

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Efeito de diferentes fontes de lipídios sobre a capacidade de
penetração espermática de galos semi pesados**

ALEXSANDER FERRAZ

Pelotas, 2015

Alexsander Ferraz

**EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE LIPÍDIOS SOBRE A CAPACIDADE DE
PENETRAÇÃO ESPERMÁTICA DE GALOS SEMI PESADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração: Produção Animal.

Orientadora: Prof^a.Denise Calisto Bongalhardo

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Rutz

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Anciutti

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas/ sistema de bibliotecas
Catalogação na publicação

F369e Ferraz, Alexander

Efeito de diferentes fontes de lipídios sobre a capacidade de penetração espermática de galos semi pesados/ Alexander Ferraz; Denise Calisto Bongalhardo, orientadora; Fernando Rutz, Marcos Antonio Anciuti, coorientadores – Pelotas, 2015. 53f.: il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015

1. Ácidos graxos poli-insaturados. 2. Fertilidade. 3. Espermatozoide. 4. Membrana celular. I. Bongalhardo, Denise Calisto, oriente. II. Rutz, Fernando, coorient. III. Anciuti, Marcos Antonio, coorient. IV. Título

CDD: 636.593

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Denise Calisto Bongalhardo – UFPEL – DFF/IB

Prof^a. Dra. Niédi Hax Franz Zauk– UFPEL – DFF/IB

Prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso – UFPEL – DZ/FAEM

Prof. Dr. Gilberto D´avila Vargas – UFPEL – FV

Agradecimentos

Para a conclusão desta fase foi necessário à colaboração de muitas pessoas, que ao longo destes dois anos contribuíram para que eu vencesse mais esta etapa.

Primeiramente, agradeço minha família, que proporcionou que eu desse mais este passo na minha vida. Por todo o apoio, compreensão e ajuda, imprescindível para que eu alcançasse esse objetivo e sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus amigos, que compartilharam comigo todos meus sucessos e decepções ao longo destes anos, e se fizeram presentes em todos os momentos.

Aos colegas de mestrado, pela ajuda e também pela parceria nos momentos de convívio.

A minha orientadora, professora Denise Calisto Bongalardo, pela orientação, confiança e apoio durante a realização deste trabalho, agradeço a oportunidade.

Aos meus co-orientadores, Fernando Rutz e Marcos Anciuti, pela disponibilidade e atenção sempre que solicitados.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pelo conhecimento transmitido, contribuindo para minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de crescimento acadêmico.

Aos estagiários, que participaram da realização deste trabalho.

Ao CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para a realização do mestrado

E a todos, que de alguma forma, ajudaram na realização deste sonho.

***“Não ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os
outros foram.”***

GRAHAN BELL

Resumo geral

Ferraz, Alexander. **Efeito de dietas contendo diferentes fontes de lipídios sobre a capacidade de penetração espermática de galos semi pesados**. 2015. 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A adição de lipídios, fontes de ômega 3, à dieta, pode elevar o percentual de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na membrana plasmática dos espermatozoides, podendo, com isso, aumentar a capacidade deste reagir com a membrana perivitelina do ovo, e assim, aumentar a capacidade de fertilização. Através do teste de penetração espermática é possível avaliar a interação do espermatozoide com a membrana perivitelina do ovo, que se reflete no número de furos formados na membrana. Este experimento teve como objetivo, avaliar, através do teste de penetração espermática, o desempenho reprodutivo de galos semi pesados, alimentados com diferentes fontes de lipídios. Foi utilizado um total de 20 galos, com idade de 37 semanas, alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos e 6 repetições, os tratamentos utilizados foram: T1- controle; T2-adição de 4% de óleo de milho; T3- adição de 4% de óleo de peixe e T4- adição de 4% de óleo de linhaça. Os tratamentos que obtiveram médias maiores foram T3 e T4, com 213 e 210 furos respectivamente, as menores médias foram as dos T1 e T2 com respectivamente 128 e 138 furos na membrana perivitelina. Os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si utilizando um nível de significância de 5%, pois o valor de ($p>0,05$).

Palavras chave: ácidos graxos poli-insaturados, espermatozoides, fertilidade, membrana celular.

Abstract

Ferraz, Alexander. **Effect of diets with different lipid sources in the ability of rooster sperm to penetrate the egg**. 2015. 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The addition of lipids, omega 3 sources, to diet, can raise the percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the cell membrane of the sperm and it increases his ability to react with the perivitellina egg membrane, and thus, increase the ability of fertilization. Through the sperm penetration test is possible to assess the interaction of the sperm with the egg perivitellina membrane, that is reflected in the number of holes formed in the membrane. This experiment aimed to, evaluate, through the sperm penetration test, the reproductive performance of roosters medium weight, fed with different sources of lipids. We used a total of 20 cocks, with age of 37 weeks, fed with diets containing different sources of lipids. The experimental arrangement was completely at random, with 4 treatments and 6 repetitions, the treatments used were: T1- Control; T2- addition of 4% corn oil; T3- addition of 4% fish oil and T4- addition 4% flaxseed oil. The treatments they obtained higher averages were T3 and T4, with 213 and 210 respectively holes, not statistically different among themselves (5%), the lowest averages were those of T1 and T2 respectively with 128 and 138 holes in the membrane perivitellina. The treatments did not differ statistically between themselves using a significance level of 5%, because the value of $p > 0.05$.

Key words: fatty acids polyinsaturates, fertility, sperm, celular membrane.

Lista de tabelas

Tabela 1	Composição percentual e calculada das dietas experimentais para galos alimentados com diferentes fontes de lipídios.....	32
Tabela 2	percentual dos diferentes tipos de ácidos graxos nas amostras de ração.....	33
Tabela 3	Média de furos (furos/mm ²) na membrana perivitelina interna do ovo (\pm erro padrão) de galinha, penetrada por espermatozóide de galos alimentados com diferentes fontes de lipídios.....	38

Lista de Figuras

Figura 1	Bioconversão de ALN e AL, em EPA, DHA e AA pelas enzimas elongases e Dessaturases.....	17
Figura 2	Anatomia sistema reprodutor do galo.....	26
Figura 3	Galos semi-pesados alojados em gaiolas metálicas individuais, com bebedouro tipo nipple e comedouro individual tipo calha	31
Figura 4	Contenção e massagem dorso abdominal para coleta de sêmen	34
Figura 5	Coleta de sêmen com tubo graduado.....	35
Figura 6	Membrana perivitelina interna de ovo de galinha, corada com eosina-nigrosina para realização do teste de penetração espermática.....	36
Figura 7	Média de furos (furos/mm ²) na membrana perivitelina interna do ovo (IPVL) de galinha, penetrada por espermatozóide de galo.	39

Lista de abreviaturas e siglas

PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
$\Omega 3$	Ácidos graxos da série ômega 3
$\Omega 6$	Ácidos graxos da série ômega 6
$\Omega 7$	Ácidos graxos da série ômega 7
$\Omega 9$	Ácidos graxos da série ômega 9
ALA	Ácido α linolénico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
DHA	Ácido docosahexaenóico
LA	Ácido linoleico
AA	Ácido araquidônico
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
IPVL	Membrana perivitelina interna
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_2^-	Radical superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
GnRh	Hormônio liberador das gonadotrofinas
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivos	15
3 Revisão Bibliográfica	16
3.1 Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3- Bioquímica, estrutura e metabolismo.....	16
3.2 Fontes de ácidos graxos.....	18
3.3 Óleo de peixe.....	18
3.4 Óleo de linhaça.....	19
3.5 Óleo de soja e milho.....	19
3.6 Ácidos graxos essenciais e a membrana celular.....	20
3.7 Estresse oxidativo.....	22
3.7.1 Radicais livres e espécies reativas ao oxigênio (EROS).....	23
3.7.2 Peroxidação lipídica.....	23
3.8 Ácidos graxos essenciais no desempenho reprodutivo.....	24
3.9 Fisiologia reprodutiva do galo.....	26
3.10Regulação hormonal da reprodução.....	28
4. Material e métodos	30
4.1. Local e período experimental.....	30
4.2. Animais, instalações e manejo.....	30
4.3. Dietas experimentais e manejo alimentar.....	31
4.4. Análise bromatológica das dietas.....	33
4.4.1 Extração de lipídios das amostras de ração.....	33
4.5. Delineamento Experimental e análise estatística.....	34
4.6. Coleta e análise de sêmen.....	36
4.7. Congelamento e descongelamento do sêmen.....	36
5 Resultado e discussão	38
5.1 Teste de penetração espermática.....	38
6. Conclusão	41
Referencias	42
Anexo	51

1. Introdução

A avicultura brasileira destaca-se no mercado internacional de carnes. Ocupa desde 2011 a liderança na exportação de carne de frango e a terceira posição em produção mundial desse produto. De acordo com dados da União Brasileira de Avicultura – UBABEF (2014) em 2013, o Brasil foi o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, produzindo um total de 12,3 milhões de toneladas de carne de frango, ficando atrás apenas dos EUA, que possui uma produção de 16,6 milhões de toneladas, se destacando como o maior produtor mundial do produto, e a China com uma produção de 13,5 milhões de toneladas, segundo maior produtor. A região sul é a maior produtora de carne de frango do Brasil, sendo responsável por 62,34% do total, RS (14,56%) SC (16,66%) e PR (31,12%).

Mas é necessário que o mercado esteja em constante evolução, e para isso é preciso estar sempre buscando novas maneiras de melhorar a reprodução e conseqüentemente aumentar a produção, algumas das formas de alcançar este objetivo são através do melhoramento genético, alimentação, instalações apropriadas que proporcionem uma boa climatização dos galpões, manejo, entre outras (MAPA, 2012; OLIVEIRA & NÄÄS, 2012).

Dentre as diferentes maneiras de conseguir melhorar a reprodução das aves, a nutrição merece destaque, pois a dieta influencia na produção de espermatozoides e na fertilidade, tanto na fase de crescimento, como na de produção.

Os lipídios são nutrientes que exercem efeitos benéficos sobre os espermatozóides (KELSO, 1997). Possuem função energética e são componentes celulares de membranas biológicas (GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

Os principais componentes lipídicos dos espermatozóides são os fosfolipídios, que possuem em seu interior elevados teores de ácidos graxos poliinsaturados da série ômega 3 (PUFAs) e são considerados como principal substrato energético para os espermatozóides (SCOTT, 1973). Estes fosfolipídeos com ácidos graxos estão correlacionados com a fertilidade e motilidade espermática, Cerolini et al. (1997) e a presença de lipídios no acrossoma parece ter relação com a penetração do espermatozóide no gameta feminino (HAFEZ, 2004).

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e ômega 6 são essenciais, uma vez que não são sintetizados pelos animais, precisando ser fornecidos pela ração

(GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Os órgãos reprodutivos masculinos dependem dos ácidos graxos essenciais da dieta, e sua suplementação melhora a fertilidade, pois altera a constituição dos fosfolípidos da membrana dos espermatozoides.

Porém, os ácidos graxos poliinsaturados, naturalmente se oxidam pela ação dos radicais livres que se formam através do metabolismo aeróbico, e como os espermatozoides são ricos em PUFAs, se tornam suscetíveis a peroxidação, podendo ocasionar lesões nas células e membranas (SURAI, 2006). E como os espermatozoides não conseguem fazer reparos, quando há alterações irreversíveis, a função do espermatozoide fica alterada (HAMMERSTEDT, 1993).

Os radicais livres são neutralizados no organismo pela ação dos antioxidantes, que podem ser suplementados na dieta através de substâncias como a vitamina E ou através do Selênio que é um precursor de enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase (SURAI et al., 2001; REIS, et al., 2009). Esta proteção contra a peroxidação dos lipídeos, resulta em aumento nos níveis de ácidos graxos poliinsaturados nos espermatozoides, podendo desta forma melhorar a motilidade e a fertilidade.

Modificações no perfil lipídico do espermatozoide também podem melhorar sua habilidade em sobreviver ao processo de criopreservação, por alterarem a fluidez da membrana. O congelamento de sêmen é de interesse prático para a indústria de aves (BLESBOIS e GRASSEAU, 1998), porém esse processo causa danos à integridade estrutural, bioquímica e biofísica da membrana plasmática do espermatozoide. Foi observado que os fosfolípidos fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, predominantes no sêmen fresco de aves, diminuem drasticamente em resposta à criopreservação, concomitantemente com diminuição da motilidade espermática e da fertilidade (BLESBOIS et al., 1997). A adição de óleo de peixe na dieta, com posterior incorporação de ácidos graxos na membrana espermática, poderá melhorar substancialmente a congelabilidade do sêmen.

A Fertilidade é uma das características de maior importância econômica em aves de produção, mas nos últimos anos ela vem sofrendo uma queda, e a falta de atenção ao macho pode ser uma das causas (CELEGHINI et al., 2001).

Os galos, muitas vezes deixados de lado em relação às fêmeas, são de extrema importância na fertilidade do plantel, pois contribuem com 50% da carga genética e são capazes de fertilizar 10 ou mais galinhas (SMITH, 1986). São

considerados até mais importantes que as fêmeas, pois são capazes de gerar uma progênie muito maior do que as fêmeas (HAMMERSTEDT, 1999).

A avaliação da fertilidade dos machos é de extrema importância, pois através dela, podemos conseguir maior percentual de ovos férteis (SOARES; BELETTI, 2006) e conseqüentemente maior número de pintos, que é o objetivo da avicultura.

A avaliação das características seminais é o melhor método para mensurar a capacidade reprodutiva do galo, e esta característica tem uma relação direta com a fertilidade dos ovos (WISHART, et al, 1986.; CHAUDHURI, et al, 1988). Permite também melhorar a performance reprodutiva do plantel, pois possibilita a identificação e descarte dos machos inférteis ou subférteis (DONOGHUE, 1999).

Sabendo-se que ocorre modificação lipídica da membrana do espermatozóide através dos lipídios oriundos da dieta, objetiva-se saber com este trabalho se esta modificação irá se refletir na prática (in vivo), ou seja, na obtenção de maior fertilidade após inseminação artificial com sêmen fresco e congelado. O aumento da fertilidade irá refletir diretamente na produtividade do plantel (maior produção de pintinhos), diminuindo os custos de produção.

Bongalhardo (2002) verificou que ocorreram mudanças no conteúdo lipídico das membranas do espermatozóide de galos de acordo com a fonte de lipídio da dieta ministrada às aves. Estas modificações na membrana não promoveram diferenças na qualidade do sêmen, quando avaliado através da motilidade, viabilidade, volume, concentração e número total de espermatozoides. Entretanto, a autora atesta que a modificação de lipídios da membrana pode ter afetado a habilidade do espermatozóide em entrar e ser estocado nas glândulas hospedeiras de espermatozóide da fêmea, e/ou a sua habilidade em aderir-se na membrana e penetrar o ovo. Por conseguinte, a presente dissertação tem por objetivo complementar o trabalho de Bongalhardo, através da obtenção de dados de capacidade de penetração espermática na membrana perivitelina interna do ovo.

2. Objetivos

1) Comparar os resultados do teste de penetração espermática de galos submetidos a dietas com diferentes fontes de lipídios.

3- Revisão Bibliográfica

3.1 Ácidos graxos poli-insaturados- Bioquímica, estrutura e metabolismo

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos obtidos, geralmente, da hidrólise de gorduras e óleos naturais. A estrutura química de um ácido graxo é dada pelo número: (1) de átomos de carbono na cadeia, (2) de duplas ligações e (3) número ômega (ω), que indica a posição da primeira dupla-ligação a partir do grupo metila, por exemplo, no caso da série ω_3 a primeira dupla-ligação ocorre entre o terceiro e quarto carbono, e na série ω_6 ocorre entre o sexto e sétimo carbono. Os ácidos graxos que possuem o mesmo número ômega, pertencem à mesma série. Os ácidos graxos linoléico e α -linolênico (séries ω_6 e ω_3 , respectivamente) são considerados essenciais por não serem sintetizados no organismo animal e, portanto, devem ser providos na ração (McDOWELL, 1989).

Os ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, respectivamente pela ausência ou presença de duplas ligações. A presença de duas ou mais duplas ligações caracteriza os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), enquanto que os monoinsaturados compreendem apenas uma dupla ligação (YAQOOB; CALDER, 2007).

Os principais representantes dos PUFAs ω_3 são o ácido α -linolênico (ALA 18:3n-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3). Por sua vez, os PUFAs ω_6 são sobretudo representados pelo ácido linoléico (LA 18:2n-6) e pelo ácido araquidônico (AA 20:4n-6).

Os PUFAs são componentes estruturais significativos dos fosfolípidos das membranas celulares, e as suas propriedades físicas influenciam fortemente a fluidez e flexibilidade das membranas biológicas que incorporam (MURRAY, et al, 2003).

Os ácidos graxos de uma mesma série podem ser metabolicamente convertidos em outros ácidos graxos que possuem número maior de carbonos por meio de processos de alongação e dessaturação de suas cadeias (fig.1). Por exemplo, o ácido araquidônico pode ser sintetizado a partir do ácido linoléico (C18:2) e o ácido linolênico (C18:3) é precursor dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, entre os quais possivelmente exista interconversão. As enzimas

que intervêm nesse processo são as mesmas, havendo por isso, uma competição no metabolismo das duas séries. (CEPERO BRIZ, 1998). Portanto, um excesso de ômega 6 na ração, por exemplo, limita a formação dos ômega 3. Isto ocorre na dieta dos ocidentais (mais ainda entre os vegetarianos) pois a relação de ácidos graxos $w6:w3$ geralmente está entre 20 e 30 (FARREL, 1996). As dessaturases animais (D-6 dessaturase e D-5 dessaturase) têm maior afinidade pela série $\omega3$, seguida da $\omega6$ e, por último, pela $\omega9$ (NUNES, 1995).

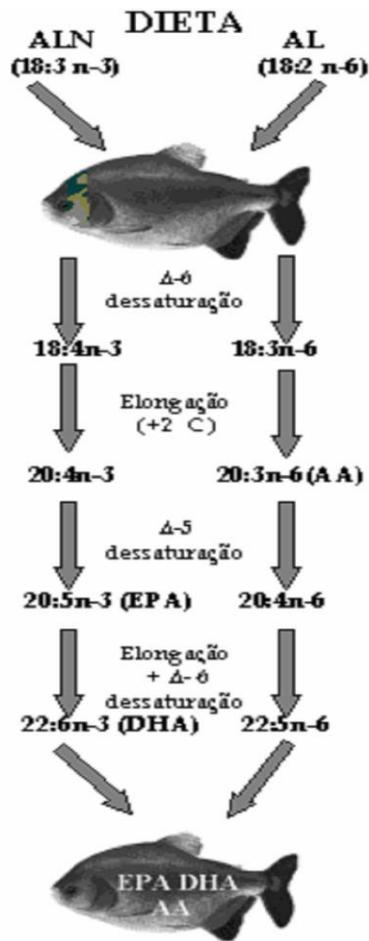


Fig.1 Bioconversão de ALN e AL, em EPA, DHA e AA pelas enzimas elongases e Dessaturases.

3.2 Fontes de ácidos graxos poli-insaturados

Os ácidos graxos comumente consumidos na dieta são classificados em quatro famílias/séries: ômega 9 (ω -9), ômega 7 (ω -7), ômega 6 (ω -6) e ômega 3 (ω -3) sendo que são considerados essenciais apenas as séries ômega 6 e ômega 3. São os mais importantes no balanço dietético, (GARÓFOLO e PETRILLI, 2006).

O ácido linoleico, representante da série ω 6, pode ser encontrado em abundância nos óleos vegetais alimentícios, como milho, girassol, soja, canola, algodão e amendoim. O ácido araquidônico é encontrado em pequena quantidade na gordura animal (WHITTEMORE, 1993). Enquanto o ácido alfa Linolenico, da série ômega 3 é encontrado em concentrações elevadas na semente de linho (*Linum usitatissimum*), a qual apresenta 32 a 38% de óleo e teores percentuais de linolenico que variam de 44,6 a 51,5% do total dos ácidos graxos (CARTER, 1993). Entre os mais citados está o óleo de linhaça (50-55% de alfa linolenico) para aves de postura, sendo necessário um mínimo de 2% de óleo de linhaça para aumentar significativamente a concentração de alfa linolenico nos lipídeos da gema.

Em relação aos ácidos graxos polinsaturados da série ω 3 (eicosapentaenóico-EPA e docosahexaenóico-DHA), as fontes mais significativas são os peixes, particularmente as espécies marinhas encontradas em água frias e profundas, tais como, cavala, salmão, arenque, truta, bacalhau e sardinha, dentre outros (III DIRETRIZES BRASILEIRAS SOBRE DISLIPIDEMIASE, 2001).

No organismo, através de reações de alongamento e dessaturação, os ácidos graxos linoleico (18:2n-6) e alfa linolenico (18:3n-3) adquirem novas duplas ligações e sofrem alongamento de cadeia, dando origem outros ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido araquidônico (AA20:4n-6), e o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3), respectivamente (DOMMELS et al., 2002).

3.3 Óleo de peixe

O alto conteúdo de EPA e DHA, no pescado, é consequência do consumo de fitoplâncton, que é, por excelência, rico em ácidos graxos poliinsaturados da série ômega 3, sendo que seu conteúdo varia em função da sua disponibilidade, localização e estação do ano (CARRERO et al., 2005).

Cabe ressaltar que os teores de ácidos graxos ω_3 encontrados nos peixes dependem também, em grande parte, da profundidade e da temperatura da água onde são encontrados. Existe uma escassez de informações referentes aos níveis de ácidos graxos da série ω_3 , principalmente EPA e DHA, encontrados nas diferentes espécies de peixes da costa marinha brasileira. Visentainer et al. (2000) encontraram que nestes peixes, os teores tanto de EPA quanto de DHA, foram sempre maiores no olho, quando comparados ao filé. Assim, o consumo de ω_3 ainda é mais restrito, uma vez que o olho, juntamente com a cabeça do peixe é comumente descartado.

3.4 Óleo de Linhaça

O óleo de linhaça é extraído das sementes de linho por compressão a frio, fato que preserva sua atividade funcional. Com energia bruta de 9560 kcal.Kg, o óleo de linhaça é muito utilizado na formulação de dietas para peixes (Santos et al., 2005). É a principal fonte de ácido alfa-linolênico (ALA) fonte de ω_3 , ácido linoléico (ω_6), vitamina E e fitoestrógeno (GALVÃO, 2009). O ácido alfa-linoléico 18:3 n-3 representa de 44,6 a 51,5% do total de ácidos graxos (VISENTAINER, et al. 2005).

O óleo de linhaça vem sendo estudado em diversas pesquisas com poedeiras e frangos de corte, por ser um produto que contém altas proporções de ácido linoléico e, assim sendo, uma excelente fonte de ω_3 (ZAMBIASI, et al., 2007).

Kelso et al (1997) realizaram um experimento com galos da linhagem Cobb, alimentados com uma dieta contendo 6% de óleo de linhaça, rico em ácido linoléico, a partir da 23ª até a 72ª semana de idade. Foi observado um aumento significativo na concentração dos espermatozoides desde a 24ª até a 39ª semana de idade e houve um decréscimo significativo entre a 54ª e 72ª semana. A fertilidade máxima ocorreu na 39ª semana, alcançando 96,6%.

3.5 Óleo de milho e soja

Cerca de 85% da colheita mundial de soja é processada para produzir o óleo e os resíduos da extração, torta, no caso da prensagem, farelo, no caso de extração por solvente, usados na preparação de rações para animais; de 4% a 5% desses

resíduos da extração do óleo são reprocessados em farinhas e proteínas para uso alimentício.

A soja (*Glycine max* L.) é a oleaginosa mais cultivada no Brasil, que ocupa a 2ª posição do ranking mundial da produção, perdendo apenas para os Estados Unidos (IBGE, 2013).

A vantagem do óleo de soja em relação a outros se deve ao seu baixo preço aliado à sua boa qualidade (EMBRAPA, 2013).

O óleo de soja é composto por gordura vegetal, possuindo em sua constituição ácidos graxos poliinsaturados (ácido linolênico e linoleico), monoinsaturados (ácido oléico) e saturados (ácido palmítico e esteárico), correspondendo 61%, 25% e 15% respectivamente. Do percentual dos PUFAs, o linoleico ($\Omega 6$) equivale a 54%, enquanto o linolênico ($\Omega 3$) representa cerca de 7% (MOREIRA, 2008).

Além de exercer outras funções biológicas, o óleo de soja é fonte de ácidos graxos essenciais, linoléico (18:2n-6, LA) e alfa-linolênico (18:3n-3, LNA). A partir destes ácidos são sintetizados os ácidos: araquidônico (20:4n-6, AA), eicosapentanóico (20:5n-3, EPA) e docosahexanóico (22:6n-3, DHA), que dão origem aos eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos), compostos que desencadeiam ampla faixa de respostas fisiológicas (Youdim, Martin e Joseph, 2000).

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados por todo o mundo. Originou-se nas Américas e logo foi difundido pela Europa, África e Ásia. Atualmente, o maior produtor mundial é os Estados Unidos. No Brasil, o milho é o cereal mais cultivado depois da soja (IBGE, 2015).

Os principais ácidos graxos que compõem o óleo de milho são o linoléico (até 62%) e oléico (até 42%). O ácido linolênico ($\Omega 3$) é altamente sujeito à oxidação e está presente em pequena percentagem neste óleo (<2%), quando comparado ao de soja (RODRIGUES et al., 2003).

3.6 Ácidos graxos essenciais e a membrana celular

As membranas celulares são essenciais para a vida da célula. A membrana plasmática define a célula, seus limites e mantém as diferenças entre o citoplasma e o meio extracelular (ALBERTS et al., 1994).

Diversas funções da membrana celular são dependentes da composição lipídica. Assim, a ingestão de gordura através da dieta pode modificar a composição e a atividade bioquímica das membranas celulares (MORGADO et al, 1998)

Todas as células (procariontes ou eucariontes) são circundadas por uma membrana plasmática que define a sua delimitação, separando seu conteúdo do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, a membrana plasmática determina a composição do citoplasma celular (COOPER,1996), e tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (SINGER e NICOLSON ,1972).

O modelo básico das membranas biológicas segue a organização estrutural de bicamada de lipídios com proteínas associadas (GENNIS, 1989; COOPER, 1996). Os principais lipídios presentes nesta estrutura celular são fosfolipídios (colina, serina, glicerol e inositol), glicolipídios e colesterol. Os fosfolipídios são constituintes de 50% da massa das membranas plasmáticas, sendo responsáveis por cerca de 60 a 70% dos lipídios totais de um ejaculado (WATSON, 1981).

Todas as moléculas lipídicas das membranas celulares são anfipáticas ou anfifílicas, isto é, têm uma extremidade hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (não polar), (FLESCH & GADELLA, 2000).

Os fosfolipídios estão em um arranjo lamelar que organiza a cadeia de ácido graxo em uma barreira hidrofóbica, prevenindo a entrada de água ou outras moléculas. À temperatura corporal, a membrana plasmática está no estado fluído e o arranjo lamelar permite aos fosfolipídios se moverem livremente ao longo da bicamada (AMANN e PICKETT, 1987; AMANN e GRAHAM,1993). Como a temperatura das células diminui, durante um processo de resfriamento, a membrana passa por uma fase de transição do estado líquido para o estado cristalino.

Os lipídios insaturados são predominantes na membrana plasmática dos espermatozoides, conferindo a ela uma consistência fluida (WOLFE et al., 1998).

A relação colesterol/fosfolipídios é responsável pela fluidez da membrana (DARIN-BENNET et al., 1977). Regiões da membrana com alto teor de colesterol são menos fluídas que porções com maior proporção de fosfolipídios (AMANN e PICKETT, 1987). Darin-Bennett et al. (1977) verificaram que espécies com maior concentração de colesterol, como o homem e os coelhos, apresentam menor dano causado à membrana durante o processo de resfriamento.

Segundo Sion et al (2001), o colesterol apresenta uma função importante sobre a capacidade fecundante do espermatozoide, tendo ação na estabilização dos lipídios da membrana.

Os ácidos graxos essenciais de cadeia longa no testículo são de grande importância, visto que, há evidências de seu papel importante na integridade das membranas testiculares (STUBBS e SMITH, 1984).

A membrana plasmática apresenta um importante papel nos processos de capacitação e fertilização do oócito e sua constituição bioquímica é um dos principais pontos de interesse do estudo da fisiologia e patologia espermática. Teorias sobre a fusão de membranas (oócitos/espermatozoides) sugerem que sua fluidez é pré-requisito para a função normal da célula (BARROS, 2007).

3.7 Estresse oxidativo

O oxigênio é uma molécula essencial as plantas e aos animais, é utilizado em diversas reações fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução celular, no entanto, mais de 95% do oxigênio consumido é direcionado para a respiração celular. Mas ele também pode ser potencialmente tóxico às células, de modo que em certas condições, o oxigênio pode reagir com determinadas moléculas e culminar na formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs), dentre elas, estão os radicais livres.

Na mitocôndria, durante a respiração aeróbia, ocorre a redução completa do oxigênio à água, acompanhada de uma alta liberação de energia vital para a célula. Porém, estima-se que aproximadamente 3% do oxigênio consumido tenha sua redução incompleta, formando as espécies reativas do oxigênio (EROs) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Segundo os mesmos autores, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo e pode ser observada em diversas condições fisiológicas.

A produção de EROs pelo espermatozoide é um processo fisiológico, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozoide/oócito (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1993).

O estresse oxidativo é caracterizado como um distúrbio no estado de equilíbrio dos sistemas pró-oxidantes/antioxidantes em células intactas. Quando

ocorrem eventos oxidativos ocasionais, os sistemas pró-oxidantes podem aumentar com relação aos antioxidantes, resultando em danos oxidativos (SIES, STAHL e SEVANI, 2005). A produção de ROS em excesso parece estar envolvida com os danos causados à membrana plasmática e ao DNA dos espermatozoides (OCHSENDORF, 1999; CHATTERJEE e GAGNON, 2001), resultando em perda da motilidade espermática e indução de apoptoses, devido à lipoperoxidação (SHARMA e AGARWAL, 1996).

Para combater a formação destas espécies o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante, mantendo assim a homeostase celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

3.7.1 Radicais livres e espécies reativas ao oxigênio (EROS)

Um radical livre é definido como qualquer espécie química capaz de ter existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN e POWLS, 1998).

O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas (EROs), que incluem radicais livres e espécies não radicalares. Quando o oxigênio no estado fundamental absorve energia, forma uma espécie eletronicamente excitada chamada oxigênio singleto (1O_2). Na redução unieletrônica do oxigênio à água, ocorre a formação do radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH). Estas EROs podem interagir e lesar diversas estruturas celulares (RICHARD et al., 1991, ABDALLA, 1993).

3.7.2 Peroxidação lipídica

A lipoperoxidação é um processo de oxidação de lipídios polinsaturados. Membranas e organelas celulares (mitocôndria, lisossomos e peroxissomos) contêm grande quantidade de lipídios polinsaturados, os quais juntamente com as proteínas compõem os maiores constituintes biológicos das membranas (URSO e CLARKSON, 2003).

A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol e danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. O ataque de algumas espécies reativas que abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos

poliinsaturados, inicia o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 1991).

A peroxidação lipídica causa alterações estruturais nas bicamadas lipídicas, desestabilização nas membranas biológicas e perda de função de barreira entre o meio intra e extracelular, colocando em risco a integridade de organelas e da própria célula (KÜHN, 2002).

3.8 Ácidos graxos essenciais no desempenho reprodutivo

A composição da dieta é um dos principais determinantes do conteúdo de ácidos graxos da célula espermática (SURAI *et al.*, 2000), sendo que os lipídios fornecidos na alimentação podem modificar ácidos graxos específicos na membrana plasmática do espermatozóide (KELSO *et al.*, 1997; BONGALHARDO *et al.*, 2009), afetando a estrutura e a fluidez da membrana. Essas modificações podem efetivamente mudar as taxas de fertilidade através da alteração da motilidade e viabilidade do espermatozóide, da sua habilidade em interagir com o trato reprodutivo da fêmea (especialmente com as glândulas hospedeiras) ou de ligar-se com o ovo (BLESBOIS *et al.*, 1997).

De modo geral, o conteúdo de lipídios em espermatozoides maduros é de aproximadamente 6 a 7% do peso seco da célula. Embora exista diferença considerável entre as espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (em base molar) (FLESH e GADELLA, 2000). Os fosfolipídios são as principais fontes de substrato energético, a partir da oxidação dos lipídios intracelulares, para a respiração do espermatozoide. Assim, a capacidade de espermatozoide em sintetizar estes lipídios a partir de substratos externos deve aumentar sua taxa de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea, (SCOTT, 1973).

Em perus, verificou-se aumento da fertilidade quando o óleo de milho da ração foi substituído por óleo de peixe (CHRISTENSEN *et al.*, 1998). Em galos, observou-se que tanto a presença de óleo de salmão na dieta (BLESBOIS *et al.*, 1997) quanto a suplementação com ácido linolênico (18:3n-3), aumentaram significativamente a fertilidade (KELSO *et al.*, 1997). Embora a quantidade total de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) no óleo de milho seja maior do que no óleo de salmão, o óleo de milho contém uma maior proporção de ácido linoleico (18:2n-

6), enquanto o óleo de salmão contém ácidos graxos de cadeia longa da série n-3 (BLESBOIS et al., 1997), principalmente 20:5n-3 (EPA – ácido eicosapentaenóico) e 22:6n-3 (DHA – ácido docosahexaenóico) (SARGENT e HENDERSON, 1995; KELSO *et al.*, 1997; SURAI *et al.*, 2000). Estes últimos são os principais responsáveis pelos efeitos benéficos do óleo de peixe, especialmente o DHA. Os teores de n-3 no óleo variam de acordo com o tipo de peixe, sendo que aqueles de água marinha profunda, como sardinha, anchova, atum e salmão (IGARASHI *et al.*, 2002), apresentam grandes quantidades destes PUFAs.

No que se refere às dietas ricas em ω_3 , o principal ácido envolvido, o docosahexaenóico, está relacionado com a integridade de membrana plasmática e motilidade espermática (ROBINSON et al., 2006).

A membrana plasmática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e na manutenção da sua capacidade fertilizante, visto que, garante a homeostase celular, sendo essencial para manter a sua viabilidade (CELEGUINI, 2005)

Pelo fato de apresentarem naturalmente um grande conteúdo de PUFAs, os espermatozoides dos galos tornam-se altamente suscetíveis à oxidação (SURAI, 2002). A peroxidação lipídica gera radicais livres, que produzem danos na membrana espermática e também no metabolismo celular, comprometendo a capacidade de fertilização (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 1999).

Para combater a peroxidação, o espermatozóide possui um sistema de defesa antioxidante, composto principalmente pelas vitaminas C e E (ácido ascórbico e alfa-tocoferol, respectivamente) e pelas enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e redutase (AITKEN, 1995). Este sistema de defesa é responsável pela manutenção das funções biológicas dos espermatozoides em várias condições de estresse, incluindo a diluição, o armazenamento e o congelamento do sêmen (SURAI *et al.*, 2001).

A suplementação com antioxidantes não foi o objetivo deste experimento, mas vale ressaltar que a adição de antioxidantes na dieta pode ser benéfica à fertilidade, pois é sabido que os PUFAs sofrem oxidação, por isso, dietas contendo óleos ricos nestes ácidos graxos estariam mais suscetíveis a peroxidação lipídica.

3.9 Fisiologia reprodutiva do macho

O aparelho reprodutor dos machos das aves é formado pelos testículos, via seminífera extratesticular (epidídimos e ductos deferentes) e aparelho copulatório (GETTY, 1981) (Fig.2). As aves não apresentam glândulas anexas, como próstata, vesícula seminal e glândulas bulbouretrais, o que explica o baixo volume seminal da espécie (PARKHURST e MOUNTNEY, 1988).

A região do epidídimo consiste em túbulos eferentes que transportam o esperma desde o testículo até o ducto epididimário, que é visível na superfície do epidídimo. De cada epidídimo emerge o ducto deferente, que segue em direção posterior e termina na cloaca. Logo antes do seu término, o ducto deferente apresenta uma dilatação que funciona como local para armazenamento de espermatozoides. Cada vaso deferente penetra numa pequena papila e ejeta o sêmen na cloaca (BURKE, 1996). O macho não tem pênis, mas sim um falo erétil (HAFEZ, 1988). O falo é o órgão copulatório rudimentar do galo, é pequeno e não funciona como órgão para penetração. O sêmen é transferido para a fêmea pelo contato do falo rudimentar e a vagina evertida da fêmea (BURKE, 1996).

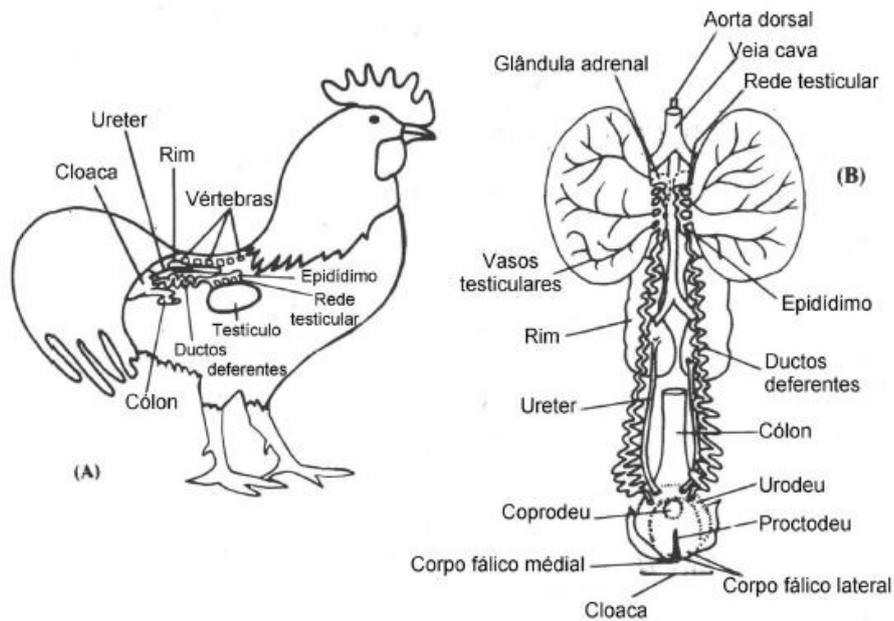


Fig2: anatomia sistema reprodutivo do galo
Fonte: engormix

Nos machos das espécies avícolas, os testículos tem a função dupla de produzir espermatozoides (espermatogênese) e produzir e secretar hormônios esteróides. Os hormônios reprodutivos produzidos pelos testículos são principalmente os andrógenos, sendo a testosterona o mais importante (SESTI; ITO, 2000). Diferentemente dos mamíferos, os testículos das aves estão localizados na cavidade abdominal, abaixo dos rins e paralelos a coluna vertebral (GETTY, 1981). Devido a sua localização intra-abdominal, a espermatogênese ocorre à temperatura corporal (41°C), fenômeno impossível para a maioria dos mamíferos, que precisam de temperaturas mais baixas para que ela ocorra (BURKE, 1996).

Ao contrário das fêmeas, que somente o ovário esquerdo é funcional, nos machos, ambos os testículos são funcionais, sendo o esquerdo um pouco maior e mais pesado que o direito (ETCHES, 1996).

O desenvolvimento testicular do galo é caracterizado por três fases. A primeira fase é denominada pré-puberal (1 dia de idade a 10/12 semanas) quando ocorre um grande aumento do peso dos testículos, que passam dos 3 mg, ao primeiro dia, a 500 mg com 10 a 12 semanas de idade. Há intensa multiplicação das células de Sertoli. A segunda, chamada fase puberal (12 a 22/24 semanas), caracteriza-se pelo aparecimento dos primeiros espermatozoides nos tecidos, cujo peso aumenta muito rapidamente, de forma exponencial, até alcançar 25 a 30 g, com 22/24 semanas de idade. A terceira fase ou fase adulta, o peso dos testículos permanecem praticamente o mesmo de 24 até 39 semanas, começando então, a decrescer a partir das 40 semanas de idade (ADJANOHOUN, 1994).

A produção de espermatozoides no galo atinge seu máximo entre 24 e 30 semanas de idade, mantêm-se elevada até 40-45 semanas de idade e decresce a partir dessa idade (BRILLARD e MCDANIEL, 1985; ROSENSTRAUCH; EGEN; FRIEDLÄNDER, 1994). A queda de fertilidade com a idade é variável de um macho para outro, e será retardada ou acelerada por diferentes fatores ambientais e de manejo.

Segundo Etches (1996), o número de células de Sertoli presente nos testículos é proporcional ao tamanho e peso dos mesmos e, por isso, a produção diária de sêmen varia com o tamanho testicular. Existe uma correlação direta entre tamanho de testículo e produção de sêmen. Em geral, machos reprodutores de frangos de corte produzem mais sêmen que aqueles reprodutores de poedeiras

Um sêmen de boa qualidade deve apresentar um número de células vivas com morfologia normal maior ou igual a 90% e motilidade espermática maior ou igual a 80%, um percentual menor do que este pode acarretar em queda da fertilidade (BAKST e LONG, 2010).

Após a cópula ou inseminação artificial, a motilidade e a capacidade de sobrevivência no ambiente vaginal são importantes para que o espermatozoide consiga ascender em direção a junção uterovagina, onde serão armazenados nas glândulas hospedeiras de espermatozoides (criptas e que armazenam espermatozoides durante um longo período) (KING et al., 2002). Este armazenamento aumenta a probabilidade de fertilização. Após ser liberado das glândulas hospedeiras de espermatozoides e deslocarem-se para o infundíbulo, os espermatozoides devem ser capazes de se ligar e penetrar na membrana perivitelínica (camada simples não celular que envolve o óvulo) e fertilizar o óvulo (RUTZ et al., 2007). Espermatozoides armazenados neste local podem permanecer viáveis por períodos de até 32 dias, sendo que em peruas, este tempo pode chegar a 70 dias (HAFEZ, 2004).

Esta prolongada sobrevivência do espermatozoide no oviduto das aves, possibilita a postura de ovos galados por período maior (BIRKEAD e MOLLER, 1992).

3.10 Regulação hormonal da reprodução

As gônadas das aves produzem hormônios esteróides que atuam em todo o organismo, promovendo o desenvolvimento do sistema dos ductos reprodutivos, apêndices de cabeça (crista e barbelas), penas, emissão de sons, composição do sangue e comportamento. O esteróide testicular predominante é a testosterona, enquanto o ovário secreta estrogênio, progesterona e testosterona (Burke, 1996).

O responsável pela regulação hormonal da reprodução é o hipotálamo. Através do eixo hipotálamo-hipofisário gonadal, o hipotálamo liga o sistema nervoso central ao sistema endócrino, coordenando as gônadas. O hipotálamo secreta o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRh), este é transportado até a hipófise anterior, que responde ao estímulo do GnRh, produzindo o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) (Hafez, 2004).

Nos testículos, o LH age sobre as células de Leydig , estimulando a secreção de andrógenos, principalmente a testosterona. O FSH atua sobre as células de Sertoli, estimulando o crescimento, a diferenciação e a espermatogênese nos túbulos seminíferos (ETCHES, 1994).

4 Material e Métodos

4.1 Local e período experimental

O experimento teve duração de 10 semanas, sendo desenvolvido no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica Professor Renato Rodrigues Peixoto (LEEZO) do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). No Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves (LABRA), situado no departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPel, foram realizadas as análises laboratoriais do sêmen (teste de penetração espermática), além do congelamento e descongelamento.

A análise bromatológica das rações foi realizada no laboratório de nutrição animal (LNA) do departamento de zootecnia da Ufpel.

4.2 Animais, instalações e manejo

Foram utilizados 20 galos semi-pesados, da linhagem MM da Embrapa Suínos e Aves, com 37 semanas de idade, alojados em baias individuais (Fig.3). Os animais foram tratados diariamente, com fornecimento de ração e água individual à vontade. Os bebedouros utilizados foram do tipo nipple e os comedouros individuais tipo calha (Fig.3).

Todos os galos foram treinados anteriormente para a rotina da coleta de sêmen, que foi realizada duas vezes por semana pelo método de massagem dorso-abdominal proposta por Burrows e Quinn (1937). Antes das coletas experimentais, os animais foram submetidos a uma “toilette”, sendo cortadas as penas da região pericloacal com o auxílio de uma tesoura, para permitir uma melhor visualização da cloaca e do sêmen ejaculado, além de diminuir o acúmulo de contaminantes na região.



Fig.3. Galos semi-pesados alojados em gaiolas metálicas individuais, com bebedouro tipo nipple e comedouro individual tipo calha.

Fonte: LABRA/UFPEL

4.3 Dietas experimentais e manejo alimentar

Os 20 galos (5 por tratamento) foram alimentados com uma de quatro dietas: T1: controle (somente ração padrão); T2: (ração padrão + 4% de óleo de milho); T3: (ração padrão + 4% de óleo de peixe); T4: (ração padrão + 4% de óleo de linhaça).

As dietas experimentais foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais dos galos semi pesados, segundo Rostagno et al. (2011), à base de milho e farelo de soja e suplementadas com minerais e vitaminas, sendo isoenergéticas e isoprotéicas, diferindo entre elas pela adição de diferentes fontes de óleo, como indicado na tab.1. O fornecimento de ração, assim como o de água, foi à vontade e individual.

Tabela1 Composição percentual e calculada das dietas experimentais para galos alimentados com diferentes fontes de lipídios.

Ingredientes	Trat.1	Trat.2	Trat.3	Trat.4
	(controle)	(milho)	(peixe)	(linhaça)
	(%)	(%)	(%)	(%)
Milho	71,90	72,50	71,9505	71,00
F. Soja 45%	17,52	17,30	17,50	17,70
Nc 385 MT prod*	4,00	4,00	4,00	4,00
Óleo	4,00	4,00	4,00	4,00
Inerte	2,00	1,62	1,87	2,72
Sal comum	0,44	0,44	0,44	0,44
Metionina	0,14	0,14	0,23	0,14
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição nutricional				
Ácido fólico	1,08	1,08	1,08	1,08
Cálcio	1,04	1,04	1,04	1,04
Cloro	0,31	0,31	0,31	0,31
Energ.Met.Aves(kcal/kg)	2.800	2,800	2,800	2,800
Fosforo disponível	0,42	0,42	0,42	0,42
Lisina Dig.Aves	0,55	0,55	0,55	0,55
Met.+Cist.Dig.Aves	0,50	0,50	0,50	0,50
Metionina Dig.Aves	0,26	0,26	0,26	0,26
Proteína bruta	13,0	13,0	13,0	13,0
Sódio	0,20	0,20	0,20	0,20
Treonina Dig.Aves	0,47	0,47	0,47	0,47
Treonina total	0,55	0,55	0,55	0,55
Triptofano Dig.Aves	0,14	0,14	0,14	0,14

*Níveis de garantia por Kg do produto: Ácido nicotínico: 380mg; ácido pantotênico: 152mg; cálcio (mínimo): 244g; cálcio (máximo): 269g; cobre: 201mg; colina: 3250,0mg; ferro: 1170mg; flúor (máximo): 462,50mg; fósforo: 46,25g; iodo: 24,40mg; manganês: 1573mg; metionina: 13,60g; selênio: 7,0mg; sódio: 36,20g; fitase: 12500 FTU; vitamina A: 176000UI; vitamina B1: 25,50mg; vitamina B12: 152µg; vitamina B2: 57mg; vitamina B6: 31,50mg; vitamina D3: 42500UI; vitamina E: 131,00 UI; vitamina K3: 30mg; zinco: 1210mg.

4.4 Análise bromatológica das dietas

As dietas foram analisadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, para determinação de suas características bromatológicas. As amostras de ração de cada tratamento foram colocadas para secar em estufa (105°C) para determinação da matéria seca, por 16 horas; determinação de matéria mineral em mufla a 550°C por 5 horas; determinação de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para conversão de nitrogênio total em proteína bruta e determinação de extrato etéreo em extrator Soxhlet com éter de petróleo, segundo metodologia descrita por A.O.A.C. (2000).

4.4.1 Extração de lipídios das amostras de ração

A extração de lipídios das amostras foi realizada por cromatografia gasosa, de acordo com a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973) (Anexo1). Os resultados encontrados estão apresentados na tabela2.

Tabela2: percentual dos diferentes tipos de ácidos graxos nas amostras de ração

		Ração controle		Ração milho		Ração linhaça		Ração peixe	
		Média	D.P	Média	D.P	Média	D.P	Média	D.P
Mirístico	C 14:0	0,00	0,14	0,00	0,03	0,00	0,08	2,17	0,06
Palmitico	C 16:0	16,33	1,19	13,99	0,49	10,01	0,78	22,72	0,38
Palmitoléico	C 16:1	0,11	0,01	0,10	0,01	0,08	0,01	6,02	0,17
Esteárico	C 18:0	4,54	1,05	3,06	0,25	5,38	0,20	5,39	0,13
Oléico	C 18:1	28,04	0,93	30,95	0,33	23,66	0,57	27,63	0,22
Linoléico	C 18:2	48,34	1,37	50,70	0,66	24,16	0,41	25,52	0,54
Linolênico	C 18:3	2,57	0,04	1,11	0,02	36,64	0,99	2,07	0,06
Araquidônico	C 20:4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20	0,05
EPA	C 20:5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,45	0,17
DHA	C 22:6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,82	0,19

- Média e desvio padrão calculados a partir de três determinações de cada amostra.
- Composição em ácidos graxos expressa em percentual de participação de cada ácido graxo em relação aos ácidos graxos totais.

A amostra que apresentou maior percentual de ácido graxo alfa linolênico (18:3 n3), foi a da dieta com óleo de linhaça. Segundo Oomah (2001), o óleo de linhaça, é composto por 57% de ácidos graxos ω 3, 16% de ω 6, 18% de ácidos

graxos monoinsaturados e somente 9% de ácidos graxos saturados. A predominância de $\omega 3$ é três vezes superior ao $\omega 6$, fazendo com que seja a maior fonte vegetal deste ácido linolênico, cinco vezes mais abundante que em nozes ou óleo de canola. O alfa linolênico, que pertence e dá origem ao $\omega 3$, permite a formação de dois importantes ácidos graxos de cadeia longa: o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA).

O peixe marinho gorduroso, tal como salmão, cavala e arenque, é rico em ácidos graxos $\omega 3$ EPA e DHA, isto ocorre, devido a ingestão de muitas plantas marinhas, especialmente as algas unicelulares de fitoplancton, que contêm o ácido graxo $\omega 3$ em sua forma sintetizada (Nettleton, 1991). Isto explica o maior percentual destes ácidos graxos na dieta contendo óleo de peixe.

4.5 Coleta e análise de sêmen

O sêmen foi coletado duas vezes por semana, durante 6 semanas consecutivas, através de massagem dorso-abdominal (BURROWS;QUINN, 1937) (Figs.4 e 5). Embora seja uma operação simples, a coleta de sêmen exige alguns cuidados com relação à manipulação dos animais, de forma a evitar qualquer estresse que venha a inibir ou diminuir a obtenção momentânea do sêmen e/ou afetar sua produção subsequente.



Fig4 Contenção e massagem dorso abdominal para coleta de sêmen

Fonte: LABRA/UFPEL



Fig5 Coleta de sêmen com tubo graduado

Fonte: LABRA/UFPEL

O teste de penetração espermática foi realizado de acordo com Robertson e Wishart (1997). Resumidamente, a membrana perivitelina interna (IPVL) foi separada da membrana perivitelina externa por hidrólise ácida. Após separação, a IPVL foi cortada em quadrados de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm e cada quadrado foi incubado por 5 minutos com sêmen diluído na concentração de 1×10^7 esp/ml. As membranas foram lavadas para remoção dos espermatozóides e lâminas foram preparadas, identificadas e fotografadas ao microscópio. A contagem de buracos foi feita posteriormente e a capacidade de penetração foi expressa como número de buracos por mm^3 (Fig.6).

Este teste foi realizado em duplicata, utilizando-se duas membranas de ovos diferentes. Foram usados ovos frescos e não férteis, oriundos do aviário do Instituto Federal Sul-Rio-Grandense – “campus” Pelotas – Visconde da Graça.

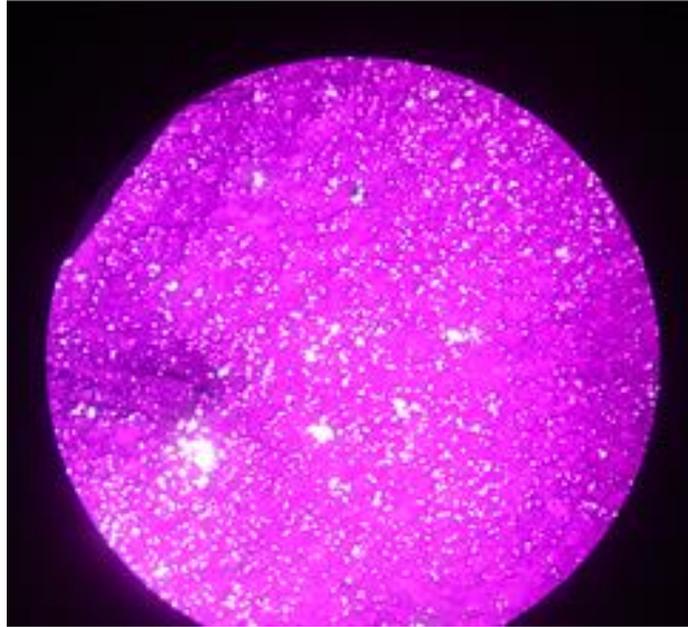


Fig.6 Membrana perivitelina interna de ovo de galinha, corada com eosina.
. Fonte: LABRA/UFPEL

4.6 Congelamento e descongelamento do sêmen

Logo após a coleta de sêmen; a amostra foi diluída 1:1 (vol:vol) com diluente de Lake. As amostras foram resfriadas à 5°C por 10 min e foi adicionado o crioprotetor dimetilacetamida (DMA) na concentração final de 6%. Após equilibrar por 1 min, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL. As palhetas serão submetidas ao vapor de nitrogênio por 1 min antes de serem mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas.

O descongelamento foi feito por agitação das palhetas dentro de banho Maria à 40°C por 15s. As palhetas foram secas com papel toalha e as duas extremidades foram cortadas com tesoura, colocando-se o conteúdo das mesmas dentro de tubos Eppendorf. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente para as análises posteriores.

4.7 Delineamento Experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado (DIC), onde os galos foram distribuídos ao acaso, um por gaiola. O experimento teve duração de 10 semanas onde cada galo representou uma unidade experimental e cada semana uma repetição, e foram divididos em quatro grupos (cinco animais por

tratamento): grupo controle (ração padrão galinha semi pesada), grupo suplementado com 4% de óleo de milho (rico em $\omega 6$), grupo suplementado com 4% de óleo de peixe (rico em $\omega 3$) e grupo suplementado com 4% de óleo de linhaça (rico em $\omega 3$). foram feitas duas coletas de sêmen por semana, sendo que o sêmen da primeira coleta foi utilizado para avaliação do sêmen e o da segunda foi utilizado para congelamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), usando o programa estatístico R e a diferença entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Para verificar a normalidade das variáveis, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk.

Houve necessidade de transformação dos dados para ajustar a normalidade da variável teste de penetração espermática. Para tal, foi utilizado a transformação de Box-Cox. A análise foi realizada com os dados transformados, porém, para uma melhor visualização dos resultados, os dados que estão sendo mostrados são os originais.

O modelo estatístico utilizado foi: $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$, onde:

Y_{ij} = variável resposta na repetição j , do tratamento i ;

μ = média geral;

T_i = efeito dos tratamentos ($i= 1, 2, 3, 4$);

E_{ij} = erro aleatório

Dois hipóteses foram testadas, hipótese de nulidade (H_0), que indica que a média dos tratamentos não foram significativas a 5%, e a hipótese alternativa (H_1), que indica que as médias diferiram no nível de significância de 5%, esta é uma hipótese que contraria a hipótese nula.

5 Resultado e discussão

5.1 Teste de penetração espermática

O objetivo deste estudo foi avaliar a interação do espermatozoide com a membrana perivitelina interna do ovo, que se reflete no número de furos formados na membrana. Os melhores tratamentos, que consequentemente obtiveram a maior média para variável número de orifícios na membrana perivitelina, foram, T3 (óleo de peixe) e T4 (óleo de linhaça), com 213 e 210 respectivamente e os que obtiveram médias menores foram T1 (controle) e T2 (óleo de milho), com 128 e 138 furos respectivamente (Tab.3). Apesar dos tratamentos com óleo de peixe e linhaça apresentarem médias maiores comparados com a dieta controle e com óleo de milho, estatisticamente os quatro tratamentos não diferiram entre si num nível de significância de 5%, pois o valor de $(p > 0,05)$.

Tabela3. Média de furos (furos/mm²) na membrana perivitelina interna do ovo (\pm erro padrão) de galinha, penetrada por espermatozóide de galos alimentados com diferentes fontes de lipídio.

	Tratamentos			
	T1 (controle)	T2 (milho)	T3 (peixe)	T4 (linhaça)
Semanas				
1	55	177	83	59
2	203	43	92	21
3	112	57	44	131
4	365	387	427	892
5	22	106	37	59
6	9	58	598	101
Média de furos e erro padrão	128 \pm 55,6	138 \pm 53,69	213 \pm 97,46	210 \pm 137.15

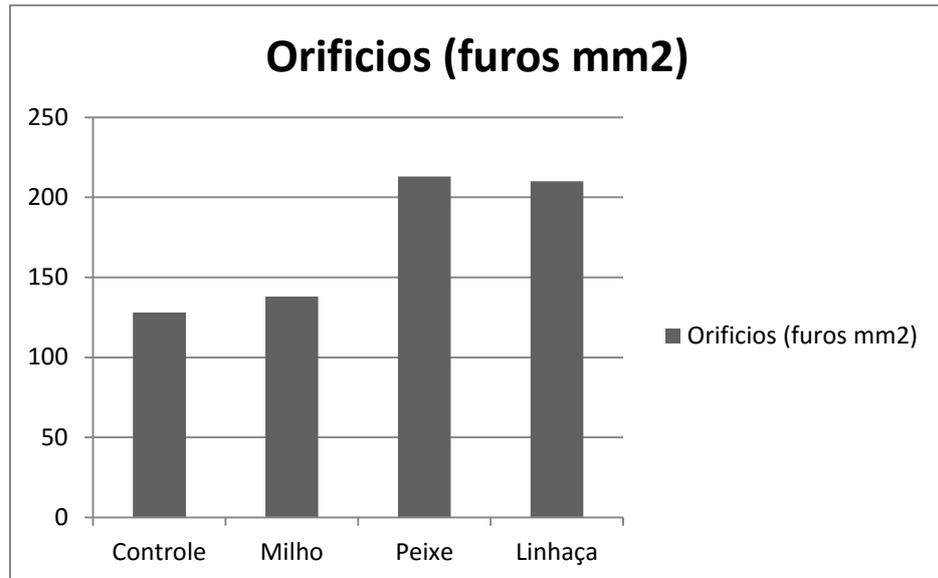


Fig.7 Média de furos (furos/mm²) na membrana perivitelina interna do ovo (IPVL) de galinha, penetrada por espermatozóide de galo.

O teste de penetração espermática avalia principalmente a capacidade de ligação do espermatozoide à membrana do ovo e a sua capacidade de perfurar a membrana. É um teste realizado *in vitro*, e para que ele seja efetivo, tanto a membrana do espermatozoide quanto a do ovo devem estar estruturalmente intactas (Bakst, 2010).

Sendo que os ovos podem conter mais de 250.000 espermatozoides na membrana vitelínica (o número de espermatozoides presos nessa membrana é cerca de 10x maior que o número de buracos causados pelos espermatozoides). Ovos de peruas e galinhas possuem 50% de chance de serem férteis quando em torno de três espermatozoides penetram na camada perivitelínica interna sobre o disco germinativo e a fertilidade é máxima quando pelo menos seis espermatozoides penetram nessa região, sendo a fertilidade em galinhas e peruas uma função dos espermatozoides estocados e transportados no oviduto das fêmeas (Wishart, 1997).

Segundo Wishart (1997), o conteúdo lipídico dos espermatozoides está diretamente relacionado com a penetração espermática na membrana perivitelínica (IPVL) e conseqüentemente com a fertilização do ovo.

Os espermatozoides possuem uma membrana que é rica em ácidos graxos polinsaturados (AGPI) e que dão à sua membrana plasmática a fluidez necessária para que ele participe dos eventos de fusão de membranas que estão associados com a fecundação (Aitken, 1995). realizando testes *in vitro*, Castellini et al. (2003) mostram que a suplementação com ácidos graxos ω 3 modifica substancialmente o

perfil de ácidos graxos dos espermatozóides e também reduz a estabilidade oxidativa espermática.

Rações suplementadas com óleos ricos em ácidos graxos melhoram a capacidade fertilizante do sêmen de galos a partir das 39 semanas de idade (Blesbois et al, 1997).

Al-Daraji et al. (2010), testando diferentes fontes de óleo sobre as características de fertilidade de codornas machos, verificaram que os animais alimentados com óleo de peixe e óleo de linhaça obtiveram melhores índices de motilidade e morfologia, além de maior concentração espermática.

6 Conclusão

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a modificação do espermatozóide através da alimentação com diferentes fontes de lipídios não alterou a sua capacidade de penetrar e fertilizar o ovo, embora os tratamentos com óleo de peixe (T3) e com óleo de linhaça (T4) tenham apresentado médias maiores, comparadas com o tratamento controle (T1) e óleo de milho (T2).

Referências

- III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção de aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade Brasileira de cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, n. 3, p. 1-48, 2001.
- ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes. **Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas**. ARS CVRANDI, São Paulo, v.26, p.141-164, nov./dez., 1993.
- ADJANOHOOUN, E. Fertilidade relacionada aos machos. In: _____. **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1994. cap. 8, p. 107-115.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod. Fertil. Devel.**, v7, p. 659-668, 1995.
- ALBERTS, B. et al. Membrane Structure. In:____. **Molecular biology of the cell**. 3 ed., Garland Publishing, New York. 1994. Cap. 10, p. 478-506.
- AL-DARAJI, H.J.; ALI-MASHADANI, H.A.; AL-HAYANI, W.K.; AL- HASSANI, A.S.; MIRZA, H.A. Effect of n-3 and n-6 fatty acid supplemented diets on semen quality in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science** **9**, 656-663, 2010.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal Function. In: **Equine Reproduction** (A.O. McKinnon e J.L. Voss Eds.) Lea e Febiger. Philadelphia, London. 1993. pp. 715-745.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation e a review of cryopreservation of stallion spermatozoa, **J. Equine Vet. Sci.** 7:145–173,1987.
- BABCOCK, G.T. How oxigen is activated and reduced in respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Nov 9;96 (23): 12971-03
- BAKST, M. R., 2010. Nigrosin/Eosin stain for determining live/dead and abnormal counts. In: BAKST, M. R.; LONG, J. A. (eds.) **Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage and Fertility Determination**. 2nd ed. MN: The Midwest Poultry Federation, 2010. Chapter III. Sperm Viability. Section 1, p.28-34.
- BAKST, M.R.; LONG, J.A. **Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination**. 2nd ed. Buffalo, MN: The Midwest Poultry Federation, 2010.
- BARROS, P.M.H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato do mato**, 2007. 120f. Tese (Doutor em medicina veterinária) – Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.
- BIRKEAD, T.R.; MOLLER, A.P. Sperm Competition in Birds: Evolutionary causes and consequences. London: **Academic**, 1992. 288p.

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I. Effects of in vitro storage (48 h at 2-5°C) on the lipid content of fowl semen. **International Symposium on Spermatology**, v. 8, p.117,1998.

BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; HERMIER, D. Effect of cryopreservation and diet on lipid of fowl sperm and fertility. **Poultry And Avian Biology Reviews**, Middx, v. 8, n. 3/4, p. 149-154, 1997.

BONGALHARDO, D. C.; LEESON, S.; BUHR, M. M. Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. **Poultry Science** 88: 1060–1069, 2009.

BRILLARD, J.P., McDANIEL, G.R. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. **Poultry Science**, Champaign, v. 64, p.155-158, 1985.

BURKE, W.H. Reprodução das aves. In: DUKES, H.H. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**, 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996, cap.38, p. 660-680.

BURKE, W.H. Reprodução das aves. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabra-Koogan,1996. p.731-743.

BURROWS, W.H.; QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**. v.14, p.251-254, 1937.

CALDER, P.C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Braz J Med Biol Res**. 1998;31:467-90.

CARRERO, J. J.; MARTÍN-BAUTISTA, E.; BARÓ, L.; FONOLLÁ, J.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J. J.; LÓPEZ- HUERTAS, E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. **Nutr. Hosp.**, v. 20, n. 1, p. 63-69, 2005.

CARTER, J. F. Potential of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. **Cereal Foods world**. (1993) 38: 753-59.

CASTELLINI, C.;LATTAIOLI, P.;DAL BOSCO, A.; MINELLI, A.;MUGNAI, C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids . **Reproduction Nutrition Development**, v.43, p.91-103, 2003.

CELEGHINI, E. C. C.; ALBUQUERQUE, R.; ARRUDA, R.P.; LIMA, C.G. Correlações entre as características seminais, parâmetros testiculares (peso) e histologia e peso corporal em galos. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 1, p. 56, 2001.

CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2005. 186p.

CEPERO BRIZ, R. Ovos enriquecidos com n-3. **Aves e Ovos**, São Paulo, v. 14, n. 5, p. 10-17, maio 1998.

CEROLINI, S. et al. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. **Biol. Reprod.**, v. 57, n. 5, p. 976-980, 1997.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Mol Reprod Dev**, v.59, p.451-458, 2001.

CHAUDHURI, D.; WISHART, G. J.; LAKE, P. E.; RAVIE, O. Predicting the fertilising ability of avian semen: comparison of a simple colourimetric test with other methods for predicting the fertilising ability of fowl semen. **British Poultry Science**, v. 29, n. 4, p. 847-851, 1988.

CHRISTENSEN, V. L.; GRIMES, J. L.; DONALDSON, W. E.; FAIRCHILD, B. D. Sperm cell integrity and storageability of turkey semen as influenced by dietary fat source. **Official Journal of the Poultry Science Association**, Inc. 77 (supplement 1), abstract S68, 1998.

COOPER, G.M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1996. 673p.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**. 14(4):466-70, 1977.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human Sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free radical biology and medicine**, v.14, p.255-265, 1993.

DOMMELS, Y.E.M.; ALINK, G.M.; BLADEREN, P.J.; OMMEN, B. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 233-244, 2002.

DONOGHUE, A. M. Prospective approaches to avoid flock fertility problems: predictive assessment of sperm function traits in poultry. **Poultry Science**, v. 78, n. 3, p. 437-443, 1999.

EMBRAPA. Soja na Alimentação. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23. Acesso em: 30 março 2015.

ETCHES, R. J. **Reproducción Aviar**. Zaragoza: Acribia, 1996. 339 p

ETCHES, R.J. Inseminação artificial. In: _____. **Fisiologia da reprodução de aves**. Santos: Apinco, 1994. p.117-128.

FARREL, D.J. The problems and practicalities of producing na ômega (n)-3 fortified egg. **World Poultry**, v.12, n.2, p.39-41, 1996.

FLESH, F.M; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys**, v.1469, p.197-235, 2000.

GALVÃO, A. L. B. Oxidative stress in end-stage chronic kidney disease in small animals. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba v. 14, n. 3, p. 178-186. 2009.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A.S. Omega-3 and fatty acids balance in inflammatory response in patients with cancer and cachexia. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 5, set/out 2006.

GENNIS R. B. **Biomembranes: molecular structure and function**. New York: Springer, 1989. 533p.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5ª Ed. RJ: Ed. Interamericana, 1981.

GOMES, K. R.; SANTOS, M. G. C.; FRANCO, D. F.; PIRES, R. B.; SILVA, M. G.; Da NEVES, M. F.; BASSANI-SILVA, S. Avaliação do hematócrito e da proteína plasmática em sangues hemodiluídos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça. v. 1, n. 7. p. 1-5. 2006.

GONZÁLES, F.H.D.; SILVA, C. Bioquímica clínica de lipídios. In: **Introdução a bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006, cap.4, p.121-151.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 720 p.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2.ed. New York : Clarendon Press, 1991. p.198.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4ed. Oxford University Press, Oxford, UK, 2007.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.

HAMMERSTEDT, R. H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and preservation of lipid peroxidation: a review on the effect on design of storage preservation systems. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v. 5, n. 6, p. 675-690, 1993.

HAMMERSTEDT, R. H. Symposium summary and challenges for the future. **Poultry Science**, v.78, p.459-466, 1999.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de química fisiológica**, 5. ed. São Paulo: atheneu, 1982.846 p.

HARTMAN L.; LAGO R.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v.6, p.475-476, 1973.

- IBGE. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1068&id_pagina=1>. Acessado em: 28/03/2015
- IGARASHI, T.; AURSAND, M.; SACCHI, R.; PAOLILLO, L.; NONAKA, M.; WADA, S. Determination of docosahecanoic acid and n-3 fatty acids in refined fish oil by H-NMR spectroscopy: IUPAC interlaboratory study. **Journal of AOAC international**. 85 (6): 1341-1354, 2002.
- IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and sterility**, v.57, p.2409-2416, 1992.
- KELSO, K. A.; CEROLINI, S.; SPEAKE, B. K.; CAVALCHINI, L. G.; NOBLE, R. C. Effect of dietary supplementation with L inolenic acid on the phospholipids fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 week of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, n. 1, p. 53-59, May 1997b.
- KING, A.S. Apparatus urogenitalis. Handbook of Avian Anatom: **Nomina Anatomica Avium**. 2nd. ed. Cambridge, Mass.:Nuttall Ornithological Club, 1993. 329-397p.
- KING, L.M.; BRILLARD, J.P.; GARRET, W.M. et al. Segregation of spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens. **Reproduction**, v.123, p.79-86, 2002.
- KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 2, p. 154-172, 2002.
- McCANCE AND WIDDOWSON'S. (Ed.). The composition of food. 6 ed. [S.L.]: **Royal Society of Chemistry**, 2002. 537 p.
- McDOWELL, L.R. Essential fatty acids. In: **Vitamins in animal nutrition**. London: Academic Press Limited, 1989. p. 400-421.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Brasil Projeções do Agronegócio 2011/12 a 2021/22. Brasília, 2012, 50 p. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: março de 2015.
- MOREIRA, A.M.F.O. Avaliação da aceitabilidade e digestibilidade de dietas para equinos com diferentes fontes de óleo vegetal. 2008, 71f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, São Paulo.
- MORGADO, N.; GALLEGUILLOS, A.; SANHUEZA, J.; GARRIDO, A.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Effect of degree of hydrogenation of dietary fish oil on the trans fatty acid content and enzymatic activity of rat hepatic microsomes. **Lipids**, Champaign, v.33, p.669-673, 1998
- MURRAY,R.; GRANNER,D.; MAYES, P.; RODWELL, V. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26th ed. New York: Lang e Medical Books/ McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2003

NETTLETO, J.A. Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. **J Am Diet Assoc.** 1991;91(3):331-7.

NUNES, I.J. **Nutrição animal básica.** Belo Horizonte: Ilto José Nunes, 1995.334p.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Hum Reprod Update**, v.5, p.399-420, 1999.

OLIVEIRA, D.R.M.S. & NÄÄS, I.A. Issues of sustainability on the Brazilian broiler meat production chain. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ADVANCES IN PRODUCTION MANAGEMENT SYSTEMS, 2012, Rhodes. **Anais...Competitive Manufacturing for Innovative Products and Services: proceedings**, Greece: Internacional Federation for Information Processing, 2012.

OOMAH, B. D. Flaxseed as a functional food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v.81,p.889-894, 2001.

PARKHURST, C. R.; MOUNTNEY, G. J. **Poultry meat and egg production.** NewYork: Avi Book, 1988.

REIS, R. N.; VIEIRA, S. L.; NASCIMENTO, P. C.; PEÑA, J.E.; BARROS, R.; TORRES, C. A. Selenium contents of eggs from broiler breeders supplemented with sodium selenite or zinc-L-selenium-methionine. **Journal Applied Poultry Research**, v.18 p.151–157, 2009.

RICHARD, M.J., ARNAUD, J., JURKOVITZ, C.,HACHACHE, T., MEFTAH, H., LAPORTE, F.,FORET, M., FAVIER, A., CORDONNIER, D. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. **Nephron, Basel**, v.57, n.1, p.10-15, 1991.

ROBERTSON, L.; WISHART, G.J. In vitro sperm-egg interaction assay utilizing inner perivitelline layer from laid chicken eggs. In: Bakst, M. R.; Cecil, H. C. (eds.), **Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination.** Savoy, IL: **Poultry Science Association**, p.64-67, 1997.

ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J. A.; MITCHELL, L. M.; MCEVOY, T. G. Nutrition and fertility in ruminant livestock animal. **Feed Science and Technology**, n.126, p.259–276, 2006.

RODRIGUES, J. N.; GIOIELLI L. A.; ANTON C., Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23: 226, 2003.

ROSENSTRAUCH, A., EGEN, A.A., FRIEDLÄNDER, M. Spermatozoa retention by Sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. **Biol. Reprod.**, [S.I], v.v50, p.129-136, 1994.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. Tabelas brasileiras para aves e suínos: **composição de alimentos e exigências nutricionais.** 2. ed. – Viçosa, MG: UFV, DZO, 2005, 252p.

RUTZ, F.; Anciuti, M.A.; Xavier, E.G.; Roll, V.F.; Rossi, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 307-317, julho/set. 2007. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br>>. Acesso em: 5 fevereiro de 2015.

SANTOS, Z. A. S.; FREITAS, R. T. F.; FIALHO, E. T. RODRIGUES, P. B.; LIMA, J. A. F.; CARELLOS, D. C.; BRANCO, P. A. C.; CANTARELLI, V. S. Valor nutricional de alimentos para suínos determinado na Universidade Federal de Lavras. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, n.1, p.232-237, 2005.

SARGENT, J.R.; HENDERSON, R.J. Marine (n-3) polynsaturated fatty acids. In: *Developments in oil and fats*. Ed. R.J. Hamilton. London: **Blackie Academic & Professional**, 1995, p. 32-65.

SCOTT, T.W. Lipid metabolism of spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v.18, p.65-76, 1973.

SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. Enfermidades do sistema reprodutor. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, A. **Doença das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 81-128.

SHARMA, R.K, AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, p.835-850, 1996

SIES, H.; STAHL, W.; SEAVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of nutrition**, v.135, n.5, p.969-972, 2005

SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-31, 1972.

SION, B.; GRIZARD, G.; BOUCHER, D. Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.935, p.259-265, 2001.

SMITH, J.H. La importância Del manejo Del macho. **Ind. Avic.**, v.33, n.3, p.4-10, 1996.

SOARES, J.M., BELETTI, M.E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozoides de galos (*Gallus gallus*) **Brazilian journal of veterinary research and animal science**. São Paulo, v.43, n.4, p. 554-560, 2006.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. Nature and biologic reactions. **Mayo Clennic Proceeding**. 63, 381-389. 1998.

STUBBS, C. D. & SMITH, A. D. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta.**, 779 : 89-137. 1984.

SURAI, P. F. Natural Antioxidants in Poultry Nutrition: New developments In: 16th **European Symposium on Poultry Nutrition**, p. 669-675, 2006.

SURAI, P. F.; FUJIHARA, N.; SPEAKE, B. K.; BRILLARD, J-P.; WISHART, G. J.; SPARKS, N. H. C. Polyunsaturated Fatty Acids, Lipid Peroxidation and Antioxidant

Protection in Avian Semen – Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**. 14: 1024-1050, 2001.

SURAI, P. F.; NOBLE, R. C.; SPARKS, N. H.; SPEAKE, B. K. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. **Journal of Reproduction and Fertility**. 120 (2): 257-264, 2000.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2014. São Paulo: UBABEF, 2014. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes?m=75&date=2014-03>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

URSO, M. L., CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidante supplementation. **Toxicology**. 189, 41-54. 2003.

VISENTAINER, J. V.; CARVALHO, P. O.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Concentração de ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, n. 1, p. 90-93, 2000.

VISENTAINER, J. V.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N.; FRANCO, M. R. B. Relação entre teores de colesterol em filés de tilápias e níveis de óleo de linhaça na ração. **Ciências Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2. p. 310-314, 2005.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes In: Morris, E.J., Clark, A. (Eds). **The effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p.189-218.

WHITTEMORE, C. The science and practice of pig production. Singapura: **Long Scientific & Technical**, 1993. 564 p.

WISHART, G. J. Cryopreservation of avian spermatozoa. **Methods of Molecular Biology**, v.38, p.167-177, 1997.

WISHART, G. J.; PALMER, F. H. Correlations of the fertilising ability of semen from individual male fowls with sperm motility and ATP content. **British Poultry Science**, v. 27, n. 1, p. 97-102, 1986.

WISHART, G.J. Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. **Anim Reprod Sci**, v.48, p.81-92, 1997.

WOLFE, C.A, JAMES, P.S., MACKIE, A.R., LADHA, S., JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biol. Reprod**. 59:1506-1514, 1998.

YAQOOB, P; CALDER, P. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **Br J Nutr**. 2007; 98 suppl 1:S41-S45.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 18 (4), 383-399, 2000.

ZAMBIASI, R.C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIASI, M.W.; MENDONÇA, C.B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, 25(1), 111-120, 2007.

7 Anexos

Anexo1

Metodologia para extração de lipídios das amostras de rações.

1. Pesou-se 1 g da amostra das rações.
2. Adicionou-se 10 mL de hexano.
3. Deixou-se o sistema reagir em um frasco fechado por 24 horas, agitando-se ocasionalmente.
4. Adicionou-se 10 mL de água destilada aos frascos, que foram agitados e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos para otimizar a separação das fases.
5. Coletou-se a fase orgânica com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, transferindo-a para um tubo de ensaio com tampa rosqueável.
6. Evaporou-se o solvente por fluxo de nitrogênio em banho-maria à 40 °C para que restassem apenas os lipídios no fundo do tubo.

A amostra está pronta para a derivatização preparatória para a cromatografia gasosa.

Metodologia para derivatização dos ácidos graxos para sua análise por cromatografia gasosa (Adaptado de Hartman e Lago, 1973).

1. Ao tubo que continha os lipídios totais extraídos, adicionou-se 500µL de KOH 0,5M em metanol.
2. Os tubos foram aquecidos a 65 °C em banho-maria por 60 min.
3. Retirou-se os tubos do banho-maria e quando estes atingiram a temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 ml de reagente de H₂SO₄ 1M em metanol.
4. Os tubos foram novamente aquecidos a 65 °C em banho-maria por 60 min.
5. Retirou-se os tubos do banho-maria e quando estes atingiram a temperatura ambiente, adicionou-se 2 ml de n-hexano.
6. Os tubos foram agitados em vortex e deixados em repouso para que ocorresse a separação das fases
7. Coletou-se a fase de n-hexano como auxílio de pipeta de Pasteur, transferindo-a para frascos próprios para o injetor do cromatógrafo.

Parâmetros da cromatografia gasosa empregados na análise dos ácidos graxos

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo Shimadzu modelo 17A (Shimadzu Co., Japão), equipado com um detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelco SP 2340 (60 m x 0,25 mm x 0,2 µm filme).

A temperatura do injetor foi fixada em 250 °C e a do detector em 260 °C. Como gás de arraste foi utilizado hélio, com fluxo de 17 cm/s, sendo 1 µL o volume de amostra injetado, com razão de split de 1:20. A coluna foi mantida inicialmente na temperatura de 120 °C por 5 min. seguindo-se uma rampa de aquecimento de 4 °C por minuto até 240 °C, permanecendo assim por 10 min., totalizando 45 min. de corrida cromatográfica.

A identificação dos ésteres metílicos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos picos dos cromatogramas das amostras com o padrão - FAME Mix Supelco 37 Components (SIGMA-ALDRICH Co., USA). Para a quantificação dos AG se considerou a percentagem de área do pico em relação à área total dos picos identificados.