

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Óleo-resina de copaíba sobre as características seminais de galos

Camila Tonini

Pelotas, 2016

Camila Tonini

Óleo-resina de copaíba sobre as características seminais de galos

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 - Reprodução de Aves.

Orientadora: Denise Calisto Bongalhardo
Co-orientador: Marcos Antonio Anciuti

Pelotas, 2016

Camila Tonini

Óleo-resina de copaíba sobre as características seminais de galos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do título de grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 17 de fevereiro de 2016

Banca examinadora:

.....
Prof. Dra. Carine Dahl Corcini – UFPel

.....
Prof. Dra. Fernanda Medeiros Gonçalves – UFPel

.....
Prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso – UFPel, FAEM, DZ

Agradecimentos

À Deus, pela força constante que me proporcionou em todas as etapas da vida. Guiando-me sempre, junto com a positividade e entusiasmo que fizeram a diferença também nesta trajetória.

À minha família, pela educação, pela base, pelo alicerce de todos os dias. Sem vocês, nada seria. Obrigada mãe, Oneiva, pela força incondicional que me serve de exemplo, obrigada meu pai, Ildo, pela inspiração, que me faz de espelho, sendo meu herói. Obrigada minhas irmãs, Angela e Talita, companheiras mesmo a distância, pela coragem que me transferem, sendo combustível para atingir minhas metas. Amo vocês!

Aos meus amigos, que se tornaram fundamentais, estando ao meu lado desde a graduação, e se fizeram importantes desde um conselho, até as brincadeiras. Minhas amigas, Andressa, Bruna, Gabriela e Thais pelo apoio, companheirismo, palavras, risadas, enfim, todos os momentos que se tornaram inesquecíveis.

À Orientadora Denise, pela compreensão, auxílio, paciência, inspiração e confiança que me proporcionou desde a graduação até aqui, na conclusão de mestrado.

Ao co-orientador, Marcos Anciuti, por todo apoio e confiança.

À toda equipe de trabalho, que contribuíram em todas as etapas do experimento, no laboratório até o manejo dos animais. Alex, Silvinha, Sérgio, Sara, Stela, Carol, Matheus, Mariana, Elvis, Tiago e Seu Juca.

Ao Programa de Pós-Graduação de Zootecnia, à Universidade Federal de Pelotas por me proporcionar todo o conhecimento, desde a graduação até aqui.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Enfim, agradeço à todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram para a realização de mais um sonho. **Muito obrigada!**

Resumo

TONINI, Camila. **Óleo-resina de copaíba sobre as características seminais de galos**. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

Na indústria avícola os programas de melhoramento genético contribuíram para uma maior eficiência alimentar e crescimento rápido em um só animal. As deficiências nutricionais associadas podem interferir negativamente na reprodução, assim, é necessário dar importância a qualidade nutricional da dieta dos machos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) na dieta de galos sobre as características seminais. Foram utilizados 40 galos semi-pesados, com idade de 40 semanas, alojados em boxes individuais, recebendo água à vontade e alimentados com as dietas experimentais durante 6 semanas. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com dois tratamentos e seis repetições. Os tratamentos consistiram de duas dietas experimentais: T1 – dieta controle sem a adição de óleo-resina de copaíba; T2 – dieta controle com adição *on top* de óleo-resina de copaíba, no qual foi homogeneizado em 25 kg de ração, a quantidade de 3,68 gramas de óleo-resina de copaíba (25 mg de óleo-resina/galo/dia). As dietas eram à base de milho e farelo de soja, sendo formuladas de modo a atender as exigências nutricionais e isonutritivas. Foram avaliadas as seguintes variáveis do sêmen fresco: volume, motilidade, concentração, integridades de membrana, acrossoma e DNA, teste de penetração espermática. Nenhuma das características foi afetada significativamente pelos tratamentos ($P > 0,05$). Estes resultados indicam que as variáveis reprodutivas avaliadas não foram influenciadas pela adição *on top* do óleo-resina de copaíba, porém, os valores encontrados estão de acordo com os de referência em termos de desempenho reprodutivo de galos reprodutores.

Palavras-chave: antioxidante; copaífera sp; integridade de membrana; penetração espermática; reprodução

Abstract

TONINI, Camila. **Oleoresin of copaiba on seminal characteristics of roosters.** 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

In the poultry industry breeding programs contributed to greater feed efficiency and rapid growth in one animal. Associated nutritional deficiencies can negatively interfere with reproduction, so it is necessary to give importance to the nutritional quality of the diet of males. The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation of oleoresin of copaiba (*Copaifera* sp.) In roosters diet on seminal characteristics 40 semi-heavy roosters aged 40 weeks were used, housed in individual boxes, receiving water ad libitum and fed the experimental diets for 6 weeks. The experimental design was completely randomized with two treatments and six replications. Treatments consisted of two experimental diets: T1 - control diet without the addition of oil-resin copal; T2 control diet with added on top of copaiba oil-resin, which was homogenized in 25 kg feed, the amount of 3.68 grams of oleoresin copaiba (25 mg oleoresin / bump / day) as diets were based on corn and soybean meal, and formulated to meet the nutritional requirements and isonutritives. The following variables of fresh semen were evaluated: volume, motility, concentration, membrane integrity, acrosome and DNA, sperm penetration test. None of the characteristics was significantly affected by the treatments ($P > 0.05$). These results indicate that the evaluated reproductive variables were not influenced by the addition on top of the oilresin copaiba, however, the values are in agreement with the reference in terms of reproductive performance of breeding roosters.

Keywords: antioxidant; *Copaifera* sp; membrane integrity; sperm penetration; reproduction

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Composição nutricional das dietas experimentais..... | 32 |
| Tabela 2 | Volume seminal (ml) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíbaon top (T2) | 39 |
| Tabela 3 | Motilidade espermática (%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíbaon top (T2) | 41 |
| Tabela 4 | Concentração espermática ($\times 10^9$ esp/ml) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíbaon top (T2) | 42 |
| Tabela 5 | Integridade de membrana espermática (%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíbaon top (T2)..... | 43 |
| Tabela 6 | Integridade de acrossoma (%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíbaon top (T2) | 44 |
| Tabela 7 | Integridade de DNA (%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíbaon top (T2) | 46 |
| Tabela 8 | Número de orifícios na membrana perivitelina interna (furos/ mm^2) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíbaon top (T2)..... | 47 |

Sumário

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | Introdução | 09 |
| 2 | Revisão Bibliográfica | 11 |
| 2.1 | Sistema reprodutivo do galo | 11 |
| 2.2 | Estrutura e características dos espermatozoides | 13 |
| 2.3 | Componentes da membrana espermática..... | 13 |
| 2.3.1 | Ácidos graxos poliinsaturados – Estrutura e metabolismo | 13 |
| 2.4 | Peroxidação lipídica | 15 |
| 2.4.1 | Formação de espécies reativas ao O ₂ e radicais livres..... | 16 |
| 2.5 | Estresse oxidativo | 17 |
| 2.6 | Antioxidantes | 19 |
| 2.7 | Vitamina E | 20 |
| 2.8 | Óleo-resina de copaíba | 21 |
| 2.9 | Indicadores da eficiência reprodutiva em galos | 24 |
| 2.9.1 | Produção de sêmen – volume seminal..... | 24 |
| 2.9.2 | Motilidade espermática | 26 |
| 2.9.3 | Concentração espermática | 27 |
| 2.9.4 | Integridade espermática | 28 |
| 2.9.5 | Potencial fertilizante..... | 29 |
| 3 | Materiais e Métodos | 31 |
| 3.1 | Local | 31 |
| 3.2 | Período experimental | 31 |
| 3.3 | Animais..... | 31 |
| 3.4 | Dietas experimentais..... | 32 |
| 3.6 | Tratamentos | 33 |
| 3.7 | Programa de luz..... | 33 |
| 3.8 | Instalações | 33 |
| 3.9 | Manejo alimentar | 33 |
| 3.10 | Coleta de dados | 34 |
| 3.10.1 | Avaliações laboratoriais | 34 |
| 3.11 | Delineamento experimental e análise estatística..... | 37 |
| 4 | Resultados e Discussão | 39 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.1 | Características espermáticas - análises do sêmen fresco | 39 |
| 4.1.1 | Volume seminal | 39 |
| 4.1.2 | Motilidade espermática | 40 |
| 4.1.3 | Concentração espermática | 41 |
| 4.1.4 | Integridade de membrana espermática | 43 |
| 4.1.5 | Integridade de acrossoma | 44 |
| 4.1.6 | Integridade de DNA | 45 |
| 4.1.7 | Teste de penetração espermática | 47 |
| 5 | Conclusão | 49 |
| | Referências | 50 |

1 Introdução

Na granja de matrizes, responsável por abastecer o incubatório com ovos férteis, os machos representam uma pequena percentagem do plantel, contudo, são responsáveis por 50% do processo de fertilização (BITTAR FILHO e RIBEIRO, 2005) o que torna sua presença indispensável para a reprodução.

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).

Os espermatozóides de galos apresentam naturalmente um grande conteúdo de PUFAs, tornando-os altamente suscetíveis à oxidação (SURAI, 2002). A peroxidação lipídica gera radicais livres (atualmente mais conhecidos como espécies reativas ao oxigênio – EROs), que produzem danos na membrana espermática e também no metabolismo celular, comprometendo a capacidade de fertilização. Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino como ao masculino (ANDRADE *et al.* 2010). Esse desequilíbrio também pode ser causado pela redução da disponibilidade de antioxidantes, por uma nutrição inadequada ou pela permanência dos animais em condições de estresse (ANDRADE, *et al.* 2010).

Para reverter o quadro de estresse oxidativo é preciso reduzir a produção de EROs ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis. O tocoferol ou vitamina E, é conhecido como o principal antioxidante lipossolúvel que protege os ácidos graxos poli-insaturados dos tecidos contra a peroxidação. Ele é um potente removedor de radicais peróxil ($\text{LOO}\cdot$) e, provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação em animais (HALLIWELL e GUTTERIDGE,

1999; DROGE, 2002). O óleo-resina de copaíba é composto por ácidos diterpenos e sesquiterpenos (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). Os diterpenos podem ser precursores de vitamina E, necessária no metabolismo da célula atuando como antioxidante, tendo a capacidade de impedir a atuação de radicais livres sobre as células, evitando a formação de lesões e perda de integridade celular (BIANCHI, 1999).

Comparando a concentração de Vitamina E plasmática e tecidual em humanos, mediante suplementação da vitamina natural e sintética marcada com deutério, observaram que a forma natural apresentava disponibilidade, aproximadamente, duas vezes maior que a sintética. A vitamina E tem sido empregada pela indústria alimentícia como um antioxidante natural, pois além dessa função é ainda um componente essencial ao organismo animal (BURTON *et al.* 1998). Neste contexto, surge o interesse em avaliar o efeito do uso de fontes naturais precursoras da vitamina E, nos parâmetros reprodutivos de galos.

O uso de plantas diversas vem sendo empregado de diferentes formas. Os extratos e os óleos essenciais tem sido relatados como importantes fontes de antioxidantes (HAYAT *et al.* 2010; LUNA *et al.*, 2010; BOTSOGLOU *et al.* 2012; FREITAS *et al.* 2013). Como exemplo, tem-se a copaíba (*Copaifera* sp.), árvore de grande porte, encontrada principalmente na região norte do Brasil (PIERI *et al.*, 2009) apresentando mais de 20 espécies no país. Através de um corte realizado no seu tronco é possível a extração de uma resina oleaginosa muito usada na medicina popular com indicações etnofarmacológicas (LEANDRO, 2012).

Neste contexto, tem-se o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de óleo-resina de copaíba sobre as características seminais de galos, buscando uma melhora nas características seminais, que irá refletir diretamente na produtividade do plantel.

2Revisão Bibliográfica

2.1Sistema reprodutivodo galo

O sistema reprodutor do galo é basicamente constituído por testículos, epidídimos, ductos deferentes e falo (SESTI, 2003). O testículo esquerdo geralmente é maior do que o direito, podendo contribuir em maior parcela na função reprodutiva da ave, havendo uma relação diretamente proporcional entre peso testicular e produção espermática (LEESON & SUMMERS, 2000). Os testículos das aves são maiores, em relação ao peso corporal, quando comparado aos mamíferos, sendo o esquerdo de 0,5 a 3,0 gramas mais pesado que o direito (ETCHES, 1996).

Os túbulos seminíferos ramificam-se livremente dentro da túnica albugínea. No galo adulto, extensões da túnica penetram entre os túbulos para agirem como estrutura de suporte. O tecido intersticial é desprezível, porém contém as células de Leydig, que são secretoras de androgênios. Os túbulos seminíferos de galos imaturos são alinhados por uma camada simples de células de Sertoli e espermatogônias. Já os machos maduros possuem túbulos de forma irregular alinhados por um epitélio germinativo de múltiplas camadas. As espermatogônias dão origem aos espermátocitos primários, secundários e espermátides. Estas últimas progressivamente se transformam em espermatozóides, por um processo denominado espermiogênese (BASKT & BAHR, 1995).

Os testículos do galo estão localizados no interior da cavidade abdominal. A hipótese que explica a formação espermatogênica, na temperatura de 41 a 43 °C, é a de que poderia haver um resfriamento dos testículos através dos sacos aéreos abdominais (RUTZ *et al.*, 2007). Os hormônios reprodutivos produzidos pelos testículos são principalmente andrógenos, sendo a testosterona o mais importante (SESTI& ITO, 2000).

Histologicamente, os testículos são formados por uma grande massa de túbulos seminíferos, revestidos internamente por células de Sertoli e células germinativas; e por um delicado estroma intersticial contendo vasos sanguíneos e linfáticos, e células de Leydig (JOHNSON, 2006).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. 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). Segundo Adjanohoun, 1994 a produção de espermatozoides atinge seu apice entre 24 e 30 semanas de idade e, assim, permanecem até aproximadamente 40 semanas e, então, decresce na medida em que os machos envelhecem. 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.

Os galos possuem um par de pequenos epidídimos e um par de ductos deferentes, fixados à parede dorsal do corpo, desembocando num pequeno falo na região dorsolateral da cloaca (BACHA & BACHA, 2003; JOHNSON, 2006). Uma característica marcante do trato reprodutivo do galo é a proeminência dos ductos deferentes, que compõem até 50% das regiões do epidídimo, contrastando com um ducto epididimário curto e não-diferenciado (AIRE, *et al.* 1979; OLIVEIRA, 2007). Os ductos deferentes das aves são responsáveis pela reabsorção de mais de 90% do fluido proveniente do testículo, com uma taxa de reabsorção que é maior do que em mamíferos (CLULOW, *et al.* 1988).

Não existem órgãos acessórios como vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral associados ao ducto deferente. Em galos que não tenham ejaculado, os espermatozoides atravessam o ducto deferente em cerca de 84 horas, ao passo que em machos que já ejacularam, os espermatozoides requerem 24 a 48 horas para realizarem a mesma passagem (ETCHES, 1996).

O órgão copulatório é formado por um falo que faz contato com a vagina durante a cópula. A ereção do falo resulta em engurgitamento com um fluido semelhante a linfa derivado do corpo vascular paracloacal, uma extensão do falo localizado na parede da cloaca (ETCHES, 1996).

2.2 Estrutura e características dos espermatozóides

Os espermatozóides são células altamente especializadas consistindo de várias estruturas de membrana. Suas propriedades físicas e integridade funcional determinam funções fisiológicas importantes, incluindo motilidade e capacidade fertilizante. Assim, a composição lipídica do sêmen é um fator determinante de sua qualidade (CEROLINI, *et al.* 1997).

O espermatozóide de galos é composto por acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (BURKE, 1996). A diferença dos espermatozóides de aves para os de mamíferos, segundo Gilbert (1982), é o fato de o primeiro ser menor, com cabeça filamentosa e alongada, e por não possuir gota citoplasmática. O mesmo autor descreve que a cabeça dos espermatozóides de galos é curvada e mede de 12 a 13 μm de comprimento, e recoberta pelo capuchão do acrossoma (2 μm). A peça intermediária mede cerca de 4 μm de comprimento e o restante do comprimento do espermatozóide de 100 μm é composto pela peça principal da cauda. A porção mais larga do espermatozóide do galo mede aproximadamente 0,5 μm . Garner (2003) determinou que a proporção média de espermatozóides normais encontradas em galos é de 85% a 90%.

2.3 Componentes da membrana espermática

2.3.1 Ácidos graxos poliinsaturados – Estrutura e metabolismo

Dentre os fatores intrínsecos ao espermatozóide que influenciam a fertilidade estão os lipídeos (KELSO *et al.*, 1997), que fazem parte da constituição das membranas que revestem as células espermáticas. Em todas as espécies, os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozóides, caracterizados por conter grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados – PUFA, o que sugere que a composição de lipídios e ácidos graxos dos espermatozóides pode ser um fator determinante das taxas de fertilidade (MARTIN RILLO *et al.*, 1996). Os PUFAs da série 3 (n-3) e 6 (n-6) são ácidos graxos essenciais.

A membrana plasmática da cabeça do espermatozóide contém maior conteúdo de esfingomielina e fosfatidilserina e menos fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina que a membrana do corpo espermático. A presença de tais fosfolípidos representa um risco para a ocorrência de peroxidação lipídica nas membranas espermáticas e é considerado causa de redução de fertilidade em machos (WISHART, 1984; AITKEN, 1994).

Os ácidos graxos insaturados são divididos em monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA). Os ácidos graxos poliinsaturados, possuem mais do que uma ligação dupla na molécula e com base na sua estrutura química três grupos diferentes, omega-3 (n-3) omega-6 (n-6) e omega-9 (n-9), onde a primeira ligação dupla é de 3,6 ou 9 carbonos da extremidade metilo da molécula, respectivamente (CATALÁ, *et al.* 2013).

Surai (2002) relatou que os espermatozóides de galos apresentam um alto conteúdo de PUFA. As aves, por exemplo, são caracterizadas por conterem quantidades elevadas de PUFA do n-6 (MARINERO, 1996), enquanto que na maioria dos mamíferos é predominante das séries de n-3 (mais de 60% do total de ácidos graxos) (KELSO, 1997; CASTELINI, 2006).

Tal concentração de PUFA se dá principalmente na membrana plasmática da cabeça do espermatozóide (BONGALHARDO *et al.*, 2002). Esta composição favorece a peroxidação lipídica, pois as duplas ligações dos PUFA formam radicais livres ao se juntarem ao oxigênio metabólico, caracterizando os PUFA como materiais oxidáveis (MCDOWELL, 1989). Segundo Aitken (1995), a fluidez espermática e a capacidade fertilizante do galo diminuem no espermatozóide peroxidado.

A correlação entre o dano oxidativo e os PUFAs, através da incorporação deste último em fosfolípidos leva a alterações conformacionais e reduz a disponibilidade de duplas ligações para a peroxidação lipídica (ALMAIDA-PAGÁN, *et al.* 2014). Porém, são necessários mais estudos que comprovem esta funcionalidade dos ácidos graxos insaturados. O aumento da ingestão de n-3 produz uma maior transcrição de enzimas antioxidantes, como a proteína de dissociação, glutatona transferase e superóxido dismutase, e inibe a transcrição de enzimas que envolvem a produção de espécies reativas ao oxigênio (ALMAIDA-PAGÁN, 2014).

A inclusão de óleos na ração pode modificar o perfil de ácidos graxos da membrana plasmática que reveste o espermatozoide, conseqüentemente, melhorar a qualidade espermática (SCOTT, 1973). Os ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 (ω 3) predominam nos fosfolipídios das membranas celulares cuja permeabilidade e flexibilidade dessas células dependem dos mesmos. (SIRRI *et al.* 1995).

Desta forma, com a inclusão deste óleo-resina, pretende-se obter a diminuição da produção de radicais livres com conseqüente aumento da fluidez da membrana espermática, obtendo um incremento na qualidade seminal dos animais submetidos a essa dieta quando expostos a avaliações de parâmetros reprodutivos.

2.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados de membranas celulares, levando a uma série de eventos que podem culminar com a morte celular (BENZIE, 1996).

Na célula espermática concentração de PUFA se dá principalmente na membrana plasmática que reveste da cabeça do espermatozóide (BONGALHARDO *et al.*, 2002). Esta composição favorece a peroxidação lipídica, pois as duplas ligações dos PUFA formam radicais livres ao se juntarem ao oxigênio metabólico, caracterizando os PUFA como materiais oxidáveis (MCDOWELL, 1989). Segundo Aitken (1995), a fluidez espermática e a capacidade fertilizante do galo diminuem no espermatozóide peroxidado. Os espermatozoides de aves apresentam uma composição lipídica rica em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFAs) na fração fosfolipídica da membrana celular (46 a 54,4%). Tais células são altamente suscetíveis à peroxidação.

Mesmo apresentando efeitos benéficos nos ácidos graxos ω 3, a presença de alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados dentro das frações lipídicas dos espermatozoides torna-os altamente susceptíveis à peroxidação, com conseqüente risco de danos à estrutura celular (NIKI *et al.*, 1993). Portanto, há necessidade de um sistema antioxidante para protegê-los contra danos peroxidativos bem como contra uma possível disfunção dessas células (CECIL & BAKST, 1993; AITKEN,

1994). Acredita-se que os danos causados pela peroxidação dos lipídios dos espermatozoides sejam a principal causa de subfertilidade dos machos (HAMMERSTEDT, 1993). A correlação entre o dano oxidativo e os PUFA's, através da incorporação deste último em fosfolípidos leva a alterações conformacionais e reduz a disponibilidade de duplas ligações para a peroxidação lipídica (ALMAIDA-PAGÁN, *et al.* 2014).

2.4.1 Formação de espécies reativas ao O₂ e radicais livres

Um radical livre nada mais é do que qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons livres na sua órbita externa. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados tem uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida curta, apresentam grande capacidade reativa, o que pode acontecer com qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto para a sua estabilização, independente de ser uma molécula, uma célula, ou um tecido do organismo, partindo para uma reação em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, é denominado de substância oxidante. O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Desta forma, a formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar energia (KUSS, 2005).

As espécies reativas do metabolismo do oxigênio ou espécies oxigênio reativas (ROS) são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos, levando a concentrações fisiológicas necessárias para o funcionamento normal da célula, ou a quantidades excessivas, causando danos oxidativos à célula (NORDBERG & ARNER, 2001; IMAI & NKAGAWA, 2003).

O uso fisiológico de ROS pelas células começa a ser demonstrado em áreas como a da sinalização intracelular e regulação redox. A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de

genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA, 1997; SHAMI, 2004).

O radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídios podem regular a atividade de várias quinases e fatores de transcrição e o mecanismo da morte celular. Várias citocininas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores usam ROS como segundo mensageiro. As espécies oxigênio reativas podem também, contribuir para o envelhecimento e muitas doenças humanas como câncer, derrame cerebral, doenças neurodegenerativas e diabetes (IMAI & N\ KAGAWA, 2003)

Os danos provocados pelo excesso de EROs afetam a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozóide (IRVINE *et al.*, 2000; VALENÇA & GUERRA, 2007).

Desta forma, pretende-se obter a diminuição da produção de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio, com a adição de óleo-resina de copaíba na dieta das aves, obtendo um incremento positivo nas avaliações reprodutivas, com menos danos a célula espermática.

2.5 Estresse oxidativo

Alto teor requerido de PUFA na membrana, proporciona a fluidez necessária para o espermatozóide (NISSEN, 1983). No entanto, os ácidos graxos poliinsaturados são vulneráveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ROS) iniciando uma cascata de peroxidação lipídica e a formação de radicais livres, o qual é conhecido como estresse oxidativo.

Em princípio o estresse oxidativo é ocasionado por uma redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular (ex. mutações afetando enzimas de defesa antioxidantes como a superóxido dismutase (CuZnSOD), glutathione peroxidase (MnSOD). A produção elevada de ROS/RNS (espécies nitrogênio reativas) ocorrem em várias situações, como a exposição a concentrações elevadas de oxigênio, a presença de toxinas que são metabolizadas produzindo

ROS/RNS ou excessiva ativação dos sistemas naturais de ROS/RNS como a ativação de células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL, 2004)

As ROS podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (peroxidação dos lipídeos). O alvo celular primário pode variar, dependendo na célula, do tipo de estresse imposto e quão severo é esse estresse (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Assim, a produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (SHAMI, 2004)

A dieta é, sem dúvida, um fator de grande importância na modulação do estresse oxidativo. Os efeitos da suplementação de vitaminas e minerais antioxidantes sobre o estresse oxidativo não são ainda conclusivos, sobretudo em relação à dose e ao tempo de suplementação. No entanto, os estudos de suplementação têm conseguido demonstrar efeitos positivos sobre biomarcadores específicos, sendo os relacionados à oxidação de lipídeos (malondialdeído e isoprostanos) os de maior relevância (BARBOSA *et al.*, 2010).

Desta forma, a adição de um composto natural com precursores antioxidantes na dieta de galos reprodutores, busca modular o estresse oxidativo, presente na célula espermática.

2.6 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias como vitaminas, minerais, pigmentos naturais, aminoácidos, ácidos graxos e outros compostos vegetais, os quais bloqueiam ou neutralizam o efeito danoso provocado pelos radicais livres (WILHELM-FILHO, 1994).

Atingir o potencial máximo de fertilidade requer a combinação ótima de fosfolipídios e uma proteção adequada com antioxidantes. Em aves de maior idade ocorrem mudanças na composição dos fosfolipídios e uma queda na atividade antioxidante enzimática da glutathione peroxidase (KELSO *et al.*, 1996).

Nas células, os antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes naturais e é o primeiro sistema a agir. Esse sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD); peroxirredoxinas, glutathione (GSH), glutathione redutase (GSH redutase), glutathione peroxidase (GSH peroxidase) e catalase (CAT). O sistema não enzimático inclui vários compostos hidrofílicos e lipofílicos, como vitamina C (ácido ascórbico ou ascorbato) e vitamina E (α -tocoferol), além de diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico. Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem sua oxidação. Desse modo, os antioxidantes atuam como protetores contra a oxidação de biomoléculas por radicais livres, impedindo que a reação em cadeia seja avariada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Neste perfil, incluem-se a glutathione reduzida (GSH), o urato, o ácido ascórbico, a vitamina E, a taurina, a hipotaurina, os carotenoides e as ubiquinonas (coenzima Q), o ácido úrico e o ácido lipóico (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

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).

Essa é uma das razões de se haver a necessidade de administração de agentes antioxidantes para preservação e manutenção da qualidade espermática em sêmen de aves submetidos a manipulação, como exemplo a utilização da biotecnica reprodutiva de inseminação artificial (CEROLINI *et al.*, 2005).

De uma maneira em geral, o sêmen de aves contém vitamina E, vitamina C, glutatona peroxidase e a superóxido dismutase como elementos minimizadores da ação da peroxidação lipídica enquanto aqueles mais comumente adicionados são o selênio orgânico e a vitamina E (SURAI, 2003; CEROLINI *et al.*, 2005).

A mitocôndria é a responsável pela produção de energia para manter a motilidade espermática. Durante este processo ocorre a formação de radicais livres. Assim, a presença de antioxidantes nesta região auxilia na neutralização de radicais livres, impedindo a peroxidação lipídica e mantendo a qualidade espermática (RUTZ *et al.*, 2007).

A suplementação na dieta de galos leva ao aumento nas concentrações de vitamina E no sêmen, no testículo e no fígado (SURAI *et al.*, 1997). Com a adição de precursores da vitamina E na dieta de galos, busca-se minimização da peroxidação lipídica na célula espermática.

2.7 Vitamina E

O tocoferol, ou vitamina E, é conhecido como o principal antioxidante lipossolúvel que protege os ácidos graxos poliinsaturados dos tecidos contra a peroxidação. Ele é um potente removedor de radicais peróxil ($\text{LOO}\cdot$) e, provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação em animais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; DROGE, 2002).

O α -tocoferol, apresenta maior atividade biológica quando comparado aos demais compostos, devido ao maior índice de absorção intestinal, maior deposição nos tecidos, menor excreção fecal, além de ser oxidado mais lentamente (BARRETO, 1998; SAMPAIO *et al.*, 2004). Vale ressaltar que a vitamina E, lipossolúvel, é absorvida no intestino delgado juntamente com os lipídios da dieta e outras vitaminas lipossolúveis. A princípio, ela tem o papel de proteção do epitélio germinativo dos testículos contra degeneração, entretanto a suplementação dessa vitamina pode ocasionar redução das reservas de outras vitaminas lipossolúveis, por

reduzir sua absorção e, conseqüentemente, prejudicar o desempenho reprodutivo animal (ZANINI, 2001).

O principal problema associado à inclusão de ácidos poli-insaturados n-3 é que estes são propensos à oxidação ou ao ataque de radicais livres e é necessária sua associação com antioxidantes. A vitamina E e o selênio são antioxidantes naturais e componentes-chave para reduzir a peroxidação lipídica (SURAI *et al.*, 2000). A vitamina E evita a peroxidação dos PUFA que ocorrem nas membranas celulares e combate os radicais livres formados (SURAI, 2002).

A habilidade do tocoferol na inibição da lipoperoxidação da membrana espermática também já foi demonstrada no sêmen fresco (CEROLINI *et al.*, 2000). A vitamina E exerce algumas funções no organismo animal atuando como mais importante antioxidante metabólico presente nas membranas celulares, protegendo-a da oxidação de ácidos graxos e do colesterol, além de diminuir ou inibir a produção e ação dos radicais livres (GUERRA *et al.*, 2004; NAVARRO *et al.*, 2009).

Os antioxidantes naturais, incluindo a vitamina E, o selênio e os carotenóides, possuem também um importante papel na reprodução aviária (FREISLEBEN e PACKER, 1993). A vitamina E melhora a qualidade do sêmen e a habilidade de fertilização em machos, o que previne a peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (BISWAS *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, leva a um aumento na concentração espermática, melhora a motilidade, bem como o *status* antioxidante do sêmen, e reduz anormalidades (EID *et al.*, 2006). Naturalmente encontrada no esperma de galos e perus, a vitamina E está envolvida na manutenção da integridade e da motilidade espermáticas (DONOGHUE & DONOGHUE, 1997), e sua suplementação na dieta de matrizes permite o aumento na performance reprodutiva destas.

2.8 Óleo-resina de copaíba

O emprego de antioxidantes sintéticos em alimentos tem sido relacionado a efeitos deletérios ao organismo humano e, por isso, desde a década de 1990 até o presente momento, tem aumentado a preocupação no sentido de obter substâncias naturais que tenham função antioxidante com a mesma eficiência dos sintéticos. (PASSOTO, 1998). Neste contexto, cresce o interesse no estudo da aplicação de

fontes naturais antioxidantes, também pela característica que a forma natural apresenta disponibilidade, aproximadamente, duas vezes maior que a sintética. (BURTON, *et al.* 1998).

Diversas plantas estão sendo empregadas como aromáticas e fitoterápicas. Assim, extratos e óleos essenciais, extraídos dessas plantas têm sido relatados como antioxidante (BOTSOGLOU *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2013). Algumas fontes vegetais têm sido utilizadas na alimentação de aves, na busca pela melhoria do desempenho e da qualidade dos ovos (BOTSOGLOU *et al.*, 2012).

O interesse pelo uso de substâncias naturais como antioxidantes é decorrente da sua baixa toxicidade e forte atividade, em comparação aos compostos sintéticos (ROCKENBACH *et al.*, 2007).

A qualidade de muitos antioxidantes vem sendo questionada, tendo em vista o favorecimento de efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH *et al.*, 2001), e a partir dos anos 80 a busca por antioxidantes naturais aumentou consideravelmente, já que os sintéticos tem sido também restringidos por causarem outros males como aumento do peso do fígado e proliferação do retículo endoplasmático (SIMÃO, 1985; ZHENG & WANG, 2001; MELO & GUERRA, 2002; YILDRIM, MAVI & KARA, 2002).

Para compreender a justificativa da utilização destas plantas é necessário conhecer os componentes químicos produzidos por estas como parte do seu metabolismo. Os metabólitos primários (como a produção de açúcares e lipídios, por exemplo) são encontrados em todas as plantas, enquanto que os metabólitos secundários, que são componentes de defesa das plantas, são encontrados em alguns gêneros ou espécies (HASHEMI & DAVOODI, 2011).

Estas moléculas oriundas do metabolismo secundário (princípios ativos) apresentam estruturas químicas diferentes e modos de ação diferentes que conferem características e efeitos biológicos diferenciados: efeitos anticarcinogênicos, antiinflamatório e antioxidante (WISEMAN *et al.*, 1997).

As pesquisas atuais apontam resultados diferentes quanto a ação destes fitogênicos no crescimento e na saúde animal. Algumas destas, apontam resultados significativos quanto a inclusão dos aditivos fitogênicos no desempenho em frangos de corte (ERTAS *et al.*, 2005; CROSS *et al.*, 2007; PERIC *et al.*, 2008) enquanto em outras pesquisas estes mesmos efeitos não foram observados (OCAK *et al.*, 2008; KOIYAMA, 2012).

Embora, praticamente pouco explorada, essa alternativa tem recebido maior atenção na última década devido ao crescimento constante dos produtos fitofarmacêuticos comercializados, com estimativas comerciais de 124 bilhões de dólares em 1995 (HASHEMI & DAVOODI, 2011). O mercado para melhoradores de desempenho à base de plantas tem aumentado desde a década de 1990, com vendas de óleos essenciais para a UE que chegou a 90 toneladas em 1996 enquanto dez anos mais tarde teve um aumento expressivo de 600 toneladas (GREATHEAD, 2003).

A copaíba (*Copaifera* sp.) é uma árvore de grande porte, encontrada principalmente na região norte do Brasil da qual é possível extrair uma resina oleaginosa muito usada na medicina popular com indicações etnofarmacológicas (LEANDRO, 2012).

O óleo-resina de copaíba é composto por ácidos diterpenos e sesquiterpenos (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005) e apresenta efeitos antiinflamatórios, gastroprotetor, analgésico e antitumoral como também, potencial antioxidante, cujos efeitos são comprovados em diversos estudos como o de Rigamonte-Azevedo *et al.*(2004).

O óleo de copaíba é um líquido transparente, cuja coloração varia do amarelo até o marrom, apresenta cheiro forte, sabor acre e amargo. Estudos fitoquímicos demonstram que os óleos de copaíba são misturas de sesquiterpenos e diterpenos, sendo o ácido copálico e os sesquiterpenos β -cariofileno e α -copaeno, os principais componentes do óleo (LEANDRO, 2012).

Sua constituição é formada por uma parte sólida, cerca de 55% a 60%, os ácidos diterpenos, diluídos em óleo essencial, com princípio volátil, composto principalmente pelos sesquiterpenos. De acordo com Veiga Junior e Pinto, já foram identificados 72 tipos de sesquiterpenos e 27 de diterpenos neste óleo. Isto confere a característica do óleo de copaíba poder ter um potencial antioxidante, por possuir precursores da vitamina E, presentes de forma natural no óleo-resina, melhorando a disponibilidade da sua atuação no organismo da ave.

Visto a grande capacidade que a ação oxidante causa, entre elas os danos irreparáveis sobre os organismos e alimentos, nota-se que a presença de compostos antioxidantes são indispensáveis e que o entendimento dos mecanismos de oxidação são cruciais para a produção de novos compostos antioxidantes mais eficientes e menos danosos a saúde (NOVAES *et al.* 2013).

Os extratos naturais, com constituição antioxidante, como o óleo-resina de copaíba, podem diminuir ainda mais a susceptibilidade do espermatozóide à peroxidação lipídica, podendo auxiliar na preservação dos ácidos graxos poliinsaturados e, desta forma, pode incrementar a motilidade, a integridade de membrana, a fertilidade e a congelabilidade do sêmen.

2.9 Indicadores da eficiência reprodutiva em galos

Os machos correspondem a aproximadamente 10% dos animais dentro de um plantel, porém são fundamentais para o sucesso reprodutivo (LARA, *et al.* 2015). Sendo assim, muita atenção deve ser dada aos mesmos no processo de avaliação na qualidade reprodutiva.

Os procedimentos tradicionalmente utilizados para a avaliação da qualidade espermática incluem a determinação do volume do ejaculado, aspecto (coloração), concentração, motilidade, viabilidade e morfologia celular (DONOGHUE & WISHART, 2000), sendo correlacionados com a capacidade fertilizante do espermatozóide no sêmen. Assim, a avaliação da fertilidade de cada reprodutor é de extrema relevância, sendo necessários métodos precisos e de baixo custo (SOARES; BELETTI, 2003). Em estudos realizados por Bongalhardo *et al.* (1994) foi encontrada correlação entre características seminais de galos e fertilidade dos ovos. Portanto, um dos meios utilizados para avaliar a capacidade de fertilização dos galos é o estudo das características seminais.

2.9.1 Produção de sêmen – volume seminal

O ejaculado expelido pela ave apresenta pequeno volume e alta concentração, característica relacionada à inexistência de glândulas bulbo uretrais, próstata e glândulas vesiculares, reduzindo as secreções (GARNER & HAFEZ, 2004).

A produção diária de espermatozoides parece ocorrer em ritmo constante, da mesma forma que o volume do ejaculado. Estes parâmetros são reduzidos quando o sêmen é coletado com maior frequência e com o avançar da idade (ETCHES, 1996).

A produção de sêmen é o indicativo indireto e quantitativo na avaliação de um macho reprodutor, sendo o primeiro parâmetro de observação após a avaliação visual das características fenotípicas dos animais.

Após 40 semanas de idade, ocorre um declínio da fertilidade como consequência da diminuição da produção espermática do galo reprodutor, considerando-se normal uma queda do volume e concentração com o avanço da idade (RUTZ *et al.*, 2007). Entretanto, segundo McDaniel (2002), ao oferecer boas condições aos animais como proporcionar um bom programa de luz, evitar estresse calórico, manter o peso corporal adequado e um bom manejo alimentar, é uma forma de impedir que a idade reduza a fertilidade, sendo estas práticas importantes para manter uma produção normal de espermatozoides durante todo o ciclo produtivo.

Segundo Burke (1996), o sêmen é uma mistura de células espermáticas e líquidos de transporte. Diversos fatores influenciam a produção de sêmen pelos reprodutores. Existem grandes diferenças no início da produção de sêmen e na sua qualidade entre as espécies, linhagens, dentro das espécies e individualmente dentro das linhagens (BAKST & BAHR, 1995). Resende *et al.* (1983), revisando dados de diferentes autores, verificaram grande variação quanto ao que se afirma ser o volume de ejaculado para galos, os mesmos afirmaram que as variações encontradas ocorrem devido ao tipo, linhagem, idade do reprodutor, fatores climáticos, regime alimentar, frequência e tecnologia de coleta. Segundo Gilbert (1982), o volume do ejaculado de galo varia de 0,2 a 0,5 ml. Bakst & Bahr (1995) afirmaram que galos ejaculam em média 0,25 ml, e de acordo com Moraes (2002), o volume varia de 0,5 a 1,0 ml.

Também deve-se levar em consideração o fato de que o material seminal coletado, na maioria das vezes apresenta resíduos dos sistemas digestivo e urinário e as células espermáticas apresentam-se misturadas com líquidos secretados. Estes fatores não são facilmente controláveis e também em consequência disso, consideráveis variações no volume e na composição do sêmen de galos são verificadas.

2.9.2 Motilidade espermática

As características seminais, tais como volume seminal, concentração espermática e motilidade espermática são influenciadas pela idade dos galos, aumentando nas primeiras semanas reprodutivas até alcançar a maturidade sexual completa e, diminuindo após um período de pico de produção (CEROLINI, 1997).

Fatores morfofisiológicos evidenciados na microscopia de luz em preparados de sêmen fresco e diretamente relacionados com o espermatozóide, tais como motilidade, densidade, vitalidade e morfologia espermática, também são usados para avaliação da fertilidade do macho (SOARES; BELETTI, 2003).

Sob um ponto de vista ilustrativo e simplista, o processo que confere motilidade a célula espermática depende da interação entre os microtúbulos presentes na cauda do espermatozóide (motor) e mitocôndrias (combustível) presentes na peça intermediária. Desta forma, a disponibilidade de energia e a integridade da célula, são fatores diretos que contribuem para este índice. (GONÇALVES, *et al.* 2013)

Os espermatozoides possuem algumas características que devem ser identificadas para avaliação e a primeira delas está a motilidade, em que o espermatozóide deve apresentar para atravessar a vagina e alcançar as glândulas hospedeiras de espermatozoides (RUTZ, *et al.* 2007).

Para avaliar os parâmetros da motilidade espermática deve-se verificar utilizando uma diluição do sêmen fresco, e a visualização é através da microscopia óptica, que representa um método de baixo custo e simples a ser utilizado na avicultura. Valores percentuais podem ser atribuídos às amostras de acordo com a intensidade de deslocamento da célula através do campo visual, sendo um método subjetivo, devendo ser sempre realizada pela mesma pessoa.

Bongalhardo *et al.* (2000) observaram acentuado declínio da motilidade com o avançar da idade em galos leves, sendo possível relacionar o declínio deste parâmetro a uma condição fisiológica da espécie.

2.9.3 Concentração espermática

Mesmo apresentando um baixo volume de sêmen, o potencial reprodutivo de uma ave doméstica está condicionado à qualidade do conteúdo secretado. Esta abrange tanto a condição microbiológica quanto o número de células reprodutivas ali presentes. A avaliação da concentração espermática em uma amostra de sêmen determina o número de espermatozóides presentes em mililitros do conteúdo, aproximando ainda mais a avaliação da eficiência reprodutiva de um galo. (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Assim como os demais parâmetros relacionados a qualidade espermática, a concentração de células no ejaculado possui diversos fatores que influenciam seus valores. A idade e a temperatura ambiente, por exemplo, possuem uma correlação negativa com este parâmetro, onde ambos os fatores interferem diretamente nas taxas hormonais influenciando, indiretamente, a espermatogênese (KHAN, 2011).

A formação do plasma seminal e a concentração do sêmen de galos resultam da reabsorção de líquidos no epidídimo, onde os espermatozóides permanecem por mais de 100 minutos (RITCHSON, 2013). Devido à ausência de glândulas acessórias, o ejaculado é composto por uma grande quantidade de células espermáticas suspensas em um pequeno volume de plasma seminal (WHITTOW, 2000), resultando em um sêmen muito concentrado, apresentando de um a cinco bilhões de espermatozóides por mL de ejaculado. Comparativamente, o suíno apresenta de 200 a 300 milhões de espermatozóides por mL, enquanto que no touro essa quantidade não passa de 1,2 milhões de espermatozóides por mL.

Segundo Celeghini *et al.* (2000), ao adicionarem diferentes níveis de vitamina E na dieta de galos, observaram relação entre as diferenças do volume seminal e a concentração espermática. Em que, a concentração espermática apresentou correlação positiva e significativa de 0,29 com o peso corporal em galos.

Surai *et al.* (2000) mencionam que o resultado da concentração espermática está diretamente relacionado ao volume seminal em galos. Da mesma forma, Celeghini *et al.* (2000) observaram uma correlação positiva significativa entre o volume seminal, concentração espermática e número de células totais em galos.

Em trabalhos realizados com suínos por Brezezinska-Slebodzinska *et al.* (1995), observaram que a concentração espermática aumentou com a suplementação de vitamina E na ração de suínos. Por outro lado, segundo Klasing

(1998), altos níveis de vitamina E podem causar deficiência de outras vitaminas lipossolúveis, como, por exemplo, a vitamina A, que tem um papel importante na proteção do epitélio germinativo e manutenção da integridade das células produtoras de testosterona nos machos.

2.9.4 Integridade espermática

A morfologia espermática parece ser uma das mais importantes características qualitativas do sêmen (KUSTER *et al.*, 2004).

Existem certos parâmetros utilizados na rotina de avaliação da fertilidade de reprodutores com a finalidade de identificar algumas alterações espermáticas que podem levar à subfertilidade, tais como alterações na integridade de membrana plasmática, membrana acrossômica e compactação da cromatina no núcleo da célula espermática (SOARES & BELETI, 2006; GONÇALVES, 2013)

A avaliação pode ser um indicador básico para prever a capacidade de fertilização do espermatozóide (Lukaszewics, 1988), seleção de machos e também para definição de armazenamento em meios líquidos ou criopreservação para propósitos e inseminação artificial (DONOGUE & WISHART, 2000; LUKASZEWICS, 2002).

A morfologia espermática pode também servir como um indicador de desordens na espermatogênese. No entanto, a avaliação da morfologia ainda não é utilizada como rotina de campo.

Sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens, métodos de “coloração” empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes) em microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozóides (ARRUDA *et al.*, 2011).

De uma forma geral, as anomalias espermáticas são incompatíveis com a boa fertilidade, qualquer alteração nas características morfológicas pode comprometer a motilidade e a sobrevivência do espermatozóide (MACIEL, 2006).

2.9.5 Potencial fertilizante

O volume de sêmen e a concentração espermática podem ser insuficientes para avaliar a capacidade reprodutiva dos galos, sendo necessário observar os índices de motilidade e a penetração do espermatozóide no óvulo (McDANIEL, 1997), considerando que este deve se deslocar, contra o peristaltismo, da cloaca e fecundar o óvulo nos 15 minutos em que a gema passa pelo infundíbulo (BELLAIRS & OSMOND, 1998).

As avaliações convencionais de qualidade seminal (motilidade, vigor e morfologia espermática) apresentam eficiência relativa, com limitada capacidade de identificar diferenças de menor magnitude, entre machos com potencial de fertilidade mais homogêneo (GADEA, 2005). Essas análises convencionais teriam condições de detectar somente em torno de 44% dos machos com baixa fertilidade (ROCHA *et al.*, 2005).

Os machos subférteis podem, eventualmente, ser utilizados na rotina de programas de inseminação artificial (IA). Além disso, estas avaliações apresentam baixa associação com a fertilidade e são sensíveis a variações de características individuais atribuídas aos machos doadores de sêmen (XU *et al.*, 1998; POPWELL & FLOWERS, 2004; MACEDO *et al.*, 2006, CORCINI *et al.*, 2012). Portanto, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos *in vitro* eficientes no diagnóstico do potencial de fertilização dos espermatozoides de galos.

Um dos métodos utilizados para a avaliação do potencial fertilizante em aves domésticas é o teste de penetração na membrana perivitelínica, que consiste na separação da membrana interna de ovos frescos não férteis e diluição da amostra de sêmen a ser associada a esta porção. Todo o processo ocorre em meio que reflete as condições do oviduto de fêmeas, permitindo que o espermatozóide perfure a membrana, sendo possível visualizar tais orifícios com o auxílio da microscopia (ROBERTSON & WISHART, 1997). O número de espermatozoides na membrana perivitelínea é um indicativo mais acurado em relação a real habilidade fertilizante do espermatozóide (TYLER & BEKKER, 2012).

Na prática é mais fácil modificar a fertilidade do lote incidindo sobre o manejo dos machos do que no das fêmeas. Substituir uma grande porcentagem de fêmeas velhas por jovens sem dúvida melhoraria a fertilidade do lote, mas é óbvio que isto não seria economicamente interessante (CASANOVAS, 2004). A qualidade do

sêmen é um dos melhores indicadores do desempenho reprodutivo. No sêmen existe um número de características vitais que um reprodutor deve possuir para ser bem sucedido. A fertilização requer o sêmen de qualidade suficiente para que o espermatozóide possa para alcançar e penetrar o embrião do ovo (Mc DANIEL, 2001).

Segundo Rezende *et al.* (2014), as reduções de fertilidade nos galos estão ligadas principalmente à diminuição dos estímulos neuroendócrinos à função testicular, ao comprometimento do processo de formação do espermatozóide e à redução das concentrações de espermatozóides no ejaculado. Além destas, tem ainda o ganho de peso excessivo (levando a problemas de pernas e atrofia de testículos), pela seleção genética afetando a conformação estrutural que dificulta a cópula, redução no nível de energia (ROBINSON *et al.*, 2003), sazonalidade, ambiência, idade x peso, relação macho/fêmea e problemas de pés (lesões de coxim plantar).

Segundo Rutz *et al.* (2007), o armazenamento de espermatozóides nas glândulas hospedeiras pode ser quantitativamente avaliado; junto a capacidade dos mesmos de se ligar à membrana perivitelínica pode ser avaliada *in vitro*. Esta capacidade pode ser avaliada usando um extrato solubilizado da camada perivitelínica da gema para determinar a ligação espermática *in vitro* (BARBATO *et al.*, 1998); Assim, o número de espermatozóides presentes no local da fertilização no momento da ovulação pode ser estimado.

Para avaliar a capacidade fertilizante do espermatozóide, e assim predizer o desempenho do macho para gerar o pintinho na indústria de aves, é necessário que a célula seja capaz de ligar-se e penetrar a membrana perivitelínea do óvulo para efetivar a fertilização. Desta forma, o teste de penetração é o último e decisivo critério para o descarte de galos, predizendo o potencial reprodutivo da ave doméstica.

O objetivo deste estudo é testar o efeito do óleo-resina de copaíba na incubação, avaliando a capacidade de impedir a atuação de radicais livres sobre as células, evitando a formação de lesões e perda de integridade celular sobre a capacidade de adesão e penetração *in vitro* de espermatozóides na membrana perivitelina interna de ovos de galinhas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Local

O projeto foi realizado no biotério central localizado na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) *campus* Capão do Leão, na cidade de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

3.2 Período experimental

O período experimental compreendeu o intervalo entre o dia 01 de setembro de 2015 até o dia 13 de outubro de 2015. As aves foram alojadas em boxes experimentais com dimensões de 70 x 70 x 70 (L x C x A) no local supracitado, totalizando 6 semanas experimentais, compreendendo a fase de reprodução de 40 a 46 semanas de idade das aves.

3.3 Animais

Inicialmente foram utilizadas 40 aves, machos, semi-pesados, com 40 semanas de idade, provenientes de uma granja comercial localizado no município de Concórdia-SC.

As aves foram selecionadas para dar início ao experimento de acordo com os parâmetros reprodutivos, permanecendo 40 machos para as avaliações experimentais. A seleção considerou os seguintes parâmetros: produção de sêmen, utilizando-se animais homogêneos para ambos os tratamentos.

Todos os galos foram treinados durante 30 dias, 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.

3.4 Dietas experimentais

Foi utilizada uma ração comercial elaborada para atendimento das exigências nutricionais de aves reprodutoras (Tabela 1) como dieta basal para ambos os tratamentos.

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais.

| Composição nutricional das dietas experimentais | | | |
|--|------|--------|--------|
| Umidade | Máx. | 130,0 | g/kg |
| Cálcio | Min. | 30,0 | g/kg |
| Cálcio | Máx. | 44,0 | g/kg |
| Fósforo | Min. | 4000,0 | mg/kg |
| Sódio | Min. | 1400,0 | mg/kg |
| Lisina | Min. | 8500,0 | mg/kg |
| Metionina | Min. | 3400,0 | mg/kg |
| Cobre | Min. | 8,0 | mg/kg |
| Ferro | Min. | 46,0 | mg/kg |
| Flúor | Max. | 25,0 | mg/kg |
| Iodo | Min. | 0,98 | mg/kg |
| Mananês | Min. | 63,0 | mg/kg |
| Selênio | Min. | 0,28 | mg/kg |
| Zinco | Min. | 48,40 | mg/kg |
| Ácido nicotínico | Min. | 15,0 | mg/kg |
| Ácido pantotênico | Min. | 6,0 | mg/kg |
| Colina | Min. | 130,0 | mg/kg |
| Vitamina A | Min. | 7040,0 | UI/kg |
| Vitamina B12 | Min. | 6,0 | mcg/kg |
| Vitamina B1 | Min. | 1,0 | mg/kg |
| Vitamina B2 | Min. | 2,3 | mg/kg |
| Vitamina B6 | Min. | 1,25 | mg/kg |
| Vitamina D3 | Min. | 1700,0 | UI /kg |
| Vitamina E | Min. | 5,2 | UI /kg |
| Vitamina K3 | Min. | 1.2 | mg/kg |
| Fitase | Min. | 500,0 | mg/kg |

Composição qualitativa: Farelo de soja, farelo de trigo, milho integral moído, calcário calcítico, cloreto de sódio, farinha de conchas de ostra tipo 2, fosfato bicálcico 95%, Metionina, Carbo Amino Fosfoquelato de cobre, Carbo Amino Fosfoquelato de ferro, Carbo Amino Fosfoquelato de Ferro, Carbo Amino Fosfoquelato de Manangês, Carbo Amino Fosfoquelato de Manganês, Carbo Amino Fosfoquelato de Zinco, Iodato de Cálcio, Ácido Nicotínico, Ácido Pantotênico, Cloreto de colina, Fitase, Vitamina A, Vitamina B1, Vitamina B12, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina D3, Vitamina E e Vitamina K3. Peso líquido: 40 Kg

3.6 Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram divididos em dois grupos: Controle (C), representado pelas aves alimentadas com a dieta padrão, a base de farelo de milho e soja; e outro tratamento representado pelas aves alimentadas com a dieta padrão acrescida de 3,68 gramas de óleo-resina de copaíba *on top*, homogêneo em 25 Kg de ração, projetando um consumo diário/ave de 25 mg de óleo-resina/dia.

3.7 Programa de luz

A luminosidade das salas foi fornecida artificialmente por lâmpadas incandescentes intercaladas por toda extensão acima de cada sala. Nos primeiros quinze dias após o alojamento, foram fornecidas 10 horas de luz diárias, com intensidade luminosa de 100 lux. Após procedeu-se com o aumento gradativo do número de horas de luz, atingindo 15 horas, permanecendo o mesmo programa de iluminação até o final do período experimental. O horário de acendimento foi controlado por relógio tipo *timer* automático regulado conforme descrito acima.

3.8 Instalações

O Biotério da UFPEL possui uma área de aproximadamente 100m². Foram utilizadas duas salas que contêm uma área de 36m², cada sala abrigando 20 boxes. As aves foram alocadas individualmente em boxes experimentais com dimensões de 70 x 70 x 70 (L x C x A). A cama era de maravalha com altura de aproximadamente 10 cm. Em cada box existia um bebedouro do tipo *nipple* e um comedouro do tipo calha.

3.9 Manejo alimentar

A água foi disponibilizada por bebedouros tipo *nipple*, permanecendo um bico por box. A ração foi fornecida manualmente em comedouros do tipo calha. Da chegada das aves até a quarta semana, a ração foi fornecida a vontade, restringindo o volume após este período.

As aves foram divididas em dois tratamentos, distribuídos ao acaso, 20 galos por tratamento. Ao iniciar o experimento, a quantidade de ração foi estabelecida de acordo com a exigência nutricional de machos reprodutores. As aves receberam a quantidade de 170 gramas de ração diariamente, do início ao fim do experimento. A quantidade de óleo-resina de copaíba para o Tratamento 2, foi calculada pela média de peso vivo (kg) do lote, em que cada ave consumiu 25 mg de óleo-resina de copaíba por dia.

3.10 Coleta de dados

3.10.1 Avaliações laboratoriais

Coleta de sêmen

A coleta de sêmen foi realizada rotineiramente 2 vezes por semana através de massagem abdominal (BURROWS e QUINN, 1937). A primeira coleta da semana tinha por objetivo de eliminar o sêmen armazenado. As análises reprodutivas foram feitas com o sêmen da segunda coleta, no primeiro horário da manhã. Foi coletado sêmen de 40 galos, sendo cada galo com seu respectivo tubo falcon (graduado) e identificado com o número da ave.

As amostras foram usadas sem seleção conforme quantidade, apenas excluindo-se aquelas que apresentavam contaminação por sangue ou resíduos cloacais.

Após a coleta de sêmen, este era armazenado em caixa de isopor, com o objetivo de conservação da temperatura. A avaliação do sêmen foi realizada no Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves (LABRA), no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPEL, e também no Laboratório de Reprodução Animal (REPROPEL), na Faculdade de Medicina Veterinária, UFPEL.

Volume de sêmen

Logo após a coleta, o primeiro parâmetro avaliado foi o volume de sêmen produzido. Esta graduação era obtida observando diretamente no tubo de coleta com as marcações (tubo graduado de 15 ml).

Motilidade espermática

Seguindo a técnica de Bearden e Fuquay (1997), após homogeneizar a amostra de sêmen, foi colocado 5µl de sêmen e 5µl de diluente, sob lâmina com lamínula. O diluente utilizado para avaliar a motilidade espermática foi 0,9% de NaCl. A motilidade foi avaliada em microscópio, com objetiva de 40x (aumento de 400x). Foi utilizada para avaliar, uma escala de 0 a 100%, sendo sempre necessária a presença do mesmo avaliador para esta técnica, por ser uma técnica subjetiva. A avaliação foi feita sempre em duplicata em, uma lâmina com duas gotas.

Concentração espermática

A concentração de espermatozóides foi realizada por espectrofotometria de transmitância convertendo-se os valores obtidos para bilhões de espermatozóides por mililitro de sêmen (bilhões/mL).

Integridade de membrana espermática

A integridade de membrana foi avaliada através do corante SYBR-14 + PI (Live/Dead Sperm Viability), o qual prediz o potencial fertilizante de amostras de sêmen (SEIGNEURIN; BLESBOIS, 1995). Antes de cada avaliação as amostras foram ajustadas, adicionando 5µl de sêmen puro de cada galo em tubos eppendorf contendo 500µl de diluente de Lake, previamente identificados. Imediatamente, adicionou-se o SYBR-14 e PI nestas amostras. O procedimento foi realizado em uma sala escura, para proteger os corantes do contato direto com a luz.

Esta avaliação foi realizada em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha ou verde/vermelha foram consideradas lesadas.

Integridade de DNA

Avaliado pela técnica descrita por Evenson *et al.* (1999). Em uma alíquota de 2µL de sêmen foi adicionou-se 10µL de TNE, após 30 segundos adicionou-se 100µL de Triton 1x e após 30 segundos, adicionou-se 50µL de Acridine Orange (2 mg/mL em H₂O deionizada). Após 5 minutos de incubação, o material foi avaliado em microscópio de epifluorescência sob aumento de 1000x. Foram consideradas células com DNA normal (bicatenário) aquelas que apresentavam fluorescência verde e quando a célula apresentava coloração vermelha ou amarelada foi considerado DNA desnaturado (monocatenário). As lâminas foram avaliadas sob um aumento de 400 x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP) em filtro WU com excitações de 450 – 490nm e emissão de 516 - 617nm.

Integridade de acrossoma

Foi realizada segundo o protocolo de (Kawamoto *et al.*, 1999) onde inicialmente amostras com 20µL foram centrifugadas a 300 G por 10min, sendo o sobrenadante retirado e desprezado. A partir dessas amostras foram confeccionados esfregaços em lâminas onde depois de secas, foram submersas em álcool etílico absoluto, para que houvesse a fixação das células na lâmina, por 5min, posteriormente eram lavadas em PBS. Em uma sala escura, foi adicionado às amostras, 20µL de *Lectin from arachis hypogaea FITC Conjugate* (20 mg/mL), que permanecia por 10 min sobre as lâminas. Posteriormente, as lâminas eram lavadas em água deionizada e drenadas. As lâminas foram avaliadas sob um aumento de 1000 x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP) em filtro WU com excitações de 450-490nm e emissão de 516 – 617 nm. As células com acrossoma que não apresentavam rugosidades, vacúolos e emitiam fluorescência verde foram consideradas íntegras, distinto desses padrões, foram classificadas como células com acrossoma danificado.

Teste de penetração espermática

Após as análises descritas acima, o sêmen foi diluído com diluente de Lake (LAKE, 1968) e colocado na geladeira. A penetração espermática foi estimada *in vitro* através da técnica de incubação do espermatozóide com a membrana perivitelina interna do ovo (IPVL) de galinha, conforme descrito por Robertson e Wishart (1997). O sêmen analisado foi diluído à 5×10^7 sp/ml e incubado em banho-maria à 40°C por 10 min. As membranas foram colocadas em pocinhos contendo 600 µl de Dulbecco's Eagle's Medium (MEM), meio modificado com HEPES, aquecido à 40°C. Após, foi adicionado 200 µl do sêmen para os pocinhos contendo MEM e IPVL (concentração final de $1,25 \times 10^7$ sp/ml) permanecendo incubados por 5 minutos em banho-maria à 40°C com agitação. As membranas foram então lavadas com cloreto de sódio à 0,9% para remoção dos espermatozoides. As lâminas foram preparadas e observadas ao microscópio de campo claro (Olympus BX-41). Três campos de cada lâmina foram fotografados para posterior contagem do número de furos visíveis, convertidos por fim na unidade de mm^2 .

3.11 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o de medidas repetidas no tempo; os galos foram distribuídos ao acaso nos boxes. O experimento teve duração total de 6 semanas. Cada galo representou uma unidade experimental e cada semana uma repetição. As aves foram divididas em dois grupos (vinte animais por tratamento): grupo controle (ração padrão galo semi-pesado), e grupo suplementado com óleo-resina de copaíba.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), usando o programa estatístico SAS e a diferença entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, utilizando a probabilidade ($p < 0,05$).

O modelo estatístico utilizado foi: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \rho_{k(i)} + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ij}$, onde:

y_{ijk} = é a variável resposta na j -ésima unidade experimental submetida ao i -ésimo tratamento na k -ésima semana;

μ = média geral;

α_i = é o efeito do i-ésimo tratamento ($i= 1, 2$);

$\rho_{k(i)}$ = representa o efeito aleatório da j-ésima unidade experimental dentro do i-ésimo tratamento;

β_j = é o efeito da k-ésima semana ($j=1, \dots, 6$);

$\alpha\beta_{ij}$ = é o efeito da interação entre o i-ésimo tratamento com a k-ésima semana;

e_{ij} = é o efeito aleatório residual

Após a análise dos resíduos verificou-se a normalidade das variáveis, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Houve necessidade de transformação dos dados utilizando a fórmula arco seno para as variáveis em percentagem, para ajustar a normalidade das variáveis medidas em percentagem. Não foi observada a normalidade para nenhuma das variáveis estudadas mesmo com a transformação, sendo assim, foi utilizado um teste não paramétrico de kruskal-wallis para análise das variáveis. Para uma melhor visualização dos resultados, os dados que estão sendo mostrados são os originais.

4 Resultados e Discussão

4.1 Características espermáticas - análises do sêmen fresco

4.1.1 Volume seminal

As médias dos tratamentos para a variável volume seminal foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O resultado não foi significativo ($P > 0,05$), isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com o volume seminal.

Tabela 2. Volume seminal (ml) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

| Idade (semanas) | Tratamento 1 | Tratamento 2 | Efeito |
|-----------------|--------------|--------------|--------|
| 41 | 0,62 ± 0,08 | 0,69±0,07 | NS |
| 42 | 0,53 ± 0,05 | 0,54±0,04 | NS |
| 43 | 0,56 ± 0,07 | 0,55± 0,04 | NS |
| 44 | 0,46±0,08 | 0,41± 0,03 | NS |
| 45 | 0,49 ±0,05 | 0,61 ±0,05 | NS |
| 46 | 0,43 ± 0,05 | 0,37 ±0,04 | NS |

NS = não significativo ($P < 0,05$). Médias ± erro padrão

O volume de sêmen produzido às 40 semanas de idade dos galos semi-pesados, pode explicar os resultados obtidos neste trabalho. Fisiologicamente, as características reprodutivas como o volume seminal são influenciadas pela idade dos galos, aumentando nas primeiras semanas reprodutivas até alcançar a maturidade sexual completa (CEROLINI *et al.*, 1997; CELEGHINI *et al.*, 2001). Sugere-se que o maior volume seminal esteja relacionado a linhagem semi-pesada, o qual foi encontrada por Lake & Steward (1978), Rouvier *et al.* (1984), e Etches

(1994), os quais verificaram uma variação entre 0,08 e 0,50 ml para galos de linhagem semi-pesada.

Segundo Bezerra *et al.*(2015), utilizando galos da linhagem semi-pesada, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) no volume seminal entre níveis de inclusão de óleo de copaíba na ração (0,10; 0,15 e 0,20%) em que se obteve aumento de 0,32 a 0,50 ml de volume seminal, discordando dos resultados obtidos neste trabalho, o que pode ser justificado pela diferença de dosagens de óleo de copaíba ofertadas aos galos.

Já, em um trabalho por Rouvier *et al.* (1984), observaram uma variação entre 0,05 e 0,30 ml, todavia, sem apresentar diferenças significativas. Juntamente com Rodenas *et al.*, 2005, também não foi observada interação significativa ($P > 0,05$) entre os tipos de óleo e os níveis de vitamina E para o volume de sêmen nas idades de 28 e 29 semanas de galos, o que

Desta forma, a suplementação de lipídios via óleos vegetais possui estrita função de estímulo e auxílio na produção de espermatozóides, características que evidenciam sua importância na composição de dietas para galos reprodutores, a fim de se otimizar a produção de volume seminal a ser ejaculado (McDANIEL *et al.*, 1998; BRAGA & BAIÃO, 2001; JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Com isso, o incremento de pesquisas é de grande importância, para que busquem maiores comprovações dos níveis seguros do óleo-resina de copaíba na ração de galos, podendo efetuar um maior impacto na qualidade seminais destes reprodutores.

4.1.2 Motilidade espermática

As médias dos tratamentos para a variável motilidade espermática foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O resultado não foi significativo ($P > 0,05$), isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com a motilidade espermática.

Tabela 3. Motilidade espermática (%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

| Idade (semanas) | Tratamento 1 | Tratamento 2 | Efeito |
|-----------------|--------------|--------------|--------|
| 41 | 72,53 ± 5,91 | 78,75±3,85 | NS |
| 42 | 81,39 ± 3,79 | 72,50±5,06 | NS |
| 43 | 85,00±2,77 | 87,25±2,39 | NS |
| 44 | 75,00±5,66 | 78,75±3,77 | NS |
| 45 | 75,00±4,93 | 69,47±3,99 | NS |
| 46 | 70,93±5,91 | 75,26±4,93 | NS |

NS = não significativo ($P < 0,05$). Médias ± erro padrão

Estes dados concordam com Bezerra *et al.* (2015) no qual também não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) na variável motilidade, entre níveis de inclusão de óleo de copaíba (0,10 e 0,20%) nas rações dos galos.

A motilidade espermática tem sido correlacionada à presença de lipídeos poliinsaturados (CEROLINI *et al.*, 2003) e ao nível de proteína da dieta (Revington *et al.*, 1991). Sobre a motilidade espermática, Rufino *et al.* (2015) que trabalhando com galos em diferentes faixas de peso corporal, observaram diferenças significativas nas variáveis motilidade e vigor espermático.

Pelo potencial antioxidante, cujos são comprovados em diversos estudos como o de Rigamonte-Azevedo *et al.* (2004) e por ser composto por ácidos diterpenos e sesquiterpenos (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005), pode-se inferir que o uso de óleo-resina de copaíba poderia apresentar efeito de proteção, nos ácidos graxos poliinsaturados que fazem parte da membrana dos espermatozoides, melhorando a motilidade espermática. Porém, neste trabalho não foi observada diferença significativa na motilidade espermática de galos.

4.1.3 Concentração espermática

As médias dos tratamentos para a variável concentração espermática foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O resultado não foi significativo ($P > 0,05$), isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com a concentração espermática.

Tabela 4. Concentração espermática ($\times 10^9$ esp/ml) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

| Idade (semanas) | Tratamento 1 | Tratamento 2 | Efeito |
|-----------------|-----------------|-----------------|--------|
| 41 | 2,13 \pm 0,22 | 1,93 \pm 0,20 | NS |
| 42 | 2,43 \pm 0,27 | 2,47 \pm 0,24 | NS |
| 43 | 2,43 \pm 0,23 | 2,42 \pm 0,20 | NS |
| 44 | 2,43 \pm 0,21 | 2,62 \pm 0,20 | NS |
| 45 | 2,21 \pm 0,25 | 2,28 \pm 0,23 | NS |
| 46 | 1,42 \pm 0,25 | 1,81 \pm 0,29 | NS |

NS = não significativo ($P < 0,05$). Médias \pm erro padrão

Neste trabalho não houve diferença significativa com a adição do óleo-resina de copaíba na dieta de galos, o que discorda com Bezerra *et al.*, 2015, onde foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre níveis de óleo de copaíba sobre a concentração espermática, onde a inclusão do supracitado óleo nas rações (0,10; 0,15; 0,20%) proporcionou redução gradativa da concentração de espermatozoides.

Surai *et al.*, (2000) no qual menciona que o resultado da concentração espermática está diretamente relacionado ao volume seminal em galos. Da mesma forma, Celeghini *et al.* (2000) observaram uma correlação positiva significativa entre o volume seminal, concentração espermática e número de células totais em galos.

Após os galos atingirem uma maturidade sexual, a produção espermática é estabilizada, e por isso não era esperado que ocorressem diferenças significativas na concentração espermática dos galos. A produção espermática, e conseqüentemente a concentração de espermatozoides, é relacionada ao peso do testículo (ETCHES, 1996).

Neste sentido, há uma tendência de redução na concentração espermática quando ocorre um aumento no volume seminal (GARNER & HAFEZ, 2004), característica que não foi observada nos resultados deste estudo.

O óleo-resina de copaíba possui entre seus compostos, precursores antioxidantes, terpenos e diterpenos, que são similares a vitamina E. Assim, poderia atuar na melhora da qualidade do sêmen e a habilidade de fertilização em machos, o que previne a peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (Biswas *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, levar a um aumento na concentração espermática,

bem como o *status* antioxidante do sêmen (Eid *et al.*, 2006). Porém, não foi observado este efeito com a adição *on top* do óleo-resina de copaíba na dosagem estudada, não sendo observada mudança na concentração espermática dos reprodutores.

4.1.4 Integridade de membrana espermática

As médias dos tratamentos para a variável integridade de membrana espermática foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O resultado não foi significativo ($P > 0,05$), isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com a integridade de membrana espermática.

Tabela 5. Integridade de membrana espermática (%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

| Idade (semanas) | Tratamento 1 | Tratamento 2 | Efeito |
|--------------------|--------------|--------------|--------|
| 41 | 60,23 ± 5,73 | 70,75 ± 4,17 | NS |
| 42 | 81,11 ± 0,65 | 88 ± 0,98 | NS |
| 43 | 86,72 ± 2,57 | 85,6 ± 2,70 | NS |
| 44 | 76,57 ± 2,99 | 70,4 ± 3,35 | NS |
| 45 | 93,5 ± 0,77 | 94,05 ± 0,65 | NS |
| 46 | 64,52 ± 3,27 | 72,21 ± 2,23 | NS |

NS = não significativo ($P < 0,05$). Médias ± erro padrão

O espermatozóide é formado por diferentes estruturas necessárias ao seu perfeito funcionamento. A célula espermática, quando depositada no trato reprodutor feminino, adquire movimento, sem que isto ateste a condição de viabilidade, podendo apresentar lesões em diferentes compartimentos, como nas membranas plasmática, do acrossoma e das mitocôndrias, em detrimento da cinética apresentada (SILVA *et al.*, 2009b). Para a avaliação da integridade destas estruturas, diferentes métodos e técnicas foram desenvolvidos, visando determinar sua preservação e funções.

Em um trabalho realizado com a qualidade interna de ovos, foi verificada, nas membranas celulares do magno, as quais são formadas basicamente por fosfolípidios e proteína, o óleo-resina atuou como barreira seletiva, regulando o fluxo de moléculas (VANDER *et al.*, 1981). Portanto, essa afirmação reforça a hipótese de que a copaíba poderia atuar como um antioxidante lipossolúvel na membrana do espermatozóide.

Assim como ocorreu na qualidade interna de ovos, protegendo a membrana das células secretoras presentes no interior das pregas primárias, permitindo a liberação e deposição de mais proteínas no albúmen (JOSEPH *et al.* 2000).

Por ter precursores antioxidantes em sua constituição, o óleo-resina possui características que poderiam estar envolvidas na proteção direta das células espermáticas de danos morfológicos. A integridade de membrana espermática total dos espermatozoides poderia ser preservada, porém, não foi observado neste trabalho, alterações na integridade de membrana dos espermatozoides com a adição do óleo-resina na dieta de galos.

4.1.5 Integridade de acrossoma

As médias dos tratamentos para a variável integridade de acrossoma foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O resultado não foi significativo ($P > 0,05$), isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com a integridade de acrossoma.

Tabela 6. Integridade de acrossoma(%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

| Idade (semanas) | Tratamento 1 | Tratamento 2 | Efeito |
|-----------------|--------------|--------------|--------|
| 43 | 85,8 ± 2,63 | 83,6 ± 1,93 | NS |
| 44 | 76,36 ± 2,15 | 79 ± 1,69 | NS |
| 45 | 86,61 ± 1,31 | 87,74 ± 0,92 | NS |
| 46 | 67,88 ± 3,57 | 75 ± 2,58 | NS |

NS = não significativo ($P < 0,05$). Médias ± erro padrão

A avaliação do estado acrossomal do espermatozóide é um item muito importante da avaliação do sêmen, tendo em conta o papel desta estrutura na manutenção da capacidade dos espermatozóides para penetrar na zona pelúcida do óvulo (em mamíferos) ou do envelope de ovo (de aves) e a capacidade de se fundir com a membrana plasmática do ovo. As células devem manter uma acrossoma íntegro para garantir que a reação possa ocorrer no momento adequado e facilitar a fertilização (ESTEVES, *et al.* 2007).

Em um estudo feito por Partyka *et al.* (2010), foi observado que a maioria dos espermatozóides de galos com acrossomas rompidos se encontravam mortos (71%), não foi observado um aumento significativo no percentual de espermatozóides vivos com acrossoma rompidos. Assim, lesões de acrossoma podem ser pouco frequentes na população de espermatozóides vivos.

Neste trabalho, pela característica antioxidante e de proteção contra danos oxidativos, o óleo-resina de copaíba poderia atuar a nível de membrana acrossômica, interferindo na melhora da capacidade do espermatozóide ligar-se ao ovo. Porém, não foi vista diferença significativa entre os tratamentos avaliados.

4.1.6 Integridade de DNA

As médias dos tratamentos para a variável integridade de DNA foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O resultado não foi significativo ($P > 0,05$), isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com a integridade de DNA.

Tabela 7. Integridade deDNA(%) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

| Idade (semanas) | Tratamento 1 | Tratamento 2 | Efeito |
|-----------------|--------------|--------------|--------|
| 43 | 96,94±0,90 | 97,45± 0,85 | NS |
| 44 | 100± 0 | 100±0 | NS |
| 45 | 99,88±0,07 | 99,21±0,63 | NS |
| 46 | 95,94±2,25 | 91,79± 2,87 | NS |

NS = não significativo ($P < 0,05$). Médias \pm erro padrão

Os ensaios usados para determinar a ocorrência da fragmentação de DNA dos espermatozoides foram incorporados na prática clínica nos últimos anos. Estes testes foram validados com sucesso como ferramentas úteis para prever o potencial reprodutivo do macho (HAMMADEH *et al.* 1999; KASIMANICKAM *et al.*, 2006)

As avaliações de qualidade de sêmen convencionais não fornecem informações sobre o estado de DNA, embora a integridade do DNA seja importante para evitar danos a nível de fertilização, de desenvolvimento embrionário, e de resultados reprodutivos (PARTYKA *et al.*, 2010).

As espécies reativas ao oxigênio geradas durante o estresse oxidativo da célula espermática são capazes de induzir danos ao DNA (TWIGG *et al.* 1998). Desta forma, o óleo-resina de copaíba poderia atuar inibindo a ação oxidativa sobre a integridade do dna, provavelmente pelo seu potencial antioxidante referente a presença de compostos semelhantes ao da vitamina E, prevenindo contra a peroxidação lipídica e oferecendo um efeito protetor à célula espermática. Porém, não ocorreu diferença significativa nesta avaliação, na qual não se encontra atualmente informações de outros autores que refere sobre a integridade de DNA com adição de óleo-resina de copaíba na dieta de galos reprodutores.

No entanto, é evidente que a avaliação de múltiplas características são necessárias para avaliar o estado funcional dos espermatozoides. A avaliação de DNA proporciona uma informação adicional, complementar aos parâmetros seminais tradicionais, contribuindo para uma avaliação mais completa do sêmen (GLIOZZI *et al.*, 2011).

4.1.7 Teste de penetração espermática

As médias dos tratamentos para a variável teste de penetração espermática (número de orifícios na membrana perivitelina interna) foram comparadas pelo Teste de Tukey utilizando a probabilidade ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O resultado não foi significativo ($P > 0,05$), isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com o número de orifícios na membrana perivitelina interna.

Tabela 8. Número de orifícios na membrana perivitelina interna (furos/mm²) de galos alimentados no período de 40 a 46 semanas, com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2).

| Idade (semanas) | Tratamento 1 | Tratamento 2 | Efeito |
|-----------------|--------------|--------------|--------|
| 41 | 10,69 ± 3,24 | 31,87 ± 7,12 | NS |
| 42 | 9,73 ± 0,88 | 10,19 ± 1,72 | NS |
| 43 | 7,28 ± 0,99 | 10,46 ± 1,28 | NS |
| 44 | 40,33 ± 6,42 | 35,08 ± 5,87 | NS |
| 45 | 41,06 ± 8,01 | 33,85 ± 7,02 | NS |
| 46 | 35,32 ± 7,18 | 50,12 ± 7,84 | NS |

NS = não significativo ($P < 0,05$). Médias ± erro padrão

Através do teste de penetração espermática, se pode obter uma estimativa da fertilidade individual ou de um grupo de aves, por meio da avaliação do número de orifícios na membrana interna (MPI) de ovos frescos (BRAMWELL *et al.*, 1995).

A manipulação da dieta causa alterações na composição de PUFAS na membrana dos espermatozoides (BLESBOIS *et al.*, 1997; KELSO *et al.*, 1997), com efeito direto sobre as variáveis seminais (CEROLINI *et al.*, 2005).

Os aditivos fitogênicos são substâncias derivadas de plantas medicinais ou de especiarias (óleo essencial, extrato vegetal, óleo resina), que têm efeito positivo sobre a produção e a saúde dos animais (PERIC *et al.*, 2009), além de melhorar a qualidade dos alimentos derivados desses animais (PERIC *et al.*, 2009; MARCINČÁK *et al.*, 2011).

Segundo Kamel *et al.* (2000), os extratos herbais podem estimular as enzimas digestivas, aumentar a digestibilidade e absorção de nutrientes, possuir atividade antibacteriana (UTIYAMA, 2004) e atividade antioxidante (BOTSOGLOU *et al.*, 2002). O potencial antioxidante dos óleos essenciais está relacionado à presença de compostos fenólicos, flavonóides e terpenóides em sua estrutura química. Essas substâncias podem interceptar e neutralizar radicais livres, impedindo a propagação do processo oxidativo, de acordo com Traesel *et al.* (2011).

Devido este estímulo dos óleos essenciais, o óleo-resina de copaíba poderia atuar neutralizando os radicais livres, promovendo um aumento na fertilidade do sêmen. Apesar desta forte característica antioxidante, não foi obtido resultado significativo no teste de penetração espermática, isso demonstrou que a adição de óleo-resina de copaíba *on top* na dieta, não foi associado com a fertilidade das aves.

5 Conclusão

Embora as características seminais não tenham sido influenciadas pela dosagem oferecida *on top* do óleo-resina de copaíba, os valores encontrados estão de acordo com os de referência em termos de desempenho reprodutivo de galos reprodutores. Com isso, surge a alternativa de serem testadas novas dosagens do óleo-resina de copaíba aos animais, sendo avaliadas as possibilidades desta característica antioxidante.

Referências

- ADJANOHOUNG, E. Fertilidade relacionada aos machos. **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, cap. 8, p. 107-115. 1994.
- AIRE, T.A. Micro-stereological study of the avian epididymal region, **J. Anat.** 129:703-706. 1979.
- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. **Reprod Fertil Dev**, v.6, p.19-24. 1994.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod. Fertil.Dev.** v 7. 4:659-668. 1995.
- AITKEN, R.J.; BAKER, H.W. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans. **Human Reprod.**10:1736-9. 1995.
- ALMAIDA-PAGÁN PF, De Santis C, Rubio-Mejía OL, Tocher DR. Dietary fatty acids affect mitochondrial phospholipid compositions and mitochondrial gene expression of rainbow trout liver at different ages. **J Comp Physiol B**. DOI 10.1007/s00360-014-0870-8. 2014.
- ANDRADE, E.R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010.
- ARMSTRON, J. S. B. K. Lipid and antioxidant changes in semen broiler fowl from 25 to 60 weeks. **Br. J. Pharmacol.** 151, 1154 e 1165. 2007.
- ARRUDA, *et al.* Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011. Disponível em: <www.cbpa.org.br>
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of analysis**. 13.ed. Arlington: AOAC International, 2000. 989p.
- BACHA, W.J.; BACHA, L.M. **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca. 2003. 320p.
- BAKST, M. R.; WISAHRT, G.; BRILLARD, J.P. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. **Poultry Science**, v.5, p.117-143. 1994.
- BAKST, M.R.; BAHR, J.M. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, p.390-407. 1995.

- BALL B.A.; MEDINA, V.; Gravance, C.G.; BAUMBE, J. Effects of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, pp.577-589. 2001.
- BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical in vitro spermegg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, v. 58, pp.686-699. 1998.
- BARBOSA, K.B.F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios **Rev. Nutr.**, Campinas, 23(4):629-643, jul./ago. 2010.
- BARRETO, S.L.T. **Níveis de proteína e vitamina E para matrizes de frangos de corte na fase de produção.** (Tese de doutorado). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1998. 171p.
- BECONI, M.T.; FRANCIÁ, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHIO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p.841-851. 1993.
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **Theatlas of chick development.** London: Academic Press, 323p. 1998.
- BEZERRA, N.S.; CRUZ, F.G.G; COSTA, A.P.G.; RUFINO, J.P.F; MELO, R.D.; FEIJÓ, J.C.; MELO, L.D; HOLLERVERGER, S.V. S. Óleo de copaíba (*Copaifera sp.*) na alimentação de galos reprodutores semipesados. **Rev. Cient. Avic. Suin.**, v. 1, n. 1, pp.001-013, out/dez. 2015.
- BIANCHI, M.L.P. & ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista Nutrição**, Campinas, v.12, n. 2, pp.123-130, maio/ago. 1999.
- BIRCH, A.E. *et al.* Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **J. Agric. Food Chemistry**, Chicago, v.49, p. 4502-4507, 2001.
- BISWAS, A.; Mohan, J.; Sastry, K.V.H. Effect of higher dietary vitamin E concentrations on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. **Br Poult Sci**, v.50, pp.733-738. 2009.
- BISWAS, A.; MOHAN, J.; SASTRY, K.V.H.; TYAGI, J.S. Effect of dietary vitamin E on the cloacal gland, foam and semen characteristics of male Japanese quail. **Theriogenology**, v.67, p.259-263. 2007.
- BITTAR FILHO, I; RIBEIRO, R.S. **Manejo de machos.** Manejo de Matrizesde Corte. Campinas: FACTA, 2005.
- BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; GRASSEAU, I.; HALLOUIS, J. M.; HERMIER, D. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. **Biology of Reproduction**.56 (5):1216-1220. 1997.
- BONGALHARDO, D.; DIONELLO, N.J.; CARDELLINO, R.A.; BRACCINI NETO, J. Repetibilidade e correlações fenotípicas do caráter volume de sêmen de galos White Leghorn. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.23, n.6, pp.1002-1007. 1994.

- BONGALHARDO, D.C.; DIONELLO, N.J.L.; LEDUR, M.C.; RUTZ, F. Parâmetros Genéticos para Caracteres de Sêmen de Aves White Leghorn. 2. Correlações com Caracteres de Postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, pp.392-396. 2000.
- BONGALHARDO, D.C.; LEESON, S.; BUHR, M.M. Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. **Poultry Science**. v.88:1060-1069. 2009.
- BONGALHARDO, D.C.; SOMNAPAN-KAKUDA, N.; BUHR, M.M. Isolations and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. **Poultry Science**. v.81, pp.1877-1883. 2002.
- BORGES C. A Q., ROSTAGNO H. S., SILVA J. H. V. *et al.* Exigência de Proteína e Composição da Carcaça de Galos Reprodutores de 27 a 61 semanas de idade. **Rev. Bras. Zootecnia**, v.35, n.5, pp. 1971-1977. 2006.
- BOTSOGLOU, E.; GOVARIS, A.; FLETOURIS, D.; ILIADIS, S. Olive leaves (*Olea europaea* L.) and α -tocopheryl acetate as feed antioxidants for improving the oxidative stability of linolenic acid-enriched eggs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.97, pp.740-753. 2012.
- BRAGA, J.P.; BAIÃO, N.C. Suplementação lipídica no desempenho de aves em altas temperaturas. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 31, pp.23-28. 2001.
- BREININGER E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, pp.2126-2135. 2005.
- BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. *et al.* Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Elementary Research**, Clifton, v. 47, n. 1-3, pp.69-74. 1995.
- BURKE, W.H. Reprodução das Aves. In: Dukes, H. H. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara. v.38, pp.660-680. 1996.
- BURROWS, W.H., QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v.26, pp.19-24. 1937.
- BURTON, G.W.; TRABER, M.G.; ACUFF, R.V.; WALTERS, D.N.; KAYDEN, H.; HUGUES, L.L. *et al.* Human plasma and tissue α -tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. **Am J Clin Nutr**. 64(4):669-84. 1998.
- CAO, G.; CUTLER, R.G. High concentration of antioxidants may not improvedefense against oxidative stress. **Arch Gerontol Geriatr**, v.17, pp.189-201. 1997.
- CASTELLINI, C.; CARDINALI, R.; DAL BOSCO, A.; MINELLI, A.; CAMICI, O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. **Theriogenology**, 65(4):703-12. 2006.

CATALÁ, A. Five Decades with Polyunsaturated Fatty Acids: Chemical Synthesis, Enzymatic Formation, Lipid Peroxidation and Its Biological Effects. **J Lipids**. 2013. DOI 101155/2013/710290.

CECIL, H.C.; BAKST, M.R. In vitro lipid peroxidation of turkey spermatozoa. **Poult. Sci.**, v.72, pp.1370-1378. 1993.

CELEGHINI, E.C.C.; ALBUQUERQUE, R.; ARRUDA, R.P.; LIMA, C.G. Avaliação das características seminais de galos selecionados para a reprodução pelo desenvolvimento da crista. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.4, pp.177-183, 2001.

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. In: **Conferência APINCO-2000, de ciência e tecnologia avícolas**, Campinas. v. 1, p.56. 2000.

CEROLINI, S.; KELSO, K.A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K.; PIZZI, F.; CAVALCHINI, L.G. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chicken. **Biology of Reproduction**, v.57, n.5, pp.976-980, 1997.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Anim Reprod Sci**, v.58, pp.99-111. 2000.

CEROLINI, S.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. *et al.* Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. **World's Poultry Science Journal**, v.59, n.1, pp.65-75. 2003.

CEROLINI, S.; SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C. Dietary fish and evening primrose oil with vitamin E effects on semen variables in cockerels. **Br Poult Sci**, v.46, p.214-222. 2005.

CHEN, X.; STERN, D.; YAN, S.D. *Curr. Alzheimer Res.* 3, 515 e 520. 2006.

CLULOW, R.C. Jones, Studies of fluid and spermatozoal transport in the extratesticular genital ducts of the Japanese quail, **J. Anat.** 157(1988)1-11.

CORCINI, Carine Dahl; SILVA, Betris Elert da; BRIZOLARA, Rosa Marani Rodrigues; GHELLER, Stela Mari Meneguello; VARELA JUNIOR, Antonio Sergio; BONGALHARDO, Denise Calisto; LUCIA JUNIOR, Thomaz. Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo da galinha. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.1, pp.142-146, jan. 2012.

CROSS, D.E.; MCDEVITT, R.M.; HILLMAN, K.; ACAMOVIC, T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. **British Poultry Science**, v.48, pp.496-506. 2007.

DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J. Effects of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during lipid storage. **Poult Sci**, v.76, pp.1440-1445. 1997.

DONOGHUE, A.M.; WISHART, G.J. Storage of poultry semen. **Animal Reproduction Science**.62:213-232. 2000.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, v.82, p.47-95, 2002. Effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, v.4, pp.879-884. 2005.

EID, Y.; EBEID, T.; YOUNIS, H. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. **Br Poult Sci**, v.47, pp.350-356. 2006.

ERTAS, O.N., GULER, T., CIFTCI, M., DALKILIC, B. SIMSEK, U.G. The oxidative stress. **RAMB**. 43(1):61-8. 1997.

ESTEVEZ, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, T.A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent Peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. **Int Braz J Urol**, 33:364-76. 2007.

ETCHES R.J. **Reproduction in poultry**. Wallingford, UK: CAB International, 1996.

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

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

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P., Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum Reprod**. v.14, n.4, 1999. p.1039-1049. Disponível em:

FREISLEBEN, H.J.; PACKER, J. Free radical scavenging activities, interactions and recycling of antioxidants. **Biochem Soc Trans**, v.21, p.325-330. 1993.

FREITAS, E.R.; BORGES, A. da S.; TREVISAN, M.T.S.; CUNHA, A.L. da; BRAZ, N. de M.; WATANABE, P.H.; NASCIMENTO, G.A.J. de. Extratos etanólicos de manga como antioxidantes na alimentação de poedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.7, p.714-721, jul. 2013.

FROMAN, D.P.; BOWLING, E.R.; WILSON, J.L. Sperm motility phenotype not determined by sperm quality index. **Poultry Science**, v.82, p.496-502. 2003.

FROMAN, D.P.; FELTMANN, A.J. Sperm motility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biology of Reproduction**, v.58, p.379-384. 1998.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y. *et al.* Increased oxidativestress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest.** 114(12):1752-61. 2004.

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431-444. 2005.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, cap.7, pp.167-189. 2003.

GILBERT, A.B. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**.6.ed. São Paulo: Manole, pp.488-515. 1982.

GONÇALVES, F.M.; SANTOS, V.L.; FARINA, G.; OLIVEIRA, C.O.; BONGALHARDO, D.C.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F. **Desempenho reprodutivo de galos pesados suplementados com um blend de antioxidantes nas dietas**. Pelotas/RS: Universidade Federal de Pelotas (Tese), 2013.

GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 62, n.2, pp.279–290.

GUERRA, M.M.P., Evans, G. e Maxwell, W.M.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia: Revisão de literatura. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 28: 187-195. 2004.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1982. 720p.

HALLIWELL, B e GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**.3ed. Oxford University Press: New York, 1999. 936p.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** 142(2): 231-55. 2004.

HAMMADEH, M.E.; ASKARI, A.S.; GEORG, T.; ROSEBAUM, P.; SCHMIDT, W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. **Int J Androl**, 22:155-62. 1999.

HAMMERSTEDT, R. H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. **Reprod. Fertil. Dev.**, 5, p.675-690. 1993.

HAYAT, Z.; CHERIAN, G.; PASHA, T.N.; KHATTAK, F.M.; JABBAR, M.A. Oxidative stability and lipid components of eggs from flax-fed hens: effect of dietary antioxidants and storage. **Poultry Science**, v.89, p.1285-1292. 2010.

HESS, R.A.D.; BUNICK, K.H.; LEE, J.; BAHR, J.A.; TAYLOR, K.S.; KORACH, D.B.A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature**, 390(1997) 509–512.

IRVINE, D.S.; TWIGG, J.; GORDON, E.; FULTON, N.; MILNE, P.; AITKEN, R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. **J Androl**, v.21, pp.33-44, 2000.

JOHNSON, P.A. Reprodução das aves. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.691-701. 2006.

JUNQUEIRA, O.M.; ANDREOTTI, M.O.; ARAÚJO, L.F.; DUARTE, K.F.; CANCHERINI, L.C.; RODRIGUES, E.A. Valor energético de algumas fontes lipídicas determinado com frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, pp.2335-2339. 2005.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, 65:1407-21. 2006.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y., 1999. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertil. Steril.** v.71, pp.497-501. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00507-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00507-X)>. Acesso em: 19 abr 2015.

KELSO, A.K.; CEROLINI, S.; SPEAKE, B.K.; CAVALCHINI, L.G.; NOBLE, R.C. The effects of dietary supplementation with a -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and the quality of spermatozoa in the cockerel from 24 to 72 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, pp.53-59. 1997.

KHAN, R.U. Antioxidants and poultry semen quality. **World's Poultry Science Journal**, v.67, p.297-308. 2011.

KLASING, K.C. **Comparative avian nutrition**. UK: Cab International, 1998. 350p.

KOIYAMA, N. T. G. **Aditivos fitogênicos na produção de frangos de corte**. [online]. 2012. 74p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KUSS, F. **Agentes oxidantes e antioxidantes**. Programa de Pós-Graduação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

KUSTER, C.E.; SINGER, R.S.; ALTHOUSE, G.C. Determining sample size for the morphological assessment of sperm. **Theriogenology**, 61:691-703. 2004.

LAKE, P.E. Observations of freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. **VI Cong. Int Reprod Anim Insem Artif**, pp.21633-1635. 1968.

LAKE, P.E.; STEWART, J.M. Comparative physiology of turkey and fowl semen. In: CUNNINGHAM, F.J.; LAKE, P.E.; HEWITT, D. Reproductive biology of poultry. **Harlow: British Poultry Science**, London, pp.151-160. 1978.

LARA, L.J.C. Reprodução nas aves: desafios do manejo e da nutrição. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.39, n.1, p.85-90, jan./mar. 2015. Disponível em: <www.cbpa.org.br>

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A. da; VEIGA-JUNIOR, V.F. da. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from *Copaiba (Copaifera spp.)* Oleoresins. **Molecules**, 17, pp.3866-3889. 2012.

- LUCASZEWICS, E. Study of diluents for cock's semen storage in the light of laboratory estimation and fertility rates. **Zeszyty Naukowe AR we Wroclawiu, Zootechnika XXX**, 168:43-59. 1988.
- LUCASZEWICZ, E. Cryopreservation of Anser anser L. gander semen. **Zeszyty Naukowe AR we Wroclawiu 440**, Rozprawy CXC.1-11. 2002.
- LUNA, A.; LÁBAQUE, M.C.; ZYGADLO, J.A.; MARIN, R.H. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v.89, p.366-370. 2010.
- MACEDO JR., M.C. *et al.* *In vitro* penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: distinct systems for gamete's coincubation and oocyte's cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.295-301, 2010.
- MACIEL, M.P. **Características reprodutivas de galos leves e semi-pesados submetidos a diferentes fotoperíodos**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006. 126p.
- MAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxmammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11,
- MARINERO, M.J.; COLAS, B.; PRIETO, J.C.; LOPEZ RUIZ, M.P. Different sites of action of arachidonic acid on steroideogenesis in rats Leydig cells. **Molec Cel Endocrin**. 1:193-200. 1996.
- MARTIN-RILLO, S. *et al.* Bora semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**. v.31, 4:519-526. 1996.
- MAYNE, S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J Nutr**. 133(Suppl 3):933-40. 2003.
- MCDANIEL, C.D.; HANNAH, J.L.; PARKER, H.M. *et al.* Use of a spermanalyzer for evaluating broiler breeder males. 1. Effects of altering sperm quality and quantity on the sperm motility index. **Poultry Science**, v. 77, n. 6, pp.888-893. 1998.
- MCDANIEL, G.R. Manejando los reproductores broilers paraobtener máxima fertilidad. **Avicult Prof**, v.20, p.16-17. 2002.
- MCDOWELL, L. R. **Vitamin in animal nutrition: comparative aspect ti human nutrition**. Washington: Academic. 1989, 486p.
- MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol.SBCTA**. Campinas, v.36, n. 1, pp.1-11. 2002.
- NAVARRO, R.D., Lanna, E.A.T., Donzele, J.L., Matta, S.L.P. e Souza, M.A. Níveis de energia digestível da dieta sobre o desempenho de piauçu (*Leporinus macrocephalus*) em fase pós-larval. **Acta Sci. Anim.Sci.**, 29:109-114. 2007.

- NIKI, E.; NOGUCHI, N.; GOTOH, N. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. **Biochem.Soc. Trans.**, v.21, p.313-317. 1993.
- NISSEN, H.P.; KREYSEL, H.W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Andrologia**, 15(3):264-9. 1983.
- NORDBERG, J.; Arnér, S;J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol Med**, v.31, pp.1287-1312. 2001.
- NOVAES, G.M; SILVA, M.J.D; ACHKAR, M.T.; VILEGAS, W. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 535-539, ago./dez. 2013.
- OCAK, N.; ERENER, G.; BURAK, A.K.F.; SUNGU, M.; ALTOP, A.; OZMEN, A. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. Czech **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 4, p.169-175. 2008.
- OLIVEIRA, A.G., L.F. Telles, R.A. Hess, G.A. Mahecha, C.A. Oliveira, Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*, **Reprod. Toxicol.** 23 (2007) 182–191.
- PARKHURST, C.R.; MOUNTNEY, G.J. **Poultry meat and egg production**. New York: Avi Book, 1988. 294p.
- PARTYKA, A.; NIZANSKI, Wojciech; ŁUKASZEWICZ, Ewa. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. **Theriogenology**, 74(2010):1019-1027. 2010.
- PASSOTTO, J.A.; PENTEADO, M.V.C.; MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante do b-caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. **Cienc Tecnol Aliment.** 18(1):68-72. 1998.
- PERIC, L.; MILOSEVIC, N.; DUKIC-STOJCIC, M.; BJEDOV, S. Effect of phytogetic products on performance of broiler chicken. **World Nutrition Forum**, Nottingham University, Mayrhofen, Austria, 2008.
- PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.M.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, Extração, Aplicações Industriais e Propriedades Medicinais. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.11, pp.465-472. 2009.
- POPWELL, J.M., FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of *in vitro* fertility in boars. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.97-113. 2004. Disponível em: <<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320%2803%2900186-6/abstract>>. Acesso em:
- RESENDE, O. A., *et al.* Inseminação artificial em galinhas. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Niterói. **Boletim Técnico**, 6.maio, 1983, 28 p.
- REVINGTON, W.H.; MORAN, E.T.; McDANIEL, G.R. Performance of broiler breeder males given low protein feed. **Poultry Science**, v.70, pp.139-145, 1991.

REZENDE, C.A.; BAIÃO, N.C; RUIZ L.E.A.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Escores de cloaca e de crista e morfometria testicular em galos de matriz pesada com 71 semanas de idade e três categorias de peso corporal. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.66, pp.395-404, 2014.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S.; WADT, L.H.O. **Copaíba**: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, 2004. 28p.

RITCHISON, G. **Avian reproduction**: anatomy and the bird egg. 2013. Disponível em <<http://people.eku.edu/ritchisong/avianreproduction/html>>.

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**, Inc. p.64-67, 1997.

ROBINSON, F.E.; FASENKO, G.M.; RENEMA, R.A. **Optimizing chick production in broiler breeders**.Edmonton, AB: Spotted Cow Press, pp.101-104. 2003.

ROCHA, G. *et al.* Factores que afectan la producción de dosis de semen en centros de inseminación artificial porcina.**Avances en Inv estigación Agropecuaria**, v. 9, pp.33-43, 2005.

RODENAS, C.E.O.Characterísticas seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. **Ciênc. agrotec**. vol.29 no.1 Lavras Jan./Feb. 2005.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. *et al.***Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 186p.

ROUVIER, R.; TAI, J.J.L.; TAI, C.L. Insemination artificielle des canes communes pour la production de mulards a Taiwan.La situation actuelle. In: **Insemination artificielle et amélioration génétique**: bilan et perspectives critiques. Versailles: Institut National de la Recherche Agronomique, p.359-368 (Les colloques de l'INRA, n. 29) 1984.

RUTZ *et al.* Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.307-317, jul./set. 2007.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; PAN, E. A. **Fisiologia e manejo reprodutivo de aves**. Pelotas: UFPel, 2009. Apostila.

RUTZ, F.; ANCIUTTI, M.A.; XAVIER, E.G.; ROLL, V.F.B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, 3:307-317. 2007.

SAMPAIO, F.G., KLEEMANN, G.K., SÁ, M.V.C.; PEREIRA, A.S., BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. Níveis de vitamina E e de selênio para pós-larvas de *Macrobrachium mazonicum*. **Acta Sc. Anim. Sci.**, 26: 129-135. 2004.

SARLOS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M.; GABOR, G.Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Vet Hung**, v.50, pp.235-245, 2002.

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

SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, pp.1351-1358, 1995.

SESTI, L. A. C. 2003. Órgãos reprodutivos e reprodução das aves domésticas. In: MACARI, M.; GONZÁLES, E. **Manejo da Incubação. FACTA**. Jaboticabal. 1:8-33.

SESTI, L. A. C.; ITO, I. K. Fisiologia do sistema reprodutor. In: BERCHIERI, A.; MACARI, M. **Doença das Aves**. Campinas: FACTA. pp.242-322. 2000.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr**. 2004; 17(2):227-36.

SILVA, S.V.; SOARES, A.TBATISTA, A.M. et al. Criopreservação de sêmen ovino em diferentes estações climáticas: interferência da sazonalidade. SINCORTE – Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009b. (CD-ROM)

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985.

SIRRI, F.; MELUZZI, L.; PARDO RAMI REZ, C. *et al.* **Fatty acid composition of lipid in eggs laid by hens fed diets supplemented with different fats. European Symposium on Quality of Egg and Egg Products**, 6, 1995, Zaragoza. Proceedings... Zaragoza, pp.411-500. 1995.

SOARES, J.M.; BELETTI, M.E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoides de galos de linhagem pesada em duas idades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n.4, pp.543-553.2006.

SURAI, P.F. *et al.* Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in broiler chicken. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 120, pp. 257-264. 2000.

SURAI, P.F. **Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction**. Nottingham: Nottingham University Press, pp.391-454. 2002.

SURAI, P.F.; KOSTJUK, I.A.; WISHART, G.; MACPHERSON, A.; SPEAKE, B.; NOBLE, R.C.; IONOV, I.A.; KUTZ, E. Effect of vitamin E and selenium of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes and liver. **Biol Trace Elem Res**, v.64, pp.119-132, 1997.

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.

TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Hum Reprod**, 13:1429-36.1998.

TYLER, N.; BEKKER, H. The effect of dietary crude protein on the fertility of male broiler breeders. **African Journal of Animal Science**, v.42, n.3, pp.304-309, 2012.

UPERTI, G.C. *et al.* Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, pp.269-278. 1997.

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

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528. 2005.

WATANABE, P.H.; NASCIMENTO, G.A.J. de. Extratos etanólicos de manga como antioxidantes na alimentação de poedeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.7, pp.714-721, jul. 2013.

WHITTOW, G.C. **Sturkie's avian physiology**. 5.ed. San Diego, 2000.

WILHELM-FILHO, D. Oxigênio, radicais livres de oxigênio e saúde. **Biotemas**, v.7, pp.7-18. 1994.

WISEMAN, S.A.; BALENTTINE, D.A.; FREI, B. Antioxidants in tea. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 37, n. 8, p. 705-718. 1997.

WISHART, G. J. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. **Journey Reproductive Fertility**, v.71, pp.113-118. 1984.

XU, X. *et al.* *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, v.76, p.3079-3089, 1998.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago, v.49, pp.4083-4089. 2001.

YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**. v.76, pp.99-111. 2003.

ZANINI, S.F. **Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre o desempenho produtivo e reprodutivo de galos leves**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2001. 139p.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago, v.49, pp.5165-5170. 2001.

