

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Óleo de linhaça na dieta de galos e seus efeitos sobre a fertilidade
e congelabilidade do sêmen**

Angelina da Silva Flores Borelli

Pelotas, 2013

ANGELINA DA SILVA FLORES BORELLI

**ÓLEO DE LINHAÇA NA DIETA DE GALOS E SEUS EFEITOS SOBRE A
FERTILIDADE E CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

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.

Orientador: Prof^ª. Denise Calisto Bongalhardo, PhD
Co-orientador: Prof. Eduardo Gonçalves Xavier, PhD

Pelotas, 2013

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

B731Ó Borelli, Angelina da Silva Flores
Óleo de linhaça na dieta de galos e seus efeitos
sobre a fertilidade e congelabilidade do sêmen /
Angelina da Silva Flores Borelli; Denise Calisto
Bongalhardo, orientador; Eduardo Gonçalves Xavier,
co-orientador. - Pelotas, 2013.
57 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade
Federal de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas.
Pelotas, 2013.

1.Ácidos Graxos. 2.Ômega-3. 3.Características
Seminais. 4.Criopreservação. I. Bongalhardo, Denise
Calisto , orient. II. Xavier, Eduardo Gonçalves ,
co-orient. III. Título.

CDD: 636.084

Catálogo na Fonte: Marlene Cravo Castillo CRB:10/744
Universidade Federal de Pelotas

Banca examinadora

Prof^a. PhD. Denise Calisto Bongalhardo - UFPel - DFF/IB

Prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso - UFPel - DZ/FAEM

Prof. Dr. Marcos Antônio Ancuti – IF-Sul (“campus” CAVG)

Prof^a. Dra. Débora Cristina Nichelle Lopes – UNIPAMPA (“campus” Uruguaiana)

“Aos meus pais, meu irmão, meu marido e minha filha, pelo amor incondicional e pela confiança depositada em mim”.

DEDICO

Agradecimentos

A Deus por tudo que foi conquistado;

Aos meus pais que sempre foram o alicerce da minha vida, acreditando em mim, nunca medindo esforços para me apoiar, dando-me carinho, afeto e educação para que eu conseguisse realizar meus sonhos;

Ao meu irmão e minha dinda Vera, que mesmo distante, acreditaram em mim e me incentivaram durante os momentos difíceis;

Ao meu marido e minha filha pelo apoio, amor e paciência, abrindo mão de momentos de lazer em prol dos meus estudos;

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do curso e pelo crescimento pessoal e profissional;

A minha orientadora Denise Calisto Bongalhardo, pela orientação e confiança durante a realização deste trabalho;

Ao meu co-orientador, Eduardo Gonçalves Xavier, pela orientação e pelos conselhos;

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia, pelo conhecimento transmitido;

Aos amigos e colegas de mestrado e doutorado, pela amizade, solicitude e bons momentos de convívio;

Ao funcionário do LEEZO, José Ulisses Azambuja, pela colaboração durante a realização deste trabalho;

Aos funcionários do IF-Sul/ CAVG, pelo auxílio nas atividades que desenvolvi no instituto;

Aos estagiários, que participaram da realização deste trabalho, Amauri, Melina e Camila;

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a conquista de mais uma etapa na minha vida;

Obrigada!

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.”

Sócrates

Resumo

BORELLI, Angelina da Silva Flores. **Óleo de linhaça na dieta de galos e seus efeitos sobre a fertilidade e congelabilidade do sêmen**. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Objetivou-se avaliar a fertilidade e a congelabilidade do sêmen de galos alimentados com dietas contendo óleo de linhaça (OL), em substituição ao óleo de soja (OS). Um total de 20 galos semi-pesados, com idade de 14 meses, foram alimentados com as dietas experimentais durante 12 semanas. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram de cinco dietas experimentais: T1 – dieta com 0% de OL; T2 – dieta com 25% de OL; T3 – dieta com 50% de OL; T4 – dieta com 75% de OL e T5 – dieta com 100% de OL. As dietas eram à base de milho e farelo de soja, sendo formuladas de modo a atender as exigências nutricionais, isoenergéticas e isoprotéicas, diferindo apenas nos níveis de OL em substituição ao OS. Foram avaliadas as seguintes variáveis: desempenho zootécnico (consumo alimentar, ganho de peso e conversão alimentar); características seminais do sêmen fresco e congelado (volume, motilidade, concentração, integridade de membrana e teste de penetração) e taxa de fertilidade do sêmen fresco. O desempenho zootécnico não foi afetado significativamente pelos tratamentos ($p > 0,05$), assim como o volume seminal, a integridade de membrana, a concentração espermática e o teste de penetração espermática do sêmen fresco. A motilidade espermática foi influenciada ($p < 0,05$) pelos tratamentos, encontrando melhor resultado no sêmen de galos alimentados com dietas contendo 50% de OL. A taxa de fertilidade não foi alterada significativamente. Nas análises do sêmen congelado, a motilidade e o teste de penetração espermática foram influenciados ($p < 0,05$) pelos tratamentos, em que os melhores resultados, para ambas variáveis, foram encontrados no sêmen congelado de galos que receberam 100% de OL na dieta. A integridade de membrana do sêmen congelado não foi alterada significativamente. Estes resultados indicam que a substituição do óleo de soja da dieta de galos pelo óleo de linhaça em 50% melhorou a motilidade espermática do sêmen fresco. No sêmen congelado, a substituição em 100% pelo óleo de linhaça melhorou a motilidade e a penetração espermática.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Características seminais. Criopreservação. Ômega-3.

Abstract

BORELLI, Angelina da Silva Flores. **Flaxseed oil in the diet of roosters and their effects on fertility and freezing semen**. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This study aimed to evaluate the fertility and cryopreservability of semen from cocks fed with diets containing flaxseed oil in different levels, instead of soybean oil. A total of twenty (20) cocks medium weight, aged 14 months, were fed with experimental diets for 12 weeks. The experimental arrangement was completely at random. The diets consisted of T1-0% of flaxseed oil, T2-25% of flaxseed oil, T3-50% of flaxseed oil, T4-75% of flaxseed oil and T5-100% of flaxseed oil. The diets derived from maize and soybean meal were formulated to meet the nutritional requirements, being isonitrogenous and isoenergetic diets, differing only in the levels of flaxseed oil in replacement for soybean oil. The zootechnical performance was not expressively affected by treatments ($p > 0,05$). The seminal volume, sperm count, membrane integrity and sperm penetration test of fresh semen were not influenced significantly by treatments. Sperm motility was significantly influenced ($p < 0,05$), with the best result for the T3 (50% of flaxseed oil). The fertility rate was not influenced significantly. Motility and sperm penetration test, in the analysis of frozen semen, were significantly influenced by diets, where T5 (100% flaxseed oil) got the best averages in both analyses. Membrane integrity was not affected significantly. These results indicate that substitution of soybean oil by flaxseed oil at 50% in the cocks diet improved the motility of fresh semen. In relation to frozen semen, the substitution by flaxseed oil at 100% improved the motility and sperm penetration.

Keywords: Cryopreservation. Fatty acids. Omega-3. Seminal characteristics.

Lista de figuras

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Localização dos testículos e ductos deferentes nas aves e conexão dos túbulos seminíferos aos ductos deferentes..... | 21 |
| Figura 2 | Galos semi-pesados alojados em gaiolas metálicas individuais, com bebedouro tipo <i>nipple</i> e comedouro individual tipo calha..... | 28 |
| Figura 3 | Volume seminal médio de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 35 |
| Figura 4 | Motilidade espermática média de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja | 37 |
| Figura 5 | Concentração espermática média de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 38 |
| Figura 6 | Integridade de membrana média (%) de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 40 |
| Figura 7 | Média de orifícios na membrana perivitelina interna no teste de penetração espermática de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 41 |
| Figura 8 | Taxa de fertilidade (%) de galos reprodutores alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 43 |
| Figura 9 | Motilidade espermática média (%) do sêmen descongelado de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 45 |
| Figura 10 | Integridade de membrana média (%) do sêmen descongelado de galos alimentados com dietas contendo óleo de linhaça..... | 46 |
| Figura 11 | Média de orifícios na MPI do teste de penetração espermática de sêmen descongelado de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 48 |

Lista de tabelas

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Composição em ácidos graxos da linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>)..... | 25 |
| Tabela 2 | Composição em ácidos graxos do óleo de soja (<i>Glycine max L.</i>)..... | 26 |
| Tabela 3 | Composição percentual e calculada das dietas experimentais para galos, com substituição de óleo de soja pelo óleo de linhaça..... | 29 |
| Tabela 4 | Médias (\pm erro padrão) das variáveis de desempenho zootécnico de galos submetidos à dietas com diferentes níveis de óleo de linhaça..... | 33 |
| Tabela 5 | Média do volume seminal (\pm erro padrão) de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 34 |
| Tabela 6 | Média da motilidade espermática (\pm erro padrão) de galos suplementados com diferentes níveis de óleo de linhaça..... | 36 |
| Tabela 7 | Média da concentração espermática (\pm erro padrão) de galos reprodutores alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça..... | 38 |
| Tabela 8 | Média da integridade de membrana (\pm erro padrão) de espermatozoides de galos reprodutores alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça..... | 39 |
| Tabela 9 | Média do número de orifícios na membrana perivitelina interna (\pm erro padrão) de espermatozoides de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça..... | 41 |
| Tabela 10 | Taxa de fertilidade (%) dos espermatozoides de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja..... | 42 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 11 | Média da motilidade espermática (\pm erro padrão) do sêmen descongelado de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça..... | 44 |
| Tabela 12 | Média da integridade de membrana (\pm erro padrão) de espermatozoides de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça após processo de congelamento e descongelamento..... | 46 |
| Tabela 13 | Média do número de orifícios na membrana perivitelina interna (\pm erro padrão) do sêmen descongelado de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça..... | 47 |

Sumário

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Introdução | 14 |
| 2 | Revisão de literatura..... | 17 |
| 2.1 | Ácidos graxos poliinsaturados – estrutura e metabolismo | 17 |
| 2.2 | Ácidos graxos essenciais na composição das biomembranas..... | 18 |
| 2.3 | Ácidos graxos essenciais e o desempenho reprodutivo de galos | 18 |
| 2.4 | Características reprodutivas em galos | 21 |
| 2.5 | Inseminação artificial em aves e criopreservação do sêmen | 22 |
| 2.6 | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>)..... | 24 |
| 2.7 | Soja (<i>Glycine max L.</i>)..... | 25 |
| 3 | Material e métodos | 27 |
| 3.1 | Local e período experimental | 27 |
| 3.2 | Animais, instalações e manejo | 27 |
| 3.3 | Delineamento experimental..... | 28 |
| 3.4 | Dietas experimentais e manejo alimentar | 28 |
| 3.5 | Parâmetros seminais analisados | 29 |
| 3.6 | Inseminação artificial e incubação dos ovos | 31 |
| 3.7 | Congelamento e descongelamento do sêmen | 31 |
| 3.8 | Análise da composição bromatológica das dietas..... | 32 |
| 3.9 | Análise estatística | 32 |
| 4. | Resultados e discussão..... | 33 |
| 4.1 | Desempenho zootécnico..... | 33 |
| 4.2 | Características espermáticas – análises do sêmen fresco | 34 |
| 4.2.1 | Volume seminal | 34 |
| 4.2.2 | Motilidade espermática | 36 |
| 4.2.3 | Concentração espermática | 37 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.4 Integridade de membrana..... | 39 |
| 4.2.5 Teste de penetração espermática..... | 40 |
| 4.2.6 Taxa de fertilidade | 42 |
| 4.3 Características espermáticas – análises do sêmen congelado..... | 44 |
| 4.3.1 Motilidade espermática | 44 |
| 4.3.2 Integridade de membrana..... | 45 |
| 4.3.3 Teste de penetração espermática..... | 47 |
| 5. Conclusões e considerações finais | 49 |
| 6. Referências | 50 |

1 Introdução

A nutrição é um dos fatores que afetam a fertilidade dos galos, além da temperatura ambiente, do fotoperíodo, das patologias e do manejo, sendo que a produção de espermatozóides e a fertilidade são influenciadas pela alimentação, tanto no período de crescimento, quanto no de produção (ETCHES, 1996). A fertilidade é uma das características de maior importância econômica em aves de produção, no entanto, tem-se observado uma queda neste parâmetro, o que poderia ser atribuída à falta de atenção ao macho em relação à seleção para o acasalamento (CELEGHINI et al., 2001).

Na indústria avícola, tradicionalmente a seleção dos galos é feita através da avaliação do tamanho e cor da crista e da barbela, do peso corporal e do comprimento e aspecto das patas. Entretanto, é importante enfatizar que as características físicas não apresentam uma correlação alta com a fertilidade do macho (WILSON et al., 1979). Um dos meios utilizados para avaliar a capacidade fertilizante dos galos é o estudo das características seminais (CELEGHINI et al., 2001).

Entre os vários nutrientes que exercem efeito sobre a biologia dos espermatozóides estão os lipídios. Além da função energética, os lipídios também são componentes celulares de membranas biológicas (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Segundo Hammerstedt (1993), existe uma considerável evidência de que a composição de lipídios da membrana do espermatozoide é o maior fator determinante sobre a motilidade, a sensibilidade ao calor e, principalmente, a viabilidade.

Em muitos casos a dieta é o principal determinante da composição dos ácidos graxos nos tecidos animais, incluindo os espermatozoides (SURAI et al., 2000). Kelso et al. (1997b) afirmam que a manipulação da dieta pode ser um meio

eficaz de manipular o perfil de ácidos graxos dos espermatozóides das aves. Segundo Surai (2002) os espermatozoides de galos apresentam um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados – AGPIs.

Os alimentos são compostos por diferentes proporções de ácidos graxos (VIEIRA, 2006). Os AGPIs da série 3 (n-3) e 6 (n-6) são ácidos graxos essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados pelos animais e precisam ser fornecidos pela ração (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Os óleos vegetais são importantes fontes de ácidos graxos poliinsaturados (SANTOS *et al*, 2009). Os óleos de linhaça e canola são boas fontes de ácido α -linolênico (C18:3), da série n-3 (SURAI, 2002; VIEIRA, 2006). Já os óleos de milho, soja e girassol são ricos em ácido linoléico (C18:2), da série n-6 (SURAI, 2002). Zambiasi et al (2007), ao avaliarem a composição de ácidos graxos de diferentes fontes de óleos e gorduras, observaram que o óleo de linhaça contém mais do que 50% de ácido α -linolênico (C18:3), assim sendo, este óleo é uma excelente fonte deste ácido graxo.

Bongalhardo et al. (2009) conduziram um experimento que avaliou os efeitos de diferentes lipídios na dieta sobre as características dos espermatozóides de galos e concluíram que tanto o óleo de peixe, quanto a semente de linhaça (ricos em AGPI n-3), como fontes lipídicas nas dietas, promoveram uma alteração no perfil de ácidos graxos dos espermatozóides, sugerindo que possa ocorrer melhora na fertilidade espermática.

O uso de sêmen congelado é de interesse prático para a indústria de aves, visto que esta tecnologia poderá diminuir os custos de produção através da redução do número de animais utilizados para reprodução, com conseqüente diminuição da mão-de-obra necessária para o manuseio destes animais e dos custos com alimentação. O congelamento também permitirá a estocagem de sêmen em nitrogênio líquido por tempo indeterminado, contribuindo para a formação de bancos genéticos.

A criopreservação de sêmen para inseminação artificial é uma importante ferramenta. O uso da inseminação artificial elimina a incompatibilidade física ou de comportamento entre machos e fêmeas, permite uma seleção de machos baseada na qualidade do ejaculado (SINGH, 1999) e possibilita aumentar do número de pintinhos produzidos por um único macho, quando comparado com a monta natural (AMANN, 1999).

A preservação do sêmen é benéfica para aumentar o uso da inseminação artificial (BLESBOIS; GRASSEAU, 1998), como também para utilizar a comercialização de sêmen em nível industrial (BAKST; CECIL, 1992).

Entretanto, o processo de congelamento causa danos à integridade estrutural, bioquímica e biofísica da membrana plasmática do espermatozoide, resultando em menor fertilidade do sêmen após o descongelamento, sendo este o maior entrave no emprego desta biotecnologia em maior escala (KLÖPEE et al., 1988).

Sabendo-se que ocorre modificação lipídica na membrana do espermatozóide através dos lipídios oriundos da dieta, é importante verificar se essa modificação iria se refletir na prática (*in vivo*), ou seja, na obtenção de ovos férteis após inseminação artificial das fêmeas e também na congelabilidade do sêmen. Assim, objetivou-se avaliar a fertilidade e a congelabilidade do sêmen de galos alimentados com dietas contendo óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

2 Revisão de literatura

2.1 Ácidos graxos poliinsaturados – estrutura e metabolismo

A estrutura química de um ácido graxo poliinsaturado é dada pelo número de átomos de carbono na cadeia e pelo número de duas duplas ligações. A letra n indica a posição da primeira dupla-ligação a partir do grupo metila, pertencendo assim às séries n-3 e n-6 (MC DOWELL, 1989). Os únicos ácidos graxos essenciais (aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo animal) são o α -linolênico (C18:3; n-3) e o linoleico (C18:2; n-6) (HUNTER; ROBERTS, 2000). Os ácidos graxos essenciais encontram-se principalmente nos óleos vegetais e sua principal função está relacionada com a integridade estrutural das membranas biológicas, como componentes dos fosfolipídios (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). As funções dos ácidos graxos essenciais parecem ser diversas. Além da formação de prostaglandinas e leucotrienos, são encontrados nos lipídeos estruturais de todas as células e estão relacionadas com a integridade estrutural da membrana da mitocôndria, ocorrendo em altas concentrações nos órgãos reprodutores (SWENSON, 1996).

Por meio de sucessivos alongamentos e insaturação de suas cadeias, cada um deles origina uma série de ácidos graxos poliinsaturados. Por exemplo, o ácido araquidônico pode ser sintetizado a partir do ácido linoleico (C18:2) e o ácido linolênico (C18:3) é precursor dos ácidos eicosapentanoico e docosahexanoico, entre os quais possivelmente exista interconversão. As enzimas que intervêm nesse processo são as mesmas, havendo por isso, uma competição no metabolismo das duas séries. (CEPERO BRIZ, 1998).

O animal não é capaz de dessaturar (adicionar duplas ligações) metabolicamente para a extremidade metila; a série n-3 permanece sempre assim e a série n-6 tampouco pode mudar (HARPER et al., 1982).

O ácido linoleico (C18:2) está presente, em concentrações elevadas, em vários óleos vegetais alimentícios, como o de girassol, soja, canola, milho, algodão e amendoim. O ácido linolênico está presente em altas quantidades no óleo de linhaça (WHITTEMORE, 1993).

2.2 Ácidos graxos essenciais na composição das biomembranas

As biomembranas tem uma estrutura em bicamada de lipídeos, que serve para separar o exterior e interior da célula, criando uma permeabilidade de íons, moléculas ou mudanças conformacionais nos componentes de membrana (GENNIS, 1989).

Os ácidos graxos essenciais na dieta são destinados, principalmente, a formar os fosfolipídios da estrutura da membrana celular (HOLMAN, 1992). Deficiências destes ácidos graxos por mais de oito semanas impedem o crescimento, devido às mudanças ocasionadas na membrana das mitocôndrias do fígado, permitindo o aumento da permeabilidade para água e íons, produzindo o edema da mitocôndria e uma queda na produção de ATP, causando assim uma deficiência na conversão da energia dos alimentos em energia metabólica (GUR, 1992).

Os ácidos graxos poliinsaturados estão relacionados com as propriedades biofísicas da membrana do espermatozoide, como a fluidez e a permeabilidade (HAMMERSTEDT, 1993). Existe uma considerável evidência de que a composição de lipídeos da membrana do espermatozoide é a maior determinante sobre a motilidade, sensibilidade ao calor e, principalmente, na integridade de membrana.

2.3 Ácidos graxos essenciais e o desempenho reprodutivo de galos

Os fosfolipídios dos espermatozoides das aves contem altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-6, principalmente os ácidos

araquidônico e o docosatetraenóico (SURAI et al., 1998). Nos espermatozoides dos mamíferos, ocorrem, em maior proporção, os ácidos graxos poliinsaturados da série n-3, particularmente o ácido docosahexaenóico (LIN et al., 1993; KELSO et al., 1997a). Os ácidos graxos poliinsaturados cumprem uma função importante no espermatozoide, apresentando as aves baixa fertilidade quando a concentração destes é reduzida no espermatozoide (KELSO et al., 1996).

Segundo Surai et al. (1998) e Cerolini et al. (1997a), as proporções das cadeias longas dos ácidos graxos poliinsaturados da série n-6 são variáveis entre as espécies. Nos galos, os espermatozoides mostram altos níveis do ácido docosatetraenóico (C22:4; n-6), em torno de 31%, e nos perus os mais baixos níveis (13%), enquanto que os patos e gansos mostram um nível intermediário de 18% a 20%. O ácido araquidônico (C20:4) varia também de acordo com as espécies, sendo de 10% e 19% para perus e patos, respectivamente.

Kelso et al. (1997b) realizaram um experimento com galos da linhagem Cobb, alimentados com uma dieta controle, com 6% de óleo de soja, rica em ácido linoléico (18:2 n-6) e uma dieta com 6% de óleo de linhaça rica em ácido α -linolênico (18:3 n-3) a partir da 23ª até a 72ª semana de idade. Observou-se que a concentração dos espermatozoides nos animais que receberam as duas dietas, aumentou significativamente desde as 24 até as 39 semanas de idade. A motilidade foi constante em todas as idades para ambas as dietas. A fertilidade máxima do sêmen das aves controle foi obtida às 39 semanas, com 82,8% mas diminuiu às 72 semanas (69,5%). O mesmo comportamento foi observado para a dieta com óleo de soja.

Existe pouca informação sobre os mecanismos envolvidos na liberação dos ácidos graxos desde a circulação até o desenvolvimento do espermatozoide, assim como a incorporação seletiva de ácidos graxos específicos nos fosfolipídios dos espermatozoides (KELSO et al., 1997b).

No espermatozoide dos mamíferos, o ácido docosahexaenóico (22:6 n-3) desempenha uma importante função sobre a taxa de fertilidade. Uma marcada redução dos ácidos graxos no espermatozoide está associada a uma queda no número de espermatozoides, da motilidade e da capacidade fertilizante (NISSEN et al., 1981).

Segundo Wishart (1982) e Fujihara et al. (1984), embora os espermatozoides das aves contenham baixas quantidades de ácidos graxos

poliinsaturados, comparados aos dos mamíferos, o espermatozoide de aves tem maiores quantidades destes ácidos graxos que outros tecidos corporais. As diferenças observadas no conteúdo de ácidos graxos dos espermatozoides entre aves e mamíferos podem ser devido a uma adaptação à temperatura corporal (41°C e 37°C, respectivamente) (FUJIHARA et al., 1984). O tamanho da cadeia entre os ácidos graxos mais comuns das aves e dos mamíferos é o mesmo, ou seja, vinte e dois carbonos. A diferença fundamental é que nas aves ocorrem duas insaturações a menos, o que pode manter uma apropriada propriedade biológica da membrana dos espermatozoides (KELSO et al., 1997b).

Surai et al. (1998) relatam que os ácidos graxos mais abundantes no espermatozóide das aves são 20:4 n-6 e 22:4 n-6, sendo 40% em galos e 22% em perus do total de ácidos graxos. Ravie e Lake (1985) e Lin et al. (1993) observaram que a relação de poliinsaturados/saturados em galos e perus é de 0,9 e 1,1, respectivamente, em comparação com os espermatozoides dos mamíferos contendo altos níveis de n-3, particularmente ácido docosahexaenóico (22:6 n-3).

Em galos, a redução na espermatogênese e na qualidade do sêmen ocorre a partir de 60 semanas de idade, sendo acompanhada pela redução da proporção 20:4 n-6 e 22:4 n-6 na fração da fosfatidiletanolamina (KELSO et al., 1996). A proporção de 22:4 n-6 no total dos fosfolípidios dos espermatozoides está positivamente correlacionada com a motilidade e a habilidade fertilizante do espermatozoide (CEROLINI et al., 1997b).

Os efeitos da manipulação dos ácidos graxos poliinsaturados sobre a qualidade e/ou fertilidade do espermatozoide têm sido avaliados. Dietas ricas em ácidos graxos da série 3 e 6 mostraram um efeito positivo na motilidade do espermatozoide durante o período reprodutivo. Os efeitos de dietas ricas em n-6 sobre a produção de sêmen têm sido variáveis (CEROLINI et al., 2003).

O incremento na fertilidade nem sempre está associado com a composição dos ácidos graxos dos espermatozóides provenientes da dieta. O efeito positivo sobre a taxa de fertilidade com dietas contendo ácidos graxos poliinsaturados depende da idade da ave e acontece em machos reprodutores novos, nos quais o potencial da atividade reprodutiva pode ser totalmente expressado (CEROLINI et al., 2003).

2.4 Características reprodutivas em galos

Os testículos têm uma função gametogenética, convertendo os precursores diplóides em células haplóides capazes de realizar a fertilização. Também possuem funções endócrinas, responsáveis por manter a espermatogênese, os caracteres sexuais secundários e o comportamento sexual nos machos (ETCHES, 1996).

Os testículos das aves estão localizados no dorso da cavidade abdominal (Fig. 1), efetuando-se a espermatogênese a uma temperatura de 41°C em contraste com a temperatura escrotal dos mamíferos de 25°C a 26°C. Embora nas fêmeas das aves só o ovário esquerdo seja funcional, nos machos ambos os testículos são funcionais. Na idade da maturidade sexual, os testículos passam de 2 - 4g para 25 - 35g. Normalmente, o testículo esquerdo é 0,5 – 3,0 g mais pesado que o direito (PARKHURST; MOUNTNEY, 1988).

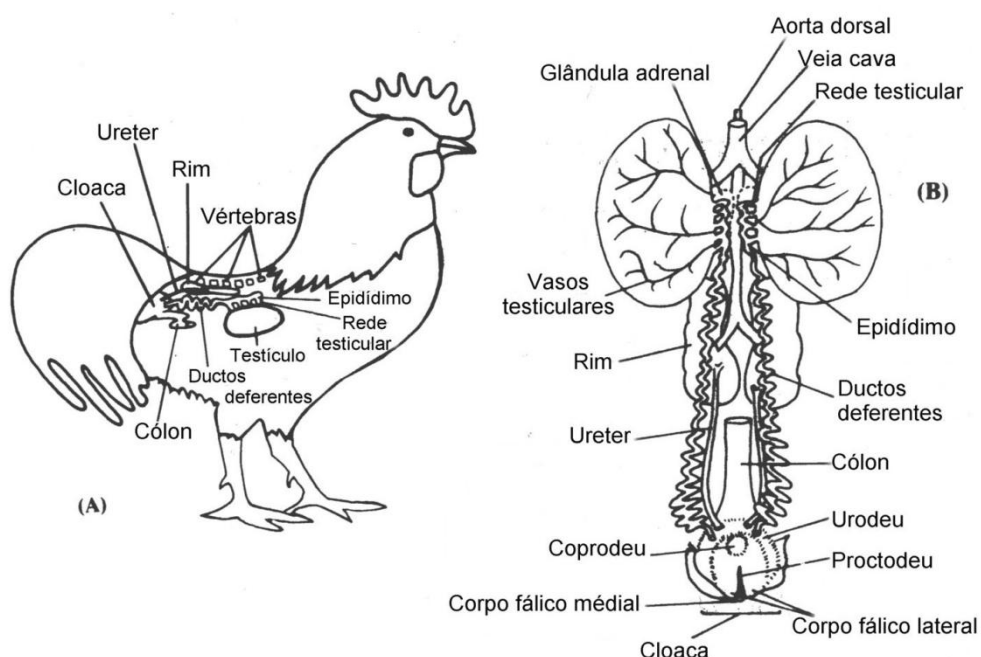


Figura 1. Fonte: Adaptado de BURROWS; QUINN, 1937. (A) Localização dos testículos e ductos deferentes nas aves (B) conexão dos túbulos seminíferos aos ductos deferentes.

Cada testículo está rodeado por tecido conjuntivo contendo os túbulos seminíferos e as células de Leydig dispersas entre os espaços tubulares. Estas

células produzem vários andrógenos dos quais o principal é a testosterona (ETCHES, 1996).

Segundo Parkhurst e Mountney (1988), os espermatozoides, nas aves, são armazenados nos ductos deferentes. Os túbulos seminíferos das aves estão dispostos numa rede de condutos interconectados que se esvaziam dentro da rede testicular. A periferia dos túbulos seminíferos está recoberta de espermatogônias, que são células diplóides, consideradas como o primeiro estágio da espermatogênese. A formação dos espermatócitos haplóides precisa da participação das células de Sertoli, situadas na periferia dos túbulos seminíferos. Estas células proporcionam o ambiente específico para a espermatogênese (ETCHES, 1996).

A cor do sêmen das aves varia de animal para animal, sendo geralmente, de cor branca e opaca, e apresenta pH entre 7,0 e 7,6 (PARKHURST; MOUNTNEY, 1988). A produção diária de espermatozoides parece ocorrer em ritmo constante, da mesma forma que o volume do ejaculado, mas estes parâmetros são reduzidos quando o sêmen é coletado em maior frequência (ETCHES, 1996), mas a concentração e o volume também variam de animal para animal. Geralmente, o volume de sêmen coletado de galos pesados e treinado pode variar de 0,5 a 1,0 mL por ejaculado, com uma concentração de 1,7 a 3,5 bilhões de espermatozoides (PARKHURST; MOUNTNEY, 1988). O volume seminal médio para reprodutores leves é de 0,15 mL, com variações de 0,01 - 0,3 mL e a concentração média é de 5 bilhões de células, com variações de 2,0 - 7,5 bilhões de espermatozoides (ETCHES, 1996).

2.5 Inseminação artificial em aves e criopreservação do sêmen

O uso da inseminação artificial na indústria de perus é o meio mais eficiente para obtenção de progênie (ETCHES, 1996; DONOGHUE et al., 1998; DONOGHUE, 1999), assim como também é utilizada na indústria de aves de postura (ETCHES, 1996), enquanto que na indústria de aves de corte a monta natural ainda é a principal forma usada.

Para aumentar o uso do ejaculado e diminuir os custos da técnica de inseminação artificial, utiliza-se a adição de diluentes ao sêmen (CHRISTENSEN,

1995), porém, a preservação do sêmen de galos diluído por mais de 24 horas, resulta em diminuição da fertilidade (BAKST; CECIL, 1992).

Para preservar o sêmen por longos períodos, através da técnica da criopreservação, é preciso adicionar crioprotetores ao diluente, que vem sendo testados ao longo dos anos na tentativa de congelar o sêmen de aves (TSELUTIN et al., 1995; WISHART, 1997). Uma alternativa de crioprotetor utilizado é a dimetilacetamida (DMA) (LAKE; RAVIE, 1984). Segundo Challah et al. (1999), a fertilidade obtida com sêmen congelado com DMA é comparável aquela obtida com sêmen fresco (TSELUTIN et al., 1999).

Após a inseminação com sêmen armazenado, a diminuição na fertilidade é atribuída aos danos na membrana celular do espermatozoide (MAEDA et al., 1986; DONOGHUE, 1996;). Com a armazenagem do sêmen, a motilidade, viabilidade e integridade morfológica do espermatozoide de galos (MAHAPATRA et al., 1994) e perus (DOUARD; HERMIER; BLESBOIS, 2000) são afetados. Embora Bakst e Sexton (1979) sugerem que as glicoproteínas de membrana envolvidas nos processos de reconhecimento e ligação do gameta não sejam afetadas pela criopreservação, foi observado que um menor número de espermatozoides é capaz de hidrolizar a membrana perivitelina interna do ovo (ALEXANDER et al., 1993; DONOGHUE, 1996).

Os danos na membrana que ocorrem durante o congelamento e descongelamento são devidos principalmente à formação de cristais de gelo. (HAMMERSTEDT, 1995).

A baixa fertilidade observada após estocagem *in vitro* do sêmen contrasta com a habilidade do espermatozoide em manter sua capacidade de fertilização após várias semanas armazenado *in vivo*, dentro das glândulas hospedeiras de espermatozoides da fêmea (BAKST; CECIL, 1992).

Com a criopreservação, ocorre uma diminuição drástica dos fosfolípidos predominantes no sêmen fresco: a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina (BLESBOIS; LESSIRE; HERMIER, 1997; CEROLINI et al., 1997a, 1997b). Ao mesmo tempo, ocorre diminuição da motilidade do espermatozoide e da fertilidade (DOUARD; HERMIER; BLESBOIS, 2000).

2.6 Linhaça (*Linum usitatissimum*)

A linhaça (*Linum usitatissimum*) pertence à família *Linaceae* (MORRIS e VAISEY-GENSER, 2003; TRUCOM, 2006) e vem sendo utilizada para consumo humano e também animal, tendo várias aplicações como matéria-prima para produção de óleo e farelo. O óleo é usado pelas indústrias na fabricação de tintas, vernizes e resinas, já o farelo é vendido para fábricas de rações animais. Também estão em desenvolvimento processos que incluem o óleo de linhaça em rações, de forma que os produtos para consumo humano como a carne, ovos, leite, possam ser enriquecidos com ácidos graxos n-3 (TURATTI, 2001).

As sementes de linhaça apresentam duas variedades – marrom e dourada. A cor das sementes é determinada pela quantidade de pigmentos presentes e ressalta-se que as condições de armazenamento podem afetar a cor, alterando o uso final da linhaça (MORRIS, 2007). A variedade marrom tem sido cultivada em regiões de clima quente e úmido, como o Brasil, e a dourada em regiões frias como o norte do Estados Unidos e o Canadá (LIMA, 2008).

No Brasil, a linhaça é produzida, principalmente, no noroeste gaúcho, sendo utilizada para a fabricação de tecidos, óleos para tinturas, cosméticos, medicamentos e para a alimentação animal e humana (TRUCOM, 2006).

A semente de linhaça é rica em gordura, fibra dietética e proteínas. Sua composição média é de 41% de gordura, 28% de fibra alimentar total, 20% de proteína, 7,7% de umidade, 3,5% de cinzas e 1% de açúcares simples. A quantidade de gordura na semente de linhaça pode variar de 34-47%, dependendo da localização, cultivo e condições ambientais (OOMAH; MAZZA, 1998; DAUN et al., 2003; FITZPATRICK, 2006).

Com seu perfil único de ácidos graxos, a semente de linhaça é pobre em ácidos graxos saturados. Apenas 9% dos ácidos graxos totais da linhaça são saturados. O nível de monoinsaturados (AGMI) é modesto, em torno de 18%, mas apresenta ótimo perfil de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), em média 73% (MORRIS; VAISEY-GENSER, 2003; MORRIS, 2007; MADHUSUDHAN, 2009). O perfil lipídico da linhaça pode ser melhor visualizado na tab. 1.

Tabela 1. Composição em ácidos graxos da linhaça (*Linum usitatissimum*)

| Nutrientes | Unidade | Valor por 100g |
|-------------------------------------------------|---------|----------------|
| Ácidos graxos, total saturados | g | 3,196 |
| Ácidos graxos, total AGMI | g | 6,868 |
| Ácidos graxos, total AGPI | g | 22,44 |
| Colesterol | mg | 0 |
| Ácido palmítico C16:0 | % | 5,7 – 7,0 |
| Ácido esteárico C18:0 | % | 3,0 – 4,0 |
| Ácido oleico (ω -9) C18:1 | % | 20,0 – 20,3 |
| Ácido linoleico (ω -6) C18:2 | % | 17,0 – 17,3 |
| Ácido α -linolênico (ω -3) C18:3 | % | 52,0 – 54,0 |
| Ácido araquídico C20:0 | % | <0,1 |

Fonte: USDA (2001); FIRESTONE (2006).

AGMI – ácidos graxos monoinsaturados

AGPI – ácidos graxos poliinsaturados

O óleo de linhaça é um óleo vegetal, geralmente de coloração amarelado-dourado, alaranjada, marrom ou âmbar (TRUCOM, 2006; ARAÚJO, 2007). O óleo apresenta-se mais viscoso que a maioria dos óleos vegetais em razão de elevado teor de ácidos graxos insaturados (principalmente o ácido α -linolênico – C18:3, n-3) (TRUCOM, 2006).

2.7 Soja (*Glycine max L.*)

A soja (*Glycine max L.*) é a oleaginosa mais cultivada no Brasil, que ocupa a 2ª posição do *ranking* mundial da produção, perdendo apenas para os Estados Unidos (EMBRAPA, 2013). Esta oleaginosa domina o mercado mundial tanto de proteína vegetal quanto o de óleo comestível (MORETTO; FEET, 1998).

O grão de soja possui cerca de 40% de proteínas, 20% de lipídios (óleo), 34% de carboidratos, além de minerais como potássio, cálcio, fósforo, ferro, cobre, magnésio e sódio. O óleo de soja é obtido do processamento dos grãos da soja, e os principais ácidos graxos que compõem o óleo são o linoléico, oléico, palmítico e α -linolênico.

A vantagem do óleo de soja em relação a outros se deve ao seu baixo preço aliado à sua boa qualidade. No Brasil, além de ser utilizado na alimentação humana

e animal e em diversos outros setores, o óleo de soja vem se destacando na produção de biodiesel (CAMPESTRE, 2007; EMBRAPA, 2013).

A tab. 2 detalha as características físico-químicas e os ácidos graxos presentes no óleo de soja de acordo com a RDC 482/99 da ANVISA de 1999.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos do óleo de soja (*Glycine max L.*).

| Nutrientes | Unidade | Valor por 100g |
|------------------------------------------|---------|----------------|
| Ácido mirístico (C14:0) | g | <0,5 |
| Ácido palmítico (C16:0) | g | 7,0 – 14,0 |
| Ácido palmitoléico (C16:1) | g | <0,5 |
| Ácido esteárico (C18:0) | g | 1,4 – 5,5 |
| Ácido oleico (n-9) (C18:1) | g | 19,0 – 30,0 |
| Ácido linoleico (n-6) (C18:2) | g | 44,0 – 62,0 |
| Ácido α -linolênico (n-3) (C18:3) | g | 4,0 – 11,0 |
| Ácido araquídico (C20:0) | g | <1,0 |
| Ácido eicosenóico (C20:1) | g | <1,0 |
| Ácido behênico (C22:0) | g | <0,5 |

Fonte: ANVISA (2007).

3 Material e métodos

3.1 Local e período experimental

O experimento ocorreu durante um período de 12 semanas e foi conduzido no Laboratório de Ensino e Experimentação Zootécnica (LEEZO) Professor Renato Rodrigues Peixoto, em área pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), próximo à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – “campus” Capão do Leão. As análises laboratoriais e o congelamento e descongelamento do sêmen foram realizados no Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves (LABRA), do departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da UFPel. No Laboratório de Nutrição Animal (LNA) do departamento de Zootecnia, foi feita a análise bromatológica da ração. Outra etapa do experimento foi conduzida no aviário do Instituto Federal Sul-Rio-Grandense – “campus” Pelotas - Visconde da Graça, durante um período de oito semanas, onde foram realizadas as inseminações artificiais nas galinhas e a coleta e incubação dos OVOS.

3.2 Animais, instalações e manejo

Foram utilizados 20 galos, semi-pesados, com idade de 14 meses e peso inicial médio de 3,644Kg, alojados em gaiolas metálicas individuais, com bebedouros tipo *nipple* e comedouros individuais tipo calha, alocadas no LEEZO (Fig. 2).

Todos os galos foram treinados anteriormente para a rotina da coleta de sêmen, que foi realizada pelo método de massagem dorso-abdominal proposta por Burrows e Quinn (1937), duas vezes por semana e com o auxílio de um tubo graduado de 15mL. 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.



Figura 2. Galos semi-pesados alojados em gaiolas metálicas individuais, com bebedouro tipo *nipple* e comedouro individual tipo calha.

3.3 Delineamento experimental

Os galos foram distribuídos em cinco tratamentos, com quatro repetições, em um delineamento experimental completamente ao acaso, sendo cada animal uma unidade experimental. Os tratamentos consistiram de cinco dietas experimentais: T1: dieta com 100% de óleo de soja e 0% de óleo de linhaça (controle); T2: dieta com 75% de óleo de soja e 25% de óleo de linhaça; T3: dieta com 50% de óleo de soja e 50% de óleo de linhaça; T4: dieta com 25% de óleo de soja e 75% de óleo de linhaça; e T5: dieta com 0% de óleo de soja e 100% de óleo de linhaça.

3.4 Dietas experimentais e manejo alimentar

As dietas experimentais foram formuladas de modo a atender as exigências nutricionais dos galos, segundo Rostagno et al. (2011), à base de milho e farelo de soja e suplementadas com minerais e vitaminas, sendo isoenergéticas e

isoprotéicas, diferindo apenas nos níveis de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja, como indicado na tab. 3. O fornecimento de ração, assim como o de água, foi à vontade e individual.

Durante um período de 11 semanas e em intervalos de sete dias, os galos e as sobras de ração foram pesados para a determinação do ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

Tabela 3 – Composição percentual e calculada das dietas experimentais para galos, com substituição de óleo de soja pelo óleo de linhaça.

| Ingredientes | Trat. 1 | Trat.2 | Trat.3 | Trat.4 | Trat.5 |
|-----------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | % | % | % | % | % |
| Milho | 66,99 | 66,99 | 66,99 | 66,99 | 66,99 |
| F. soja | 9,60 | 9,60 | 9,60 | 9,60 | 9,60 |
| F. trigo | 19,47 | 19,47 | 19,47 | 19,47 | 19,47 |
| Núcleo* | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| Calcário | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 |
| Sal | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 |
| Óleo soja | 0,20 | 0,15 | 0,10 | 0,05 | - |
| Óleo linhaça | - | 0,05 | 0,10 | 0,15 | 0,20 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| EM kcal/kg | 3247 | 3247 | 3247 | 3247 | 3247 |
| PB% | 13,22 | 13,22 | 13,22 | 13,22 | 13,22 |
| Met + Cis % | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,49 |
| Lisina % | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 | 0,59 |
| Cálcio % | 0,970 | 0,970 | 0,970 | 0,970 | 0,970 |
| Fósforo total % | 0,678 | 0,678 | 0,678 | 0,678 | 0,678 |

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

3.5 Parâmetros seminais analisados

O sêmen foi coletado através de massagem dorso-abdominal (BURROWS; QUINN, 1937), a cada sete dias, durante um período de seis semanas. Os

parâmetros seminais avaliados foram: volume do ejaculado, concentração, motilidade, integridade de membrana e teste de penetração espermática.

O volume foi medido diretamente em tubo coletor graduado. A concentração foi medida com espectrofotômetro previamente calibrado, utilizando sêmen diluído 1:1000 em citrato de sódio a 2,9% com glutaraldeído.

A motilidade foi avaliada subjetivamente ao microscópio óptico. O sêmen foi diluído 1:1 em cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, onde preparou-se duas lâminas e 100 espermatozoides foram contados em cada uma, classificando-os como móveis ou imóveis. Uma média das duas contagens foi feita e a motilidade foi expressa como porcentagem de espermatozoides móveis.

A integridade de membrana foi medida utilizando-se a coloração dupla SYBR-14 e PI (Live/Dead Sperm Viability Kit, Molecular Probes, OR). Em um tubo *ependorf*, o sêmen foi diluído em 500µl de cloreto de sódio a 0,9%, e após, foram adicionados 3µl de SYBR-14 e 1µl de PI. A mistura foi incubada no escuro, à temperatura ambiente, por no mínimo 15 e no máximo 180 minutos. A integridade de membrana foi avaliada em microscópio de fluorescência após a incubação, onde foram contados 100 espermatozoides, categorizados como vivos (corados com SYBR-14, coloração verde) ou mortos (corados com PI, coloração vermelha). Essa contagem foi feita em duas lâminas para cada amostra, e a média das duas contagens foi expressa como porcentagem de espermatozoides vivos (íntegros).

O teste de penetração espermática foi realizado de acordo com Robertson e Wishart (1997), em duplicata, utilizando-se duas membranas de ovos diferentes. Foram usados ovos frescos e não férteis, oriundos do aviário do Instituto Federal Sul-Rio-Grandense – “campus” Pelotas – Visconde da Graça. Para separação das membranas perivitelinas, a gema do ovo foi lavada com cloreto de sódio a 0,9% e em seguida colocada em ácido clorídrico (HCl) a 0,01M e incubada em estufa à 37°C, durante uma hora. Ocorre uma hidrólise ácida que separa a membrana perivitelina interna (MPI) da membrana perivitelina externa. Após separação, a MPI foi cortada em quadrados de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm. Cada quadrado foi incubado no meio de incubação por 5 minutos, em banho-maria à 40°C, juntamente com o sêmen diluído previamente em NaCl-TES na concentração de $1,25 \times 10^7$ esp/ml. Após a incubação, as membranas foram lavadas em NaCl 0,9% para remoção dos espermatozóides, esticadas em lâminas, coradas com eosina-nigrosina

e fotografadas ao microscópio. A contagem de orifícios foi feita posteriormente e a capacidade de penetração foi expressa como número de orifícios por mm².

3.6 Inseminação artificial e incubação dos ovos

Para avaliação da taxa de fertilidade do sêmen, os galos foram submetidos à coleta de sêmen para a realização da inseminação artificial em cinco galinhas (poedeiras comerciais) por tratamento, que estavam alojadas no aviário do IF-Sul – “campus” Pelotas – Visconde da Graça. Após a coleta do sêmen, foi realizado um *pool* do volume coletado dos quatro animais por tratamento e foram feitas as análises de motilidade e concentração espermática. A partir da concentração obtida foram feitos os cálculos dos volumes a serem inseminados por tratamento (a dose inseminante para todas as galinhas foi de 100 milhões de espermatozoides). Os ovos foram coletados durante 14 dias após inseminação única e depois foram transferidos para a incubadora. No sétimo dia de incubação foi feita ovoscopia para identificação dos ovos férteis. Estes continuaram sendo incubados até a eclosão, enquanto que os ovos brancos foram quebrados para observação do disco germinal e identificação de morte embrionária precoce.

3.7 Congelamento e descongelamento do sêmen

Após a coleta de sêmen, as alíquotas para as análises das características seminais foram retiradas e o restante da amostra foi diluído 1:1 (vol:vol) com diluente de Lake. As amostras foram resfriadas à 5°C por dez minutos e foi adicionado o crioprotetor dimetilacetamida (DMA) na concentração final de 6%. Após equilibrar por 60 segundos, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL que foram identificadas previamente. As palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio por 60 segundos e após, foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas.

O descongelamento foi feito por agitação das palhetas dentro do banho-maria à 40°C por 15 segundos. As palhetas foram secas com papel toalha e as duas extremidades foram cortadas com tesoura. O conteúdo das mesmas foi colocado dentro de tubos “ependorf”, que foram mantidos em temperatura ambiente para as análises posteriores, descritas no item 3.5.

3.8 Análise da composição bromatológica das dietas

Foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal, do departamento de Zootecnia da UFPel, análise bromatológica das dietas experimentais. As amostras de ração de cada tratamento foram colocadas para secar em estufa (105°C) para determinação da matéria seca, por 16 horas; determinação de matéria mineral em mufla a 550°C por 5 horas; determinação de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para conversão de nitrogênio total em proteína bruta e determinação de extrato etéreo em extrator *Soxhlet* com éter de petróleo, segundo metodologia descrita por A.O.A.C. (2000).

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Assistat (2011). A análise de variância de medidas repetidas foi utilizada para comparar tratamentos quanto à motilidade, integridade de membrana, volume, concentração e número total de espermatozoides, enquanto que os dados de penetração espermática foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis (para dados não paramétricos).

Para verificar a normalidade das variáveis, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Houve necessidade de transformação de dados para ajustar a normalidade para as variáveis: motilidade espermática e integridade de membrana, ambas para arco seno raiz de $X/100$. Os efeitos dos níveis do óleo de linhaça foram calculados por análise de regressão linear.

Para as variáveis estudadas, utilizou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + L_i + E_{ij}$$

Em que:

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

μ = média geral;

L_i = efeito do óleo de linhaça ($i= 1, 2, 3, 4, 5$);

E_{ij} = erro aleatório.

Para análise dos dados de fertilidade, utilizou-se o teste do Qui-quadrado.

4. Resultados e discussão

4.1 Desempenho zootécnico

As análises de regressão revelaram que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) dos diferentes níveis de óleo de linhaça, sobre o consumo de ração e o ganho de peso conforme dados apresentados na tab. 4.

Tabela 4. Médias (\pm erro padrão) das variáveis de desempenho zootécnico de galos submetidos à dietas com diferentes níveis de óleo de linhaça.

| Níveis linhaça (%) | Peso inicial médio(g) | Peso final médio(g) | Consumo médio(g) | GP médio(g) |
|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 0 | 3437,0 \pm 253,2 | 3687,0 \pm 183,5 | 10095,0 \pm 544,0 | 250,5 \pm 70,9 |
| 25 | 3685,0 \pm 213,5 | 3823,0 \pm 210,0 | 9625,0 \pm 453,6 | 137,5 \pm 35,7 |
| 50 | 3785,0 \pm 154,5 | 3943,5 \pm 127,5 | 9461,0 \pm 665,2 | 158,5 \pm 43,2 |
| 75 | 3653,0 \pm 317,7 | 3808,5 \pm 298,7 | 10047,0 \pm 257,0 | 156,0 \pm 38,5 |
| 100 | 3661,0 \pm 494,0 | 3807,0 \pm 473,0 | 10540,0 \pm 180,1 | 146,0 \pm 28,0 |
| p* | 0,22 | 0,18 | 0,19 | 0,29 |
| R² | 0,19 | 0,16 | 0,17 | 0,20 |

GP: ganho de peso (g); p*: nível de significância a 5%, pela regressão simples; R²: coeficiente de determinação.

O controle do consumo de ração foi realizado, pois o óleo de linhaça possui características organolépticas diferentes do óleo de soja, que poderia diminuir sua aceitação pelos animais, e conseqüentemente uma alteração no consumo de ração das aves poderia interferir nos resultados das análises das características espermiáticas, podendo levar a uma interpretação errônea dos resultados.

Na literatura não foram encontrados trabalhos com galos adultos reprodutores, avaliando o uso de óleos vegetais na ração sobre o desempenho zootécnico. Em frangos de corte no período de crescimento, Almeida et al (2009) avaliaram o efeito do óleo de linhaça sobre o desempenho zootécnico dos animais e não observaram interferência nos parâmetros avaliados. Diferentemente desses resultados, trabalhando com frangos de corte de 1 a 43 dias de idade, Murakami et al. (2009) testaram a inclusão do óleo de linhaça às rações e obtiveram aumento no ganho de peso e melhora na conversão alimentar dos animais que receberam dietas com mais óleo de linhaça.

No presente experimento, ao se trabalhar com animais adultos, não era esperado que ocorressem alterações significativas no consumo de ração e demais características de desempenho zootécnico.

4.2 Características espermáticas – análises do sêmen fresco

4.2.1 Volume seminal

As médias dos tratamentos para a variável volume seminal e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são mostrados na tab. 5.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial não foi significativo ($P > 0,05$) para ajuste linear, quadrático ou cúbico, conforme observado na tab. 5 e na fig3. Isso demonstrou que o aumento crescente do nível de óleo de linhaça, em substituição parcial ou total ao óleo de soja na dieta, não foi associado com o volume seminal.

Tabela 5. Média do volume seminal (\pm erro padrão) de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|-------------|-------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Volume (mL) | 0,623 \pm 0,22 | 0,505 \pm 0,15 | 0,537 \pm 0,14 | 0,433 \pm 0,08 | 0,566 \pm 0,07 |
| Prob | Lin >0,05 | Quad 0,24 | Cub >0,05 | 4ºGrau >0,05 | |

Etches (1996), relatou uma variação de volume seminal entre 0,15 e 0,30mL para galos leves e de 0,20 a 0,50mL para galos semi-pesados. Em mamíferos, a maior proporção do volume seminal é originária das glândulas acessórias (HAFEZ, 1982), mas em aves, a ausência de vesículas seminais e glândula prostática resulta em reduzido volume seminal (PARKHURST; MOUNTNEY, 1988).

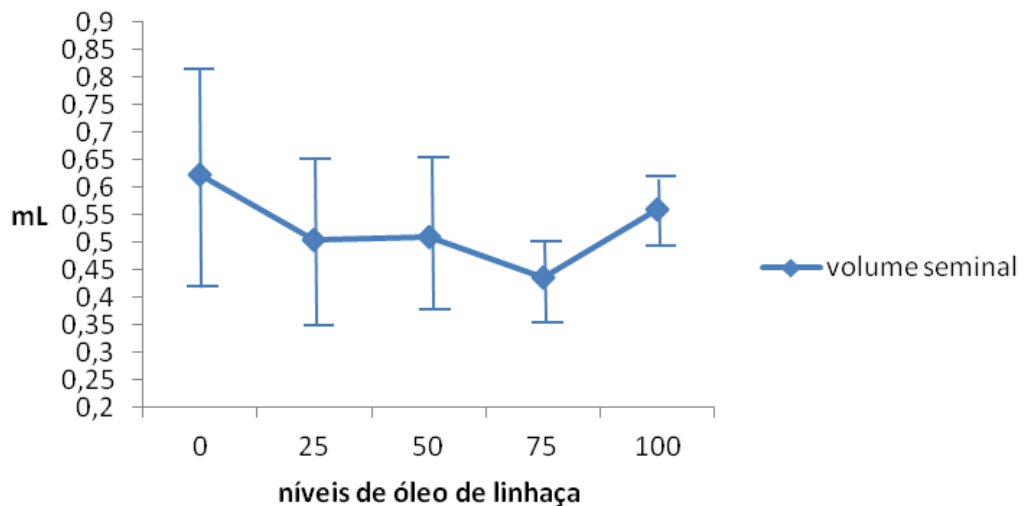


Figura 3. Volume seminal médio de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

Para a variável volume seminal também não era esperado que houvesse diferença significativa entre os tratamentos. O volume do ejaculado poderia ser afetado se houvesse diferença no consumo alimentar, ou se os animais não tivessem acostumados com o manejo e coleta de sêmen adotados, causando situações de estresse, o que também não aconteceu.

Os mesmos resultados para a variável volume seminal foram encontrados em estudos realizados por Kelso et al. (1997b), onde o volume não foi afetado pela adição de óleo de linhaça em reprodutores da linhagem Cobb que receberam suplementação (6%) das 24 às 72 semanas de idade, comparados com os animais que receberam dietas com o óleo de soja.

4.2.2 Motilidade espermática

As médias dos tratamentos para a variável motilidade espermática e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são apresentados na tab 6.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial indica que foi o modelo cúbico que melhor se ajustou para estimar o efeito do óleo de linhaça sobre a motilidade ($Y = 0,57858 + 0,01428X - 0,000497X^2 + 0,00000377X^3$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,92$).

Tabela 6. Média da motilidade espermática (\pm erro padrão) de galos suplementados com diferentes níveis de óleo de linhaça.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|----------------|-------------------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Motilidade (%) | 70,0 \pm 6,66 | 55,5 \pm 5,17 | 79,4 \pm 6,26 | 77,7 \pm 5,15 | 48,8 \pm 2,57 |
| Prob | Linear | Quadrática | Cúbica | 4º Grau | |
| | 0,14 | 0,0012 | <0,001* | 0,08 | |

*significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Houve necessidade de transformação dos dados para ajustar a normalidade da variável. Para tal, utilizou a transformação para arcoseno raiz de $X/100$. A análise foi realizada com os dados transformados, porém os dados que estão sendo mostrados são os originais, para uma melhor visualização dos resultados.

Os tratamentos que resultaram na menor e maior motilidade foram os níveis de 100% e 50% de óleo de linhaça, respectivamente, conforme visualizados na fig. 4.

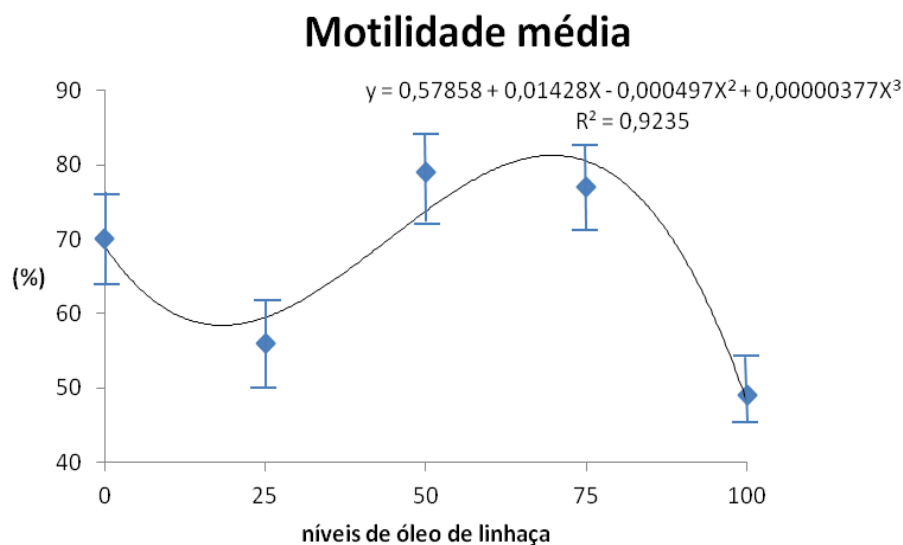


Figura 4. Motilidade espermática média de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

Segundo Bongalhardo (2002) as membranas da cabeça e da cauda do espermatozoide de galo possuem um perfil de ácido graxo diferente. Em outro trabalho, Bongalhardo et al. (2009) relataram que a maior incorporação de ácidos graxos poliinsaturados da série n-3 ocorrem na cauda do espermatozoide.

Nesse trabalho, o aumento da motilidade espermática pode ser devido a uma maior incorporação dos ácidos graxos provenientes do óleo de linhaça à cauda do espermatozoide, proporcionando uma maior fluidez da cauda e conseqüentemente maior motilidade. Porém, ao se utilizar um nível alto de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja (100% de substituição), pode ter causado uma desestabilização da membrana, reduzindo a motilidade do espermatozoide.

Em estudos realizados por Kelso et al. (1997b) a motilidade espermática não foi afetada pela adição de óleo de linhaça em reprodutores da linhagem Cobb que receberam suplementação (6%) das 24 às 72 semanas de idade, comparados com os animais que receberam suplementação com óleo de soja.

4.2.3 Concentração espermática

As médias dos tratamentos para a variável concentração espermática e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são apresentados na tab. 7.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial não foi significativo ($P>0,05$) para ajuste linear, quadrático ou cúbico, conforme observado na tab. 7 e fig. 5, indicando que o aumento do nível de óleo de linhaça em substituição total do óleo de soja não foi associado com alterações na concentração espermática dos galos.

Tabela 7. Média da concentração espermática (\pm erro padrão) de galos reprodutores alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Concentração (esp/mm ³) | 3,90 \pm 0,37 | 3,05 \pm 0,59 | 3,74 \pm 0,86 | 3,23 \pm 0,13 | 2,86 \pm 0,22 |
| Prob | Lin >0,05 | Quad >0,05 | Cub >0,05 | 4º Grau >0,05 | |

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).

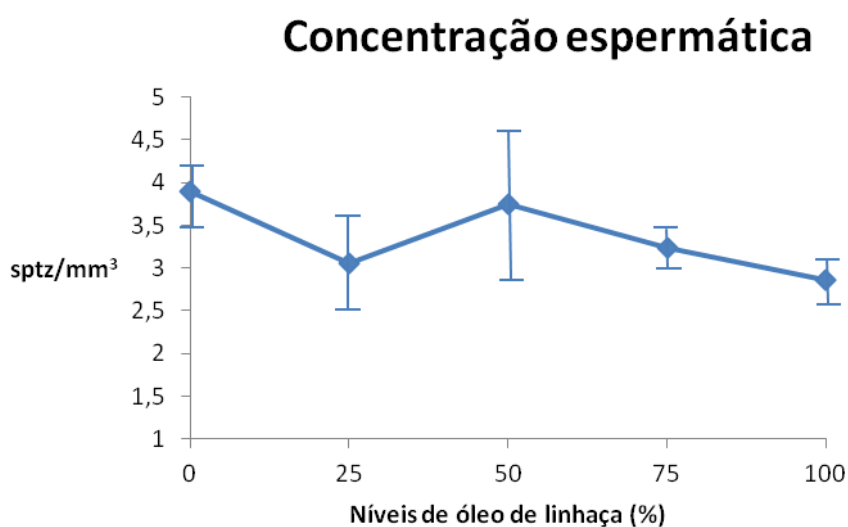


Figura 5. Concentração espermática média de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

Segundo Celeghini et al. (2000), a concentração espermática apresenta correlação baixa com o peso corporal em galos. Rodenas et al. (2005), trabalhando com galos Lohman-LSL, de 29 semanas de idade, alimentados com diferentes fontes de óleo, também observaram um efeito significativo do peso corporal sobre a concentração espermática ($P < 0,05$), onde os animais mais pesados apresentaram maior concentração espermática, independentemente do tratamento utilizado.

Surai et al. (2000) mencionam em um trabalho realizado com galos da linhagem Ross suplementados com diferentes fontes de óleo e vitamina E, às 26 semanas de idade, que o resultado da concentração espermática está diretamente relacionado ao volume seminal.

4.2.4 Integridade de membrana

As médias dos tratamentos para a variável integridade de membrana e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são apresentados na tab. 8.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial não foi significativo ($P > 0,05$) para ajuste linear, quadrático ou cúbico, conforme observado na tab. 8 e fig.6, indicando que o aumento do nível de óleo de linhaça em substituição parcial ou total ao óleo de soja não está associado com alterações na integridade de membrana de espermatozoides de galos.

Tabela 8. Média da integridade de membrana (\pm erro padrão) de espermatozoides de galos reprodutores alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|-----------------|-------------------------------------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Integridade (%) | 65,0 \pm 3,33 | 79,4 \pm 1,46 | 82,2 \pm 2,93 | 79,7 \pm 3,13 | 77,7 \pm 1,84 |
| Prob | Linear >0,05 | Quadrática 0,23 | Cúbica >0,05 | 4º Grau >0,05 | |

Houve necessidade de transformação dos dados para ajustar a normalidade da variável integridade de membrana. Para tal, utilizou a transformação para arcoseno raiz de $X/100$. A análise foi realizada com os dados transformados, porém

os dados que estão sendo mostrados são os originais, para uma melhor visualização dos resultados.

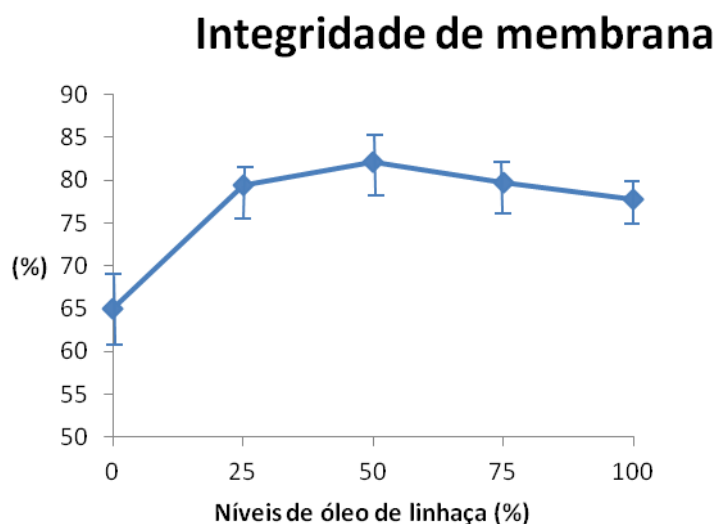


Figura 6. Integridade de membrana média (%) de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

O SYBR-14 e o iodeto de propídio (PI) são sondas fluorescentes muito utilizadas para verificar a integridade de membrana de sêmen fresco e resfriado ($>0^{\circ}\text{C}$) de aves. O corante SYBR-14 é um marcador de ácido nucléico que permeia em qualquer membrana, corando o DNA, enquanto que o PI também cora DNA, porém apenas em células com lesão de membrana (CHALAH; BRILLARD, 1998).

Acreditava-se que a incorporação de ácidos graxos poliinsaturados da série n-3 à membrana do espermatozoide poderia deixá-la mais maleável, interferindo na integridade da membrana e na sua permeabilidade, porém, esses resultados não foram observados nas análises de integridade de membrana.

4.2.5 Teste de penetração espermática

As médias dos tratamentos para a variável furos na membrana perivitelina interna (MPI) e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são apresentados na tab. 9.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial não foi significativo ($P>0,05$) para ajuste linear, quadrático ou cúbico, conforme observado

na tab. 9 e fig. 7, indicando que os diferentes níveis de óleo de linhaça testados não estão associados com alterações na quantidade de orifícios da membrana perivitelina interna, do teste de penetração espermática dos galos.

Tabela 9. Média do número de orifícios na membrana perivitelina interna (\pm erro padrão) de espermatozoides de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Orifícios (furos/mm ²) | 246 \pm 63,33 | 212 \pm 114,59 | 164 \pm 96,75 | 197 \pm 71,77 | 164 \pm 104,07 |
| Prob | Linear >0,05 | Quadrática 0,23 | Cúbica >0,05 | 4º Grau >0,05 | |

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). Este tipo de teste serve para mostrar a função *in vivo* do sêmen (WISHART, 1995).

Teste de penetração espermática

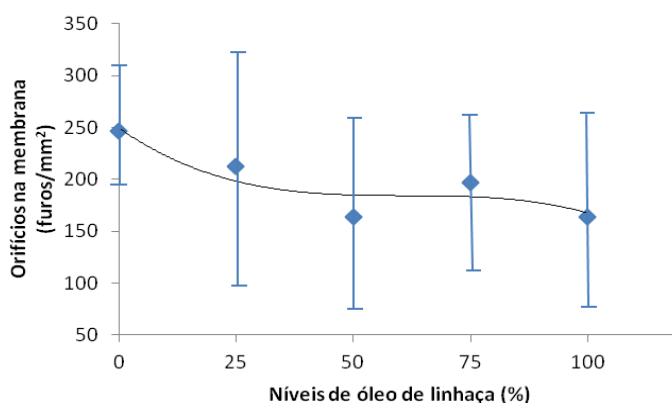


Figura 7. Média de orifícios na membrana perivitelina interna no teste de penetração espermática de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

A membrana perivitelina interna do ovo de aves, utilizada para o teste, possui receptores para ligação do espermatozoide, homólogos às glicoproteínas de ligação da zona pelúcida de mamíferos (MORI e MASUDA, 1993; TAKEUCHI et al., 1999; STEPINSKA e BAKST, 2007). A ligação do espermatozoide a estas

glicoproteínas desencadeia os eventos que levam à fertilização: ocorre a reação acrossomal, com a liberação de enzimas que vão hidrolizar a membrana e permitir a penetração do espermatozoide (ASHIZAWA et al., 2006).

O teste de penetração espermática avalia principalmente a capacidade de ligação do espermatozoide à membrana do ovo e a sua capacidade de perfurar a membrana. É um teste realizado *in vitro*, e para que ele seja efetivo, tanto a membrana do espermatozoide quanto a membrana do ovo devem estar estruturalmente intactas (BAKST, 2010). Como não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável integridade de membrana, não era esperado que ocorressem diferenças também na penetração espermática da IPVL.

4.2.6 Taxa de fertilidade

Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) no teste do qui-quadrado, entre os níveis de óleo de linhaça utilizados neste experimento sobre a taxa de fertilidade. Os resultados para essa variável são apresentados na Tab. 10.

Tabela 10. Taxa de fertilidade (%) dos espermatozoides de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | | Prob |
|-------------------------|-------------------------------------------|------|------|------|------|-------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | |
| Taxa de fertilidade (%) | 39,0 | 40,0 | 57,0 | 41,0 | 48,0 | 0,056 |

Como consequência da influência significativa na motilidade espermática pelos tratamentos, poderia ser esperado que estes resultados se refletissem na taxa de fertilidade ($P < 0,05$), entretanto, isto não ocorreu. Provavelmente isto se deve ao fato de que, mesmo com médias menores em alguns tratamentos, a motilidade espermática apresentada foi suficiente para que os espermatozoides conseguissem se mover pelo trato reprodutivo da galinha até o local da fertilização do óvulo. Dessa forma, a taxa de fertilidade entre os níveis de óleo de linhaça testados não foi influenciada significativamente.

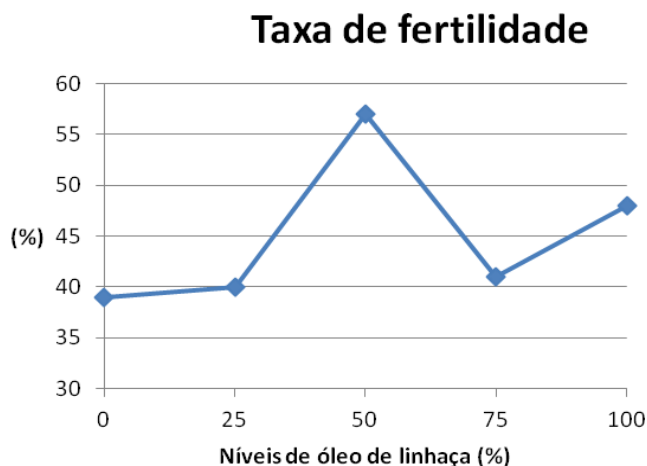


Figura 8. Taxa de fertilidade (%) de galos reprodutores alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

Apesar das taxas de fertilidade não apresentarem diferenças significativas entre os tratamentos, observou-se que ocorreram valores abaixo do esperado na inseminação artificial com sêmen fresco em aves. Segundo Etches (1996), a taxa de fertilidade ótima, na inseminação artificial, depende de vários fatores, como a dose inseminante, idade do galo, da galinha, método de coleta de sêmen, intervalo entre coleta e inseminação, técnica de inseminação e qualquer outro fator que possa afetar a capacidade de fertilização.

Em todas as aves domésticas, a concentração da dose inseminante varia entre 50 e 200 milhões de espermatozoides (ETCHES, 1996). No experimento foi utilizada a dose de 100 milhões de células espermáticas. Os galos, apesar de não serem animais jovens, ainda estavam em idade apropriada para uma boa produção espermática, comprovado pelas análises das características seminais. O método de coleta de sêmen utilizado foi o descrito por Burrows e Quinn (1937), ao qual os animais já estavam acostumados. O tempo entre coleta e inseminação foi de aproximadamente duas horas, mas com o sêmen diluído e refrigerado a uma temperatura de 5°C até o momento da inseminação, sua capacidade fertilizante é mantida de 24 a 48 horas. Quanto à idade das galinhas que foram inseminadas (48 semanas), supõe-se que este poderia ter sido um fator determinante para a ocorrência da baixa taxa de fertilidade. Segundo estudos realizados por Breque et al. (2006), com o envelhecimento do animal, a partir das 40 semanas de idade, ocorre um grande declínio de um sistema antioxidante existente na junção útero-vaginal (principal local de armazenamento dos espermatozóides). Esse sistema do trato

reprodutivo da galinha é eficaz no controle da peroxidação lipídica das membranas plasmáticas do espermatozoide. Com a deterioração progressiva desse perfil antioxidante que ocorre com o envelhecimento da galinha, ocorre um favorecimento da peroxidação lipídica da membrana da célula espermática, nocivo à esta célula, podendo ser seguido por uma degradação do material genômico do espermatozoide.

Ao contrário dos resultados obtidos nesse estudo, Kelso et al. (1997c) relata que ao trabalhar com galos da linhagem Cobb, suplementados com óleo de soja e linhaça, observou um aumento da taxa de fertilidade às 39 semanas de idade, nos animais que receberam o óleo de linhaça. Segundo Blesbois et al. (1997), rações suplementadas com óleos ricos em ácidos graxos melhoram a capacidade fertilizante do sêmen de galos a partir das 39 semanas de idade.

4.3 Características espermáticas – análises do sêmen congelado

4.3.1 Motilidade espermática

As médias dos tratamentos para a variável motilidade espermática e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são apresentados na tab. 11.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial indica que foi o modelo quadrático que melhor se ajustou para estimar o efeito do óleo de linhaça sobre a motilidade ($Y = 24,142 - 0,251X + 0,003X^2$; $P < 0,01$; $R^2 = 0,85$).

Tabela 11. Média da motilidade espermática (\pm erro padrão) do sêmen descongelado de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|----------------|-------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Motilidade (%) | 25,0 \pm 3,33 ^B | 18,33 \pm 5,18 ^C | 18,33 \pm 5,18 ^C | 25,0 \pm 3,33 ^B | 28,33 \pm 8,88 ^A |
| Prob | Linear 0,07 | Quadrática 0,0039* | Cúbica 0,18 | 4º Grau >0,05 | |

*significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,01$)

A motilidade espermática média do sêmen descongelado é menor ao utilizar 25 e 50% de óleo de linhaça, aumentando nos níveis de 0 e 75% e obtendo os melhores resultados utilizando 100% de óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja, conforme melhor visualizado na fig. 9.

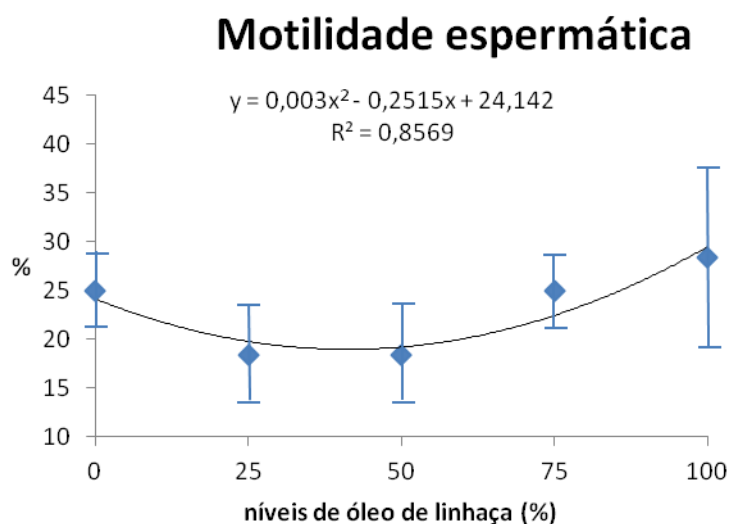


Figura 9. Motilidade espermática média (%) do sêmen descongelado de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

O processo de criopreservação do sêmen causa alguns danos à membrana plasmática do espermatozoide, alterando a sua permeabilidade, composição lipídica e a sua fluidez (BLESBOIS et al., 2008). Era esperado melhor resultado para a motilidade espermática no tratamento com maior inclusão de óleo de linhaça, pois se supõe que os espermatozoides com maior incorporação de ácidos graxos poliinsaturados n-3, tem sua membrana plasmática mais maleável, e conseqüentemente sofre menos danos durante o congelamento, refletindo assim em uma maior capacidade de movimento após o descongelamento do sêmen.

4.3.2 Integridade de membrana

As médias dos tratamentos para a variável integridade de membrana e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são apresentados na tab. 12.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial não foi significativo ($P>0,05$) para ajuste linear, quadrático ou cúbico, conforme observado na tab. 12 e fig. 10, indicando que o aumento do nível de óleo de linhaça em substituição parcial ou total ao óleo de soja não está associado com alterações na integridade de membrana de espermatozoides de galos após o congelamento e descongelamento do sêmen.

Tabela 12. Média da integridade de membrana (\pm erro padrão) de espermatozoides de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça após processo de congelamento e descongelamento.

| | | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|-----------------|--------|-------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Integridade (%) | | 22,22 \pm 7,90 | 18,88 \pm 3,70 | 25,0 \pm 4,44 | 22,77 \pm 5,43 | 25,55 \pm 5,06 |
| Prob | Linear | 0,20 | Quadrática | >0,05 | Cúbica | >0,05 |
| | | | | | 4º Grau | 0,15 |

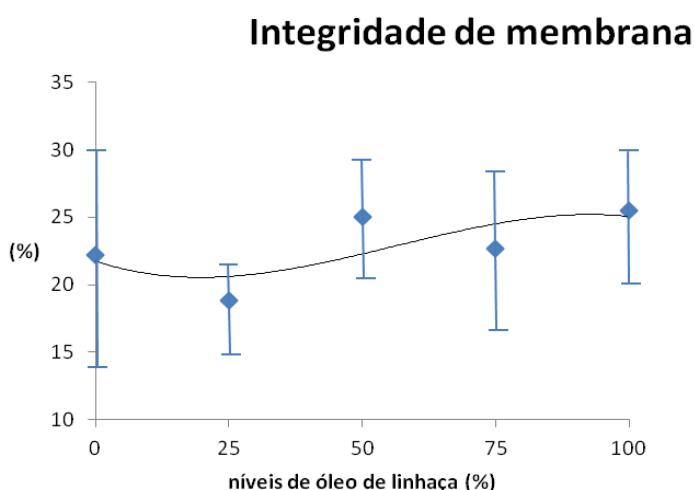


Figura 10. Integridade de membrana média (%) do sêmen descongelado de galos alimentados com dietas contendo óleo de linhaça.

Assim como no sêmen fresco, no sêmen congelado também se acreditava que ocorreriam diferenças entre os tratamentos para a variável integridade de membrana, o que não ocorreu. Ao se tratar de criopreservação, é interessante a incorporação de AGPIs n-3 à membrana do espermatozoide para promover uma

maior fluidez da membrana, e assim, reduzir os danos causados na membrana plasmática pelos processos de congelamento e descongelamento. Da mesma forma que na motilidade espermática do sêmen descongelado, esperava-se que o maior nível de óleo de linhaça utilizado resultasse em melhores valores na análise da integridade de membrana, quando comparado com os outros tratamentos.

4.3.3 Teste de penetração espermática

As médias dos tratamentos para a variável orifícios na membrana perivitelina interna (MPI) e o resultado do teste F global para o ajustes das equações de regressão são apresentados na tab. 13.

O resultado do teste F para o modelo de regressão polinomial indica que foi o modelo quadrático que melhor se ajustou para estimar o efeito do óleo de linhaça sobre a quantidade de orifícios na MPI do teste de penetração espermática ($Y = 17,52 - 0,25X + 0,0032X^2$; $P=0,04$; $R^2=0,89$).

Tabela 13. Média do número de orifícios na membrana perivitelina interna (\pm erro padrão) do sêmen descongelado de galos alimentados com diferentes níveis de óleo de linhaça.

| | Níveis de inclusão de óleo de linhaça (%) | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| Orifícios (furos/mm ²) | 18,44 \pm 14,02 | 11,55 \pm 3,97 | 12,55 \pm 6,17 | 18,88 \pm 5,01 | 23,22 \pm 8,69 |
| Prob | Linear | Quadrática | Cúbica | 4º Grau | |
| | 0,14 | 0,04 | >0,05 | >0,05 | |

Ao analisar o sêmen que passou pelo processo de criopreservação, foram obtidos resultados diferentes dos obtidos com sêmen fresco. Enquanto que no sêmen fresco os tratamentos não influenciaram significativamente no teste de penetração espermática, no sêmen que foi congelado o maior nível de óleo de linhaça na dieta (100%) influenciou significativamente e obteve melhores médias para o número de orifícios na MPI, conforme mostra o gráfico a seguir (fig. 11).

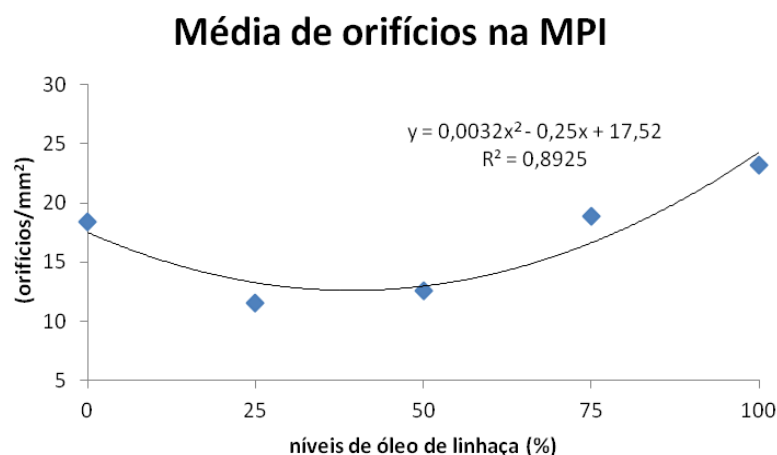


Figura 11. Média de orifícios na MPI do teste de penetração espermática de sêmen descongelado de galos alimentados com óleo de linhaça em substituição ao óleo de soja.

Esse resultado obtido no teste de penetração espermática pode ser explicado pelos resultados obtidos na motilidade espermática do sêmen descongelado. Apesar de não diferirem os tratamentos na integridade de membrana, houve uma diferença significativa na motilidade dos espermatozoides, que refletiu na capacidade das células espermáticas em se moverem até a membrana perivitelina interna do ovo, resultando em um maior número de orifícios para o mesmo tratamento que teve maior média de motilidade, ou seja, o tratamento com maior inclusão de óleo de linhaça.

De acordo com Blesbois et al. (2007), os danos causados pela criopreservação do sêmen diminuem a qualidade geral dos espermatozoides. Pode-se observar que, embora se tenha resultados melhores para o sêmen congelado com a inclusão de maiores níveis de óleo de linhaça na dieta dos animais, esses resultados quando comparados com os do sêmen fresco ainda não são representativos ao nível de mercado.

5. Conclusões e considerações finais

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que:

- A substituição parcial ou total do óleo de soja pelo óleo de linhaça na dieta dos galos não influenciou no desempenho zootécnico dos animais;
- A motilidade espermática do sêmen fresco foi melhorada quando substituiu-se em 50% o óleo de soja pelo óleo de linhaça na dieta dos galos;
- No sêmen congelado houve melhor motilidade e aumento no número de orifícios do teste de penetração espermática quando o óleo de soja foi substituído totalmente pelo óleo de linhaça na dieta dos galos;
- A substituição parcial ou total do óleo de soja pelo óleo de linhaça na dieta dos galos não influenciou a taxa de fertilidade do sêmen.

Muitos estudos terão que ser feitos ainda na tentativa de melhorar a fertilidade do sêmen criopreservado de aves. Com certeza essas melhorias irão colaborar para o uso industrial em grande escala dessa tecnologia, e assim, auxiliar na redução dos custos de produção na avicultura mundial.

6. Referências

- ALEXANDER, A.; GRAHAM, J.; HAMMERSTEDT, R.H.; BARBATO, G.F. Effects of genotype and cryopreservation of avian semen on fertility and number of perivitelline spermatozoa. **British Poultry Science**, v.34, p.757-764, 1993.
- ALMEIDA, A.P.S.; PINTO, M.F.; POLONI, L.B.; PONSANO, E.H.G.; GARCIA NETO, M. Efeito do consumo de óleo de linhaça e de vitamina E no desempenho e nas características de carcaças de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.698-705, 2009.
- AMANN, R.P. Symposium: Managing poultry reproduction to satisfy market demands - Introduction and dedication. **Poultry Science**, v.78, p.412-413, 1999.
- ANVISA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm>. Acessado em: 10 jan. 2013.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. ed.3, Viçosa: IUN, p.1-62. 2007.
- ASHIZAWA, K.; WISHART, G.J.; KATAYAMA, S.; TAKANO, D.; RANASINGHE, A. R.A.H.; NARUMI, K.; TSUZUKI, Y. Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. **Reproduction**, v.131, p.1017-1024, 2006.
- ASSISTAT. Versão 7.6 beta. Por Francisco de A. S. e Silva. DEAG-CTRN-UFCG (2011).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of analysis**. 13.ed. Arlington: AOAC International, 2000. 989p.
- BAKST, M.R.; CECIL, H.C. Research note: effects of agitation and temperature changes on turkey sperm viability after twenty-four hour storage. **Poultry Science**, v.71, p.395-397, 1992.
- BAKST, M. R., 2010. Nigrosin/Eosin stain for determining live/dead and abnormal counts. In: BAKST, M. R.; LONG, J. A. (eds.) **Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage and Fertility Determination**. 2nd ed. Buffalo, MN: The Midwest Poultry Federation, 2010. Chapter III. Sperm Viability. Section 1, p.28-34.

BAKST, M.R.; SEXTON, T.J. Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.55, p.1-7, 1979.

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

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

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; SEIGNEURIN, F.; MIGNON-GRASTEAU, S.; SAINT JALME, M.; MIALON-RICHARD, M.M. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. **Theriogenology**, v.69, p. 252-261, 2008.

BONGALHARDO, D.C. Modifying lipid composition of rooster sperm: dietary and direct manipulation of membrane lipids and effects on sperm characteristics. 2002. PhD thesis. University of Guelph, Guelph.

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

BRAMWELL, R.K.; MARK, H.L.; HOWARTH, B. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. **Poultry Science**, v.74, p.1875–1883, 1995.

BREQUE, C.; PETER, S.; BRILLARD, J.P. Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1045-1051, 2006.

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

CAMPESTRE. Óleo de Soja (2007). Disponível em: <<http://www.campestre.com.br/oleo-de-soja.shtml>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

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: **CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS**, 2000, Campinas. v. 1, p. 56.

CELEGHINI, E.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**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 177-183, 2001.

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

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

CEROLINI, S.; SURAI, P.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T.; NOBLE, R. Lipid composition of semen in different fowl breeders. **Poultry and Avian Biology Reviews**, v.8, p.141-148, 1997b.

CEROLINI, S.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; MALDJIAN, A.; ZANIBONI, L.; PARODI, L. Lipid manipulation in chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. **World Poultry Science Journal**, Washington, v. 59, n. 1, p. 65-75, 2003.

CHALAH, T., BRILLARD, J.P. Comparison of assessment of fowl sperm viability by Eosin-Nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). **Theriogenology**, v.50, p.487-493, 1998.

CHALLAH. T.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E.; BRILLARD, J.P. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Cryobiology**, v.39, p.185-191, 1999.

CHRISTENSEN, V.L. Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. In: Bakst MR, Wishart GJ (eds.), **First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry**, Proceedings. Savoy, IL: Poultry Science Association, p.90-106, 1995.

DAUN, J.K.; BARTHET, V.J.; CHORNICK, T.L.; DUGUID, S. Structure, composition, and variety development of flaxseed. In: THOMPSON, L.U.; CUNNANE, S.C. **Flaxseed in human nutrition**. 2nd ed. Champaign IL.: AOCS Press, 2003. p.1- 40.

DONOGHUE, A.M. The effect of twenty-four hour in vitro storage on sperm hydrolysis through the perivitelline layer of ovipositioned turkey eggs. **Poultry Science**, v.75, p.1035-1038, 1996.

DONOGHUE, A.M.; HOLSBERGER, D.R.; EVENSON, D.P.; FROMAN, D.P. Semen donor selection by *in vitro* sperm mobility increases fertility and semen storage in the turkey hen. **Journal of Andrology**, v.19, p.295-301, 1998.

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

DOUARD, V.; HERMIER, D.; BLESBOIS, E. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1450-1456, 2000.

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

EMBRAPA. Soja na Alimentação. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23. Acesso em: 10 jan. 2013.

EMBRAPA. Soja em números. Disponível em:
http://www.cnpsa.embrapa.br/index.php?cod_pai=2&op_page=294.
Acesso em: 15 dez. 2013.

FIRESTONE, D. **AOCS catalog, physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes**. 2nd ed. Boulder, USA: AOCS Press, 2006. 237 p.

FITZPATRICK, K. **North America flax facts important questions & answers for improved health and nutrition**. 2nd ed. Revised May 2006. Disponível em:
<http://www.ameriflax.com/UserFiles/Image/Flax_Facts_II.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2012.

FUJIHARA, N.; KOGA, O. Prevention of the production of lipid peroxide in rooster spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 385-390, 1984.

GENNIS, R.B. **Biomembranes: Molecular structure and function**. New York: Springer-Verlag, 1989.

GONZÁLEZ, F.H.D, SILVA,S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2006.

GUR, M.G. **Role of fats in food and nutrition**. London: Elsevier applied science, 1992.

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

HAMMERSTEDT, R.H. Cryopreservation of poultry semen - Current status and economics. In: Bakst MR, Wishart GJ (eds.), **First International Symposium on the artificial insemination of poultry**. Savoy, IL: Poultry Science Association; p.229-250, 1995.

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

HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. **Manual de química fisiológica**, 5. ed. São Paulo: Atheneu, p. 846, 1982.

HOLMAN, R.T. A long scaly tale- the study of essential fatty acid deficiency at the university of Minnesota. In essential fatty acids and eicosanoids. In: SINCLAIR, A.; GIBSON, R. (Ed.). **American oils chemists'society**. Champaign: IL USA, 1992.

HUNTER, B.J.; ROBERTS, D.C.K. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nutrition Research* 20:1047-1058. 2000.

KELSO, K.A.; CEROLILNI, S.; NOBLE, R.C.; SPARK, N.H.C.; SPEAKE, B.K. The Effect of Dietary Supplementation with Docosahexaenoic Acid on the phospholipid fatty acid composition of avian spermatozoa. **Comparative Biochemistry Physiological**, B, Oxford, v. 118, n. 1, p. 65-69, Sept. 1997a.

KELSO, K.A. ; CEROLINI, S. ; SPEAKE, B.K. ; CAVALCHINI, L.G. ; NOBLE, R.C. Effects of dietary supplementation with α -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110 (1), p. 53-59, 1997b.

KELSO, K.A.; REDPATH, A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 1-6, Jan. 1997c.

KELSO, K.A.; CEROLINI, S.; NOBLE, R.C.; SPARKS, N.H.C.; SPEAKE, B.K. Lipid and antioxidant changes in semen broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 106, n. 2, p. 201-206, Mar. 1996.

KLÖPPE, L.H.; VARNER, D.D.; ELMORE, R.G. BRERZLAFF, K.N.; SHULL, J.W. Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.29, n.2, p. 429-439, 1988.

LAKE, P.E.; RAVIE, O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v.25, p.145-150, 1984.

LIMA, J.R. Caracterização físico-química e sensorial de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.1, p.191-195, 2008.

LIN, D.S.; CONNOR, W.E.; WOLF, D.P.; NEURINGER, M.; HATCHEY, D.L. Unique lipid of primate spermatozoa: demosterol and DHA **Journal Lipid Research**, Bethesda, v. 34, n. 3, p. 491-499, Mar. 1993.

MADHUSUDHAN, B. Potential benefits of flaxseed in health and disease - a perspective. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v.74, n.2, p.67-72, 2009.

MAEDA, T.; TERADA, T.; TSUTSUMI, Y. Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing. **British Poultry Science**, v.27, p.695-702, 1986.

MAHAPATRA, P.S.; MOHANTY, B.P.; BISOI, P.C.; MISHRA, S.C.; NAYAK, N.R.; MISHRA, M.S. Effect of storage on the physical and biochemical parameters of broiler semen. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 29[2], p.146-150, 1994.

McDOWELL, L.R. Essential fatty acids. In: **Vitamins in animal nutrition**. London: Academic Press, 1989. p. 400-421

MORETTO, E.; FEET, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria, 1998.

MORI, M.; MASUDA, N. Proteins of the vitelline membrane of quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. **Poultry Science**, v.72, p.1566-1572, 1993.

MORRIS, D.H. **Flax – a health and nutrition primer**. 4th ed. Winnipeg, MB: Flax Council of Canada, 2007. 106 p.

MORRIS, D.H.; VAISEY-GENSER, M. Flaxseed. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, v.10, n.2, p.2525-2531, 2003.

MURAKAMI, A.E.; GARCIA, E.R.M.; MARTINS, E.N.; MOREIRA, I.; SCAPINELLO, C.; OLIVEIRA, A.F.G. Efeito da inclusão de óleo de linhaça nas rações sobre o desempenho e os parâmetros ósseos de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1256-1264, 2009.

NISSEN, H.P.; KREYSEL, H.W.; SCHIRREN, C. Composition of lipid-bound fatty acids of human semen in relation to its fertility values. **Andrologia**, Berlin, v. 13, n. 4, p. 444-451, 1981.

OOMAH B.D.; MAZZA, G. Flaxseed products for disease prevention. In: MAZZA, G. (Eds.). **Functional foods: biochemical & processing aspects**. Lancaster, PA: Technomic Publishing, 1998. p.91-138.

PARKHURST, C.R.; MOUNTNEY, G.J. **Poultry meat and egg production**. New York: An Avi Book, 1988. 294 p.

RAVIE, O.; LAKE, P.E. The phospholipids bound fatty acid of fowl and turkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 189-192, 1985.

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

RODENAS C.E.O., MURGAS L.D.S., MACIEL M.P., FERRAZ J.M., RIBEIRO M.C., BERTECHINI A.G., FREITAS R.T.F., FIALHO E.T. Características seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 160-167, 2005.

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

SANTOS, T.C.; MURAKAMI, A.E.; FERNANDES, J.I.M.; CARVALHO, L.S. Efeito da vitamina E em dietas suplementadas com óleo sobre parâmetros de fertilidade de galos reprodutores. **Anais do Prêmio Lamas**. 2009.

SINGH, H. Optimizing delivery of genetic merit in subtropical climates through advanced reproductive technologies. **Poultry Science**, v.78, p.453-458, 1999.

STEPINSKA, U.; BAKST, M.R. Fertilization. In: Jamieson BGM (ed.) **Reproductive Biology and Phylogeny of Birds**. Science Publishers, 2007. p.553-587.

SURAI, P.F.; BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; CHALAH, T.; BRILLARD, J.P. WISHART, G.J.; CEROLINI, S.; SPARKS, H.N.C. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 120, n. 3, p. 527-533, July 1998.

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

SURAI, P.F. **Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction**. p.391-454, 2002.

SWENSON, J.M. **DUKES: Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. 697 p.

TAKEUCHI, Y.; NISHIMURA, K.; AOKI, N.; ADACHI, T.; SATO, C.; KITAJIMA, K.; MATSUDA, T. A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian Zona pellucida. Its first identification, cDNA cloning and granulosa cell-specific expression. **European Journal of Biochemistry**, v.260, p.736-742, 1999.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde, 2006. 151 p.

TSELUTIN, K.; NARUBINA, L.; MAVRODINA, T.; TUR, B. Cryopreservation of poultry semen. **British Poultry Science**, v.36, p.805-811, 1995.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v.78, p.586-590, 1999.

TURATTI, J.M. A importância dos ovos numa dieta saudável. **Revista Óleos e Grãos**. v.9, p.22-24, 2001.

USDA. United State Department of Agriculture. **Nutrient database for standard reference**. Release 14. Washington, 2001.

VIEIRA, M.M. O enriquecimento da carne de aves com ácidos graxos poli-insaturados n-3. Especialização – Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2006.

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

WILSON, H.R.; PIESCO, N.P.; MILLER, E.R.; NESBETH, W.G. Prediction of the fertility potential of broiler breeder males. **World's Poultry Science Journal**, v.35, p.95-118, 1979.

WISHART, G.J. Maintenance of ATP concentration in and of fertilizing ability of fowl and turkey spermatozoa in vitro. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 66, n. 2, p. 457-462, 1982.

WISHART, G.J. New approaches to evaluating male and female fertility. In: Bakst, M.R., Wishart, G.J. Eds., Proc. **1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry**. Poultry Science Association, Savoy, IL, p.207–223, 1995.

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

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