S.; WU, C.L.; LIN, J.K. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.1, n.2, p.175-185, 2004.

- EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-BADRY, D.A.; GAMAL, A.; EL-NATTAT, W.S.; ALMAATY, A.M.A. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.5, n.4, p.331-334, 2016.
- FAKHRILDIN, M.B.; ALSAADI, R.A. Honey Supplementation to Semen-Freezing Medium Improves Human Sperm Parameters Post-Thawing. **Journal of Family & Reproductive Health**, v.8, n.1, p.27-31, 2014.
- GÜL, A.; PEHLIVAN, T. Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.25, n.6, p.1056-1065, 2018.
- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, n.6, p.1241-1252, 1992.
- JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, n.6, p.1059-1067, 1991.
- JEREZ-EBENSPERGER, R.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; DE BLAS, I. The combined use of honey, garlic (*Allium Sativum* L.) and skimmed milk as an extender for chilling sheep semen. **CryoLetters**, v.36, n.4, p.243-251, 2015.
- KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.K.; VIEIRA, M.J.; MATTOS, R.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. In: International Symposium on Stallion Reproduction, 3., 2001. Animal Reproduction Systems, 2001. p.38.
- LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v.22, n.3, p.663-676, 2006.
- LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1584-1591, 2005.
- MANYI-LOH, C.E.; CLARKE, A.M.; NDIP, R.N. Uma visão geral do mel: propriedades terapêuticas e contribuição para a nutrição e a saúde humana. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n.8, p.844-852, 2011.
- MEO, S.A.; AL-ASIRI, S.A.; MAHESAR, A.L.; ANSARI, A.G. Role of honey in modern medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.24, n.5, p.975-978, 2017.
- MONTEIRO, G.A.; ALVARENGA, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; FERREIRA, F.C. Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subfêrteis. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.2, p.255-263, 2011.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, n.3, p.241-249, 2005.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of horses. 6. ed., Washington, D.C.: National Academies Press, 2007.
- NUNES, D.B. **Container (CP) para refrigeração e preservação do sêmen equino**. 2006. 91p. (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal). Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.
- OLAYEMI, F.O.; ADENIJI, D.A.; OYEYEMI, M.O. Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. **Global Veterinaria**, v.7, n.1, p.19-21, 2011.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.97, p.55-74, 2015.

RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; CASTRO-CHAVES, M.M.B.; ALVARENGA, M.A. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v.79, n.7, p.1120-1123, 2013.

SCHMITT, F.L.; JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; MALSCHITZKY, E.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. A concentração do plasma seminal e o diluente afetam as características espermáticas do sêmen equino resfriado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.334-336, 2003.

SIEME, H.; MARTINSSON, G.; RAUTERBERG, H.; WALTER, K.; AURICH, C.; PETZOLD, R.; KLUG, E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.2, p.134-140, 2003.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1999. (Bulletin, n. 9).

TODD, P.; ARNS, M.J.; CHENO, W.P.; SCHULTZ, B. Influence of seminal plasma and processing on cold-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.68, n.3/4, p.335-336, 2001.

VENIR, E.; SPAZIANI, M.; MALTINI, E. Crystallization in “Tarassaco” Italian honey studied by DSC. **Food Chemistry**, v.122, n.2, p.410-415, 2010.

ZOHEIR, K.M.A.; HARISA, G.I.; ABO-SALEM, O.M.; AHMAD, S.F. Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.28, n.3, p.973-981, 2015.