



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Wilson Duarte Ferrari Junior

**ADIÇÃO DE LIPÍDIOS NA RAÇÃO E NO SÊMEN SOBRE O
CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E QUALIDADE
ESPERMÁTICA DE CAPRINOS**

PETROLINA – PE
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Wilson Duarte Ferrari Junior

**ADIÇÃO DE LIPÍDIOS NA RAÇÃO E NO SÊMEN SOBRE O
CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E QUALIDADE
ESPERMÁTICA DE CAPRINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Andrade Moraes

PETROLINA – PE
2013

F375a Ferrari Junior, Wilson Duarte
Adição de lipídios na ração e no sêmen sobre o consumo,
digestibilidade e qualidade espermática de caprinos / Wilson Duarte
Ferrari Junior. – Petrolina, 2013.

110f.; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias,
Petrolina, 2013.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Andrade Moraes.

Referências.

1. Colesterol . 2. Digestibilidade . 3. Viabilidade espermática e
teste de ligação. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São
Francisco.

CDD 636.3900981

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Wilson Duarte Ferrari Junior

**ADIÇÃO DE LIPÍDIOS NA RAÇÃO E NO SÊMEN SOBRE O
CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E QUALIDADE
ESPERMÁTICA DE CAPRINOS**



Profª Drª Elenice Andrade Moraes
Universidade Federal do Vale do São Francisco



Profª Drª Nadja Gomes Alves
Universidade Federal de Lavras



Profª Drª Sandra Mari Yamamoto
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Aos meus pais, Wilson e Gildete pelo
incentivo, confiança e amor a mim
prestados.

Aos meus irmãos, Ítalo e Iris, pelo
carinho e amizade.

À minha mulher Vicilene e filha Maria
Eduarda por me apoiar e acompanhar
nessa jornada

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, pelo uso de suas instalações e por proporcionar meu ingresso no curso de pós-graduação.

Ao Curso de Pós Graduação em Ciência animal e a todos os professores, por contribuírem para minha capacitação profissional.

À FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação e financiamento do projeto.

Aos meus pais Wilson e Gildete, pelo incentivo e apoio, pela força, pelas palavras sempre dadas nos momentos necessários e por proporcionarem uma base familiar sólida, fundamental para a conquista não só desta etapa, mas também das que passaram e das que ainda virão. Seu amor e suas lições serão responsáveis por todas minhas vitórias.

A meus irmãos Ítalo e Iris pelo apoio em todas as minhas conquistas.

A minha esposa Vicilene uma mulher maravilhosa, que tem sido minha namorada, amante e companheira de todas as horas, e por me fazer muito feliz, Principalmente por me presentear com nossa filha Maria Eduarda, minha lindinha e por quem sempre lutarei, minha razão de viver. Por você tenho grande admiração, carinho, respeito e paixão. Muito obrigado minha “Linda” que depois dos meus pais é a grande responsável pelas minhas conquistas. Sua dedicação, compreensão e amor me deram suporte para alcançar meus objetivos.

Aos companheiros da pós-graduação: Daniel, Rodrigo, Vanessa, Daniele, Welligton, Gledson.

Aos meus grandes amigos Wasley Matos, Rafael Torres, Patricia Rosa que sempre me apoiaram e ajudaram a chegar mais longe e atingir meus objetivos.

A Professora Dra. Elenice Andrade Moraes, pelo acolhimento e pelos preciosos ensinamentos e orientação imprescindíveis para minha formação profissional, os quais tornaram possível a execução desta pesquisa e a sua valiosa amizade que, com seus conselhos, possibilitou meu crescimento pessoal.

Ao Professor. Dr. Mário Queiroz pela co-orientação, confiança, pela força em todos os momentos que precisei e pela amizade.

A Gonçalo (*in memoriam*), uma grande pessoa que passou a ser um grande amigo, em que sempre podia contar, mas infelizmente não está mais entre nós para compartilhar estes momentos felizes que estamos vivendo, mas tenho certeza, onde ele estiver está feliz por mim. Um grande abraço meu caro amigo.

Ao meu colega, Rafael Torres (Mano Brown) pelos conselhos e correções de parte da dissertação.

Aos meus familiares que com suas orações e palavras de apoio ajudaram-me toda minha vida acadêmica.

Aos colegas de equipe Wasley Mattos, Bruno Gonçalves, Laícia Rios, Carina, pelo auxílio, dedicação e amizade, que proporcionaram momentos bons e descontraídos durante a condução do experimento.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para essa conquista.

FERRARI JUNIOR, W. D. **Addition of lipids in the diet and semen on intake, digestibility and Goat semen quality.** 2013. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2013. Orientadora: Elenice Andrade Moraes

RESUMO

Objetivou avaliar o efeito da inclusão de lipídios na ração e no sêmen de caprinos sobre os parâmetros produtivos e reprodutivos. Dois estudos foram desenvolvidos. O primeiro estudo objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes fontes lipídicas na ração de caprinos sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes e o comportamento ingestivo. Foram utilizados 16 caprinos machos sem padrão racial definido, não castrados, que foram confinados e submetidos à rações isoprotéicas. Os tratamentos consistiram de quatro rações: controle (C) e demais suplementadas com torta de licuri (TL), óleo de soja residual (OSR) e gordura inerte (GI – Megalac E[®]). O período experimental teve duração de 84 dias, dividido em três subperíodos de 28 dias de duração, para avaliação do comportamento ingestivo. Avaliação da digestibilidade foi realizada entre o 69^o e 76^o dia, do período experimental. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos ao acaso com quatro repetições. Os consumos de matéria seca (CMS), proteína bruta (CPB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CNF), extrato etéreo (CEE) e nutrientes digestíveis totais (CNDT) foram semelhantes entre as rações ($P > 0,05$). Os coeficientes de digestibilidade de matéria seca (DMS), fibra em detergente neutro (DFDN) e extrato etéreo (DEE) foram semelhantes entre as rações ($P > 0,05$). A utilização da torta de licuri (TL), do óleo de soja residual (OSR) e da gordura inerte (GI) como fontes lipídicas em rações para caprinos não influenciaram o consumo, a digestibilidade dos nutrientes e o comportamento ingestivo. Entretanto, a inclusão da torta de licuri, interferiu sobre os parâmetros do comportamento, proporcionando um maior tempo de ruminação. No segundo estudo, objetivou-se avaliar a inclusão de fonte lipídica inerte na ração e no sêmen fresco de caprinos sobre o potencial fertilizante dos espermatozoides descongelados. Foram utilizados $n=40$ ejaculados de 08 animais. Os animais foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2×4 , com duas fontes de energia (milho e gordura inerte) e quatro níveis de adição de colesterol carregado pela ciclodextrina (CCC) ao sêmen de cada animal (0; 0,5; 0,75 e 1,5 mg CCC/120 milhões de espermatozoides/mL). Após o sêmen ser tratado, os espermatozoides ficaram incubados por 15 minutos a 25°C para permitir a incorporação do colesterol. Após este período, amostras de cada tratamento foram usadas para determinar a motilidade utilizando o sistema de análise computadorizado (CASA - Minitub[®]). Os espermatozoides foram diluídos na proporção de 1:1 (v:v) em Tris com 2% gema de ovo, e resfriado para 5 °C. Após resfriamento, foram envasados em palhetas de 0,5 mL, congelados em vapor de nitrogênio líquido por 7 minutos e imergidos no nitrogênio líquido para armazenagem. Amostras de sêmen foram descongeladas para determinar a motilidade total e progressiva, viabilidade espermática e habilidade dos espermatozoides se ligarem a membrana perivitelínica da gema de ovo (MPV). Não houve interação entre os tipos de rações experimentais (controle e gordura inerte) e das concentrações de colesterol no sêmen antes da criopreservação ($P > 0,05$). As amostras de sêmen dos animais que receberam a

ração controle não diferiram quanto a motilidade total, progressiva, viabilidade espermática e do teste de ligação dos tratados na ração com gordura inerte ($P>0,05$). Em função das concentrações CCC, as médias da motilidade total, progressiva, viabilidade espermática e do teste de ligação não diferiram entre os sêmen tratados e o grupo controle ($P>0,05$). Em todos os estudos, os parâmetros avaliados não apresentaram diferenças ($P>0,05$). Com isto, conclui-se que nas condições em que o experimento foi realizado, os suplementos adicionados na ração não influenciaram o consumo, digestibilidade e comportamento ingestivo e não promoveu melhoria na qualidade do sêmen pós descongelamento.

Palavras-chave: colesterol, consumo, criopreservação, digestibilidade, viabilidade espermática e teste de ligação.

FERRARI JUNIOR, W. D. **Evaluation of the addition of raçõory lipid and goat semen on the productive and reproductive parameters.** 2013. 110f. Dissertation (MSc in Animal Science), Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, 2013. Advisor: Elenice Andrade Moraes

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of inclusion of fat in the diet and in the semen of goats on the productive and reproductive parameters. Two studies were developed. The first study aimed to evaluate the effect of inclusion of different lipid sources in the diet of goats on intake, digestibility of nutrients and ingestive behavior. We used 16 male goats without defined breed, integers, which were confined and subjected to isoproteic. The treatments consisted of four rations, one control (C), and the others, added one of the supplements tested, pie licuri (TL), residual soybean oil (RSO) and fat (GI - Megalac[®]). The experimental period lasted 84 days, divided into three sub-periods of 28 days duration, to evaluate the ingestive behavior. Evaluation of digestibility was held between the 69th and 76th day of the trial period. The experimental design used was a randomized complete block design with four replications. The dry matter intake (DMI), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), non-fiber carbohydrates (NFC), ether extract (EEC) and total digestible nutrients (CNDT) were similar between diets ($P > 0.05$). The digestibility of dry matter (DMD), neutral detergent fiber (NDFD) and ether extract (DEE) were similar between diets ($P > 0.05$). The use of pie licuri (TL) of residual soybean oil (RSO) and fat (GI) as lipid sources in diets for goats did not affect intake, nutrient digestibility and ingestive behavior. However, the inclusion of pie licuri interfered on the parameters of behavior, providing a longer rumination. In the second study aimed to evaluate the inclusion of protected lipid source in diet and fresh semen of goats on the thawed sperm fertilizing potential. $N = 40$ were used ejaculates of 08 animals. The animals were distributed in a completely randomized design in a factorial 2×4 with two energy sources (corn and protected fat) and four levels of cholesterol carried by addition of cyclodextrin (CCC) to semen (0, 0.5, 0.75 and 1.5 mg CCC/120 million sperm / mL). After being treated semen, sperm cells were incubated for 15 minutes at 25°C to allow the incorporation of cholesterol. After this period, samples of each treatment were used to determine motility using the computerized analysis system (CASA-Minitub[®]). The spermatozoa were diluted 1:1 (v: v) in Tris with 2% egg yolk, and cooled to 5°C . After cooling, were loaded into 0.5 mL straws, frozen in liquid nitrogen vapor for 7 minutes and immersed in liquid nitrogen for storage. Semen samples were thawed to determine the total and progressive motility, sperm viability and ability of sperm to bind to membrane perivitelinica egg yolk (MPV). There was no interaction between the types of experimental diets (control and protected fat) and cholesterol concentrations in semen before cryopreservation ($P > 0.05$). Semen samples of the control group did not differ in total motility, progressive sperm viability and the connection test of the diet treated with protected fat ($P > 0.05$). Depending on the concentrations CCC, mean total motility, progressive sperm viability and connection test did not differ between semen treated and control group ($P > 0.05$). In all studies, the parameters evaluated showed no differences ($P > 0.05$). With this, we conclude that under the conditions in which the experiment was conducted, the supplements added to the diet did not affect feed intake, digestibility and ingestive behavior and not promoted improvement in semen quality after thawing.

Keywords: cholesterol, feed intake, criopreservation, digestibility, sperm viability and bind ligation

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1:** Percentage composition and chemistry of diets with different fat sources61
- Table 2:** Nutrient intake by confined goats fed different lipid sources in feed.....63
- Table 3:** Nutrient digestibility of diets containing different lipid sources provided for goats confined.....64
- Table 4:** Feeding behavior in 24 hours of confined goats fed different lipid sources in feed.....66
- Table 5:** Feeding behavior of goats per shift confined receiving different lipid sources in feed.....68

ARTIGO 2

- Table 1:** Percentage and chemical composition of experimental diets.....85
- Table 2:** Total progressive motility and viability of sperm, goats treated or not with inert fat in the ration, subjected to different concentrations of cholesterol in semen before cryopreservation.....86
- Table 3:** Number of sperm, of goats treated or not with inert fat in the ration, subjected to different concentrations of cholesterol, in the fresh semen before cryopreservation, linked to MPV.....87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CASA	Análise computadorizada do sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CCC	Colesterol carregado pela ciclodextrina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
g	Grama
Hz	Hertz
L	Litros
µL	Microlitro
µm	Micrômetros
µg	Microgramas
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitro
NRC	National Research Council
PNA	Aglutinina <i>Arachis hypogea</i>
PSA	Aglutinina <i>Pisum sativum</i>
Sptzs	Espermatozoides
UI	Unidades internacionais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Lipídios na nutrição de ruminantes.....	17
2.1.1 <i>Licuri (Syagrus Coronata)</i>	20
2.1.2 Óleo de Soja Residual.....	21
2.1.3 Gordura inerte.....	23
2.2 Consumo e digestibilidade de nutrientes.....	24
2.3 Comportamento ingestivo.....	25
2.4 Influência da suplementação lipídica sobre a reprodução	27
2.5 Célula espermática.....	29
2.5.1 Estrutura do espermatozóide.....	29
2.5.2 Membrana plasmática.....	31
2.6 Particularidades do sêmen caprino.....	32
2.7 Criopreservação.....	34
2.7.1 Aspectos básicos da criopreservação.....	34
2.7.2 Colesterol e Ciclodextrina	36
2.7.3 Ciclodextrina e Colesterol vs Criopreservação.....	37
2.8 Zona de ligação.....	38
2.9 Avaliação espermática.....	40
2.9.1 Motilidade espermática.....	40
2.9.2 Integridade da membrana e viabilidade espermática.....	41
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
4. ARTIGO CIENTIFICO.....	58
4.1 Artigo 1: Intake, digestibility, and feeding behavior of goats fed with diets containing different lipid sources.....	58
Abstract.....	58
Introduction.....	59
Methods and Materials.....	60
Results and Discussion.....	63
Conclusions.....	69
References.....	69

4.2 Artigo 2: The effect of lipid inclusion in the diet and in the goat's fresh semen about a.....	72
Abstract.....	72
Introduction.....	73
Methods and Materials.....	74
Results.....	79
Discussion.....	79
Conclusions.....	83
References.....	83
5. CONCLUSÃO GERAL	88
6. ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

O aumento da densidade energética da ração obtida pela suplementação com lipídio é uma estratégia nutricional que pode ser utilizada no confinamento, com vantagens de não apresentar os inconvenientes distúrbios metabólicos digestivos causados por rações com alta proporção em grãos, ricas em amido. Além disso, a eficiência dos animais que depositam grande quantidade de gordura em seus produtos, e aumenta a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis e o fornecimento de ácidos graxos essenciais importantes para membranas de tecidos (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

Entretanto, o uso de fontes lipídicas, em rações para ruminantes ainda é motivo de muitas contradições, haja vista o conhecimento ainda restrito dos níveis e das formas de inclusão (protegidas ou não) e de seus efeitos no consumo. Além disso, fatores com ação potencial incluem a aceitabilidade das rações, o efeito sobre a fermentação ruminal, a liberação de hormônios intestinais e a oxidação das gorduras pelo fígado (ALLEN, 2000).

Dessa forma, o cultivo e o uso planejado de opções forrageiras, nativas ou introduzidas, para produção de feno ou silagem, somadas a outras opções como utilização de resíduos agroindustriais e suplementos lipídicos (óleos e gorduras vegetais), como fontes energéticas, podem aumentar a chance de sucesso do sistema de produção da caprinocultura do semiárido nordestino.

Estudos como avaliações de consumo, digestibilidade e comportamento ingestivo são de grande importância pois possibilitam ajustar o manejo alimentar de diferentes categorias, proporcionando um melhor desempenho produtivo (YAMAMOTO et al., 2005; TAVARES et al., 2005; SILVA et al., 2007). Um dos motivos para promover o desempenho produtivo desses animais é o crescimento acentuado da demanda por carne dessa espécie, em decorrência da sua composição química (MALAN, 2000).

O uso de biotécnicas como inseminação artificial (IA) pode melhorar o potencial genético desses animais para atender, a médio e longo prazo, as demandas dos mercados com produtos de qualidade. Entretanto, na espécie caprina a adoção da IA principalmente no Brasil ainda está em estado incipiente, tal fato se deve as baixas taxas de gestação obtidas quando se faz uso desta biotecnologia. Inúmeros são os fatores responsáveis por estes baixos índices de fertilidade, dentre estes está

a falta de domínio do processo de criopreservação do sêmen caprino (BARBOSA, 1999).

A criopreservação promove a desestabilização da membrana espermática (STEPONKUS et al., 1983), levando à formação de gelo intracelular, tendo como consequência a morte da célula (MAZUR, 1984). Esta desestabilização ocorre quando a membrana passa pela fase de transição, da fase fluída para a fase gel, em função da diminuição da temperatura. E isto pode ser atenuado com a adição de lipídios na membrana espermática, antes dela ser resfriada e congelada (WATSON, 1981; HAMMERSTEDT et al., 1990; HE et al., 2001). A adição de colesterol em lipossomos reduz o ponto de congelamento da fase lipídica da membrana lipossomal, e se o colesterol for adicionado suficientemente, a fase de transição é eliminada, contribuindo para uma melhor qualidade do sêmen criopreservado (LADBROOKE et al., 1968).

Porém, a influência do nível de lipídeo na ração sobre as funções reprodutivas ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que além de aumentar a densidade energética da ração, também fornece substrato, na forma de acetil-CoA, para síntese de hormônios esteróides (SANTOS E SÁ FILHO, 2006). Devido a esse efeito é crescente o número de pesquisas que avaliam o uso de diferentes fontes de ácidos graxos, principalmente os insaturados sobre parâmetros reprodutivos de ruminantes.

Atualmente existem vários estudos que comprovam a influência da inclusão lipídica sobre a qualidade espermática em diferentes espécies, seja com inclusão na ração dos animais, como já descritas para galos (ZANINE ET AL., 2003; RODENAS et al. 2005), coelhos (ANDREAZZI et al., 2004), e suínos (OLIVEIRA et al., 2006), ou com adição no ejaculado, de asininos (RATES, 2011) bovinos (PURDY & GRAHAM, 2004; AMORIM et al., 2009; MORAES et al., 2010), equinos (MOORE et al., 2005; SIPIZZIRI et al., 2010), e carneiros (MOCÈ et al., 2010). Entretanto são raros os trabalhos que tenham avaliado tais efeitos na espermatogênese de ruminantes, especificamente em caprinos.

Objetivou-se avaliar a adição de lipídios na ração e no sêmen sobre o consumo, digestibilidade e qualidade espermática de caprinos.

2. Revisão De Literatura

2.1 Lipídios na nutrição de ruminantes

Dentre os inúmeros fatores que afetam o desempenho reprodutivo de ruminantes, a nutrição é talvez o que tenha maior impacto, pois animais desnutridos apresentam insuficiente desempenho reprodutivo.

A ração de ruminantes alimentados basicamente com forrageiras tem baixo teor de lipídios (entre 1-4% da matéria seca – MS), representados, principalmente, pelos galactolipídios e triglicerídeos, sendo que níveis mais altos podem ser obtidos pela adição de gorduras ou de sementes oleaginosas na ração, tendo-se o cuidado de não ultrapassar 6-7% da MS, pois acima destes valores ocorre alteração na fermentação microbiana, devido principalmente a dois principais motivos: o efeito tóxico direto dos ácidos graxos sobre microorganismos do rúmen, fato que explica as gorduras saturadas serem menos problemáticas que as insaturadas; e o efeito físico pelo recobrimento das partículas alimentares com gordura, com conseqüente redução do contato destas com agentes de digestão (PALMQUIST & JENKINS, 1980; MEDEIROS, 2007; HESS, 2008). Mais de 70% dos ácidos graxos presentes nos galactolipídios e triglicerídeos das sementes são insaturados (principalmente oleico, linoleico e linolênico), e uma fração deles é incorporada aos lipídios bacterianos, enquanto uma alta proporção dos ácidos graxos insaturados é biohidrogenada e flui do rúmen para o abomaso como ácidos graxos saturados livres, sem ser utilizados pela microflora ruminal (HESS, 2008).

Os lipídios são constituídos de grande proporção de ácidos graxos, os quais possuem 2,25 vezes mais energia que os carboidratos, e devido a isso, são considerados fontes energéticas com alta concentração de energia prontamente disponível (SILVA et al., 2007).

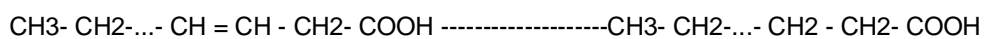
Existem várias fontes de lipídios que podem ser utilizadas na ração de ruminantes, entre elas, a de sementes oleaginosas, como a obtida da torta do Licuri (BORJA et al., 2010), a proveniente de óleos vegetais, tal como o óleo de soja (VARGAS et al., 2002; SILVA et al., 2007), e a gordura inerte – Megalac E® (SILVA et al., 2007).

Os lipídios ou gorduras são compostos de ácidos graxos que possuem cadeia longa de hidrocarbonetos e estrutura terminal com grupo carboxila, sendo que tais substâncias podem ser encontradas em grandes quantidades em sistemas biológicos, raramente na forma livre, sendo tipicamente encontradas ligadas a molécula de glicerol ou outras estruturas que se ligam ao carbono terminal (NELSON & COX, 2002).

A maioria dos ácidos graxos encontrados na natureza tem número de carbonos que comumente varia de 14 a 24, sendo classificados como saturados (todos os carbonos com ligações simples), ou insaturados (com uma ou mais ligações duplas entre átomos de carbono) sendo o estado de saturação ou não-saturação uma importante característica química e nutricional. Se os ácidos graxos têm uma única ligação dupla, este pode ser classificado como monoinsaturado, e se este tem uma ou mais ligações duplas, é classificado como poliinsaturado (NELSON & COX, 2002).

A microbiota ruminal é capaz de hidrolisar os alimentos compostos de lipídios, e transformá-los em ácidos graxos, glicerol e outros compostos. O conteúdo de óleo das forragens e de vários grãos, embora seja usualmente baixo, possui altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados, em particular os ácidos linolênicos C18: 1 e linoléico C18:2, os quais são ácidos graxos essenciais na ração, porque não podem ser sintetizados pelos animais e seres humanos (MATTOS et al., 2000).

O glicerol, produzido pela hidrólise, é aproveitado pelas bactérias para a produção de ácidos graxos voláteis (AGV's). Os ácidos graxos, após serem hidrolisados, são submetidos ao processo de isomerização. A isomerização consiste em transformar locais e conformações geométricas de algumas ligações cis para trans. Após este processo, a microbiota ruminal desenvolveu uma estratégia para reduzir a insaturação dos ácidos graxos insaturados, que são os mais tóxicos, com a colocação de hidrogênios nestas duplas ligações, transformando-as em ligações simples ou saturadas, e também permitindo um aumento de sua absorção pelas células do intestino delgado (BARROS, 2001). Este processo é chamado de biohidrogenação:



Ácido graxo insaturado

Ácido graxo saturado

O ácido linoléico conjugado (CLA) é formado no rúmen como um primeiro intermediário da biohidrogenação do ácido linoléico pela enzima ácido linoléico isomerase, proveniente da bactéria anaeróbica ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*, que isomeriza o ácido linoléico preferencialmente para as formas cis-9 e trans-11. O CLA também pode ser formado endogenamente, através da dessaturação do ácido graxo C18:1 trans 11, por uma enzima presente na glândula mamária e no tecido adiposo, a delta-9-dessaturase (DE CARVALHO, 2009).

A suplementação lipídica melhora a eficiência alimentar, uma vez que há maior energia metabolizável nos lipídios em comparação aos carboidratos ou proteínas (HUANG et al., 2009). A inclusão de gordura na ração de ruminantes, como forma de permitir um alto consumo de energia, nem sempre é um método eficaz, uma vez que altos níveis de gordura podem reduzir a digestão da matéria seca no rúmen, provocando, conseqüentemente, uma menor disponibilidade de energia (HUANG et al., 2009)

Suplementos lipídicos denominados “gorduras inertes”, têm sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a concentração energética das rações, com mínima interferência na fermentação ruminal, tendo como principal vantagem fornecimento de ácidos graxos essenciais que iriam passar direto para o abomaso sem que ocorresse liberação de ácidos graxos no rúmen, promovendo assim um melhor aproveitamento dessa fonte energética pelo organismo animal (SILVA et al., 2007).

As sementes oleaginosas utilizadas como forma de suplementação lipídica, apresentam uma lenta liberação do óleo do seu interior, dessa forma sua presença no ambiente ruminal não causaria transtornos à flora microbiana, mas promoveria completa hidrogenação dos seus ácidos graxos, motivo pelo qual alguns autores têm considerado essas sementes suplementos parcialmente protegidos (SILVA et al., 2007).

A utilização de óleos vegetais na alimentação de ruminantes pouco tem sido relatada, sendo utilizada para complementar o fornecimento energético das rações para os animais. A suplementação com este material em relação a sementes de oleaginosas apresentaria maiores efeitos inibitórios sobre a microbiota ruminal, visto que o envoltório contido na semente serviria de proteção para a gordura contida nele, promovendo assim uma lenta liberação de seus lipídios (SILVA et al., 2007). Esses óleos quando no ambiente ruminal podem representar uma barreira física

para a degradação da partícula de alimento por formar um filme ao redor da mesma, impedindo a perfeita aderência das bactérias e diminuindo a capacidade de degradação (METZ, 2009).

Um dos grandes motivos para a inclusão de fontes de lipídios na alimentação de ruminantes é porque sua inclusão na ração frequentemente melhora a eficiência da conversão de alimentos, ou seja, para uma ração com adição de lipídios pode ser necessário menor consumo de matéria seca para cada quilo de ganho. As razões para essa melhoria seriam basicamente duas: economia no anabolismo, pois os ácidos graxos pré-formados dispensam "síntese de um novo" a partir do acetato, o que evita parte do incremento calórico associado a esta rota metabólica, ou seja, aproveita-se o ácido graxo pronto sem ter a necessidade de produzi-lo; e a segunda seria devido à maior eficiência no catabolismo, pois a geração de energia por oxidação de ácidos graxos de cadeia longa é cerca de 10% mais eficiente que a oxidação de acetato, ou seja, há menos de perda de energia quando é usada a gordura em relação a uma das principais fontes de energia dos ruminantes (MEDEIROS, 2007).

2.1.1 Licuri (*Syagrus Coronata*)

O licuri (*Syagrus coronata*), também conhecido com ouricuri, é uma palmeira típica do semiárido nordestino que apresenta boa tolerância a seca, e por isso pode representar uma alternativa na alimentação de ruminantes da região Nordeste do Brasil. Esta planta pode apresentar de 6 até 10 metros de altura, suas folhas de 2 a 3 metros de comprimento, e essas são distribuídas em espiral ao longo do fuste. Em relação às flores são pequenas e de coloração amarela, estando dispostas em cachos. Os cachos do licuri têm em média 1.300 frutos e estes apresentam comprimento e diâmetro médio de 2 cm e 1,4 cm, respectivamente. Os seus frutos têm a coloração variando entre amarelo e vermelho, estando esta variação geralmente associada à presença de carotenóides, compostos com atividade pró-vitamínica A (CREPALDI et al., 2001).

O licuri, na região de caatinga, é capaz de suportar secas prolongadas, florescendo e frutificando por um longo período do ano. Apesar disso sua

importância, pouco se conhece quanto ao seu valor nutricional. Avaliando sua composição nutricional Crepaldi et al.,(2001), relataram que o fruto é altamente calórico, com destaque ao teor de lipídios (49,2%) e proteínas (11,5%) da amêndoa e o teor de carboidratos totais (13,2%) da polpa dos frutos. Além disso, reportaram que polpa de licuri apresenta como principal vitamina o β -caroteno.

O óleo, obtido por meio da prensagem dos frutos, é utilizado principalmente na produção de cosméticos e sabões, e requer mais estudos acerca de seu potencial nutricional para animais. Além disso, visando maximizar sua utilização para alimentação animal, surge como opção à utilização da torta, co-produto originado do resíduo obtido da extração do óleo.

A utilização diferentes co-produtos do processamento de oleaginosas (torta de licurí, torta de mamona e farelo de girassol) na ração de ovinos, não influenciaram as características quantitativas e morfométricas da carcaça (MANERA et al. 2009),.

Os produtos ou subprodutos do licuri são poucos estudados como suplemento na ração de ruminantes, necessitando de pesquisas que viabilizem sua utilização na alimentação animal.

2.1.2 Óleo De Soja Residual

Atualmente diversas fontes de lipídios vêm sendo utilizada na alimentação de ruminantes, entretanto estas apresentam características específicas que conferem diferentes efeitos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de nutrientes, consumo de matéria seca (YAMAMOTO et al., 2005; SILVA et al., 2007; BORJA et al., 2010).

O grau de saturação é uma das principais características relacionada ao tipo de gordura suplementada que pode interferir diretamente na fermentação ruminal, podendo afetar o aproveitamento de nutrientes. Os produtos a base de soja possuem grande percentual de ácidos graxos insaturados, principalmente o óleo de soja, que tem em média, com 75% de insaturação. Assim, óleos vegetais, ricos em ácidos graxos insaturados, apresentam como efeitos desejáveis, a inibição da produção de metano, a redução da concentração de amônia ruminal, além do

aumento na eficiência da síntese microbiana e o aumento de CLA (PALMQUIST & MATOS, 2006).

A utilização de óleo de soja como fonte de lipídios para ruminantes, pode acarretar efeitos negativos ao ambiente ruminal, como a diminuição da digestibilidade das frações fibrosas da ração e redução na relação acetato:propionato, com consequente diminuição da gordura do leite (VARGAS et al., 2002).

O óleo proveniente da soja é um material utilizado para a produção de biodiesel, além de ser empregado também na indústria alimentícia humana, devido a isso sua utilização na alimentação animal pode se torna um tanto desfavorável. Dessa forma, a utilização do óleo de soja residual, provenientes de frituras, pode ser uma opção, pois além de aumentar a densidade energética da ração, contribui para redução do custo com o emprego de fontes energéticas na ração, já que seu custo é mínimo por ser um resíduo na maioria das vezes desprezado. Além disso, contribui para a redução de impactos ambientais, ocasionados pelo mau destino dado após seu uso em processos de fritura.

Os óleos vegetais poliinsaturados quando passam pelo processo de fritura, sob a ação do oxigênio atmosférico, sofre uma aceleração dos mecanismos de deterioração, pela ação da hidrólise, oxidação e termo-oxidação. Esses mecanismos atuam principalmente sobre suas ligações duplas, transformando-os em uma série de produtos secundários (REDA & CARNEIRO, 2007). De Carvalho (2009) relatou que o ganho de peso diário, peso ao abate e os parâmetros de carcaça, não foram influenciados pela inclusão de óleo soja residual na ração de cabritos. A utilização de óleo de soja residual promove a redução dos custos de produção uma vez que diminui o consumo de alimento pelos animais submetidos a essa ração, sem que se modifiquem suas características produtivas.

Portanto, o óleo de soja residual possui alto potencial para aumentar a ingestão de energia em ruminantes, além de apresentar baixo custo de obtenção, sendo necessárias pesquisas que verifiquem seus efeitos sobre o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais.

2.1.3 Gordura inerte

Suplementos lipídicos denominados “gorduras inertes”, têm sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a concentração energética das rações, com mínima interferência na fermentação ruminal.

A gordura inerte é um suplemento nutricional obtido a partir de ácidos graxos de cadeia longa, que podem ser fornecidos na forma de sais de cálcio, para reduzir a quantidade dos ácidos graxos que sofrem biohidrogenação no rúmen, o que torna os ácidos graxos essenciais quimicamente inúteis (CHURCH & DWIGHT, 2002). A gordura inerte é um produto altamente estável em água e temperatura, sendo digerido no organismo animal em meio ácido. No rúmen, devido ao meio tender a ser neutro, faz com que ele permaneça inalterado. Ao chegar ao abomaso, o meio torna-se extremamente ácido (pH = 2-3) ocorrendo o desdobramento da gordura, aumentando a densidade energética da ração, com a liberação para o intestino dos ácidos graxos e íons de cálcio, que serão absorvidos e levados pela corrente sanguínea (CHURCH & DWIGHT, 2002).

Um suplemento comercial de ácidos graxos de cadeia longa (gordura inerte; Megalac®), é capaz de suprir todas as necessidades energéticas não atendidas pelo restante da ração, tendo, portanto, influência positiva na condição corporal do animal, na taxa de fertilidade e na produção de leite (GHOREISHI et al., 2007).

Segundo Franco (2007) dependendo do fabricante, os sabões de cálcio ou gordura inerte apresentam aproximadamente 6,52 Mcal/kg de energia líquida, o que corresponde a um valor três vezes maior que a energia do milho.

As fontes mais comuns, comercialmente disponíveis, de gordura inerte, incluem ácidos graxos hidrogenados e sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, o que disponibiliza ácidos graxos poliinsaturados para o intestino delgado (SARTORI & MOLLO, 2007).

Emediato et al. (2009) e Ghoreishi et al. (2007), ao trabalharem com inclusão de gordura inerte na alimentação de ovinos, durante a fase de lactação, observaram aumento na produção de leite, e no desempenho animal. Ghoreishi et al. (2007), em pesquisa com ovinos, constataram que a inclusão de gordura inerte na ração, não influenciou na quantidade e tamanho dos folículos, mais proporcionou aumento nas concentrações séricas de progesterona entre os 10-14^o do ciclo.

Contudo a utilização da gordura inerte na alimentação animal, e sua possível influência no desempenho reprodutivo de machos, necessitam de mais estudos que comprovem o mecanismo dessa influência, e que viabilizem sua utilização.

2.2 Consumo e digestibilidade de nutrientes

No fornecimento de qualquer alimento ou ingrediente na alimentação animal, é importante conhecer o consumo, pois este é um dos componentes que exerce papel de maior importância na nutrição animal, uma vez que determina o nível de nutrientes ingeridos e, conseqüentemente, o seu desempenho (BERCHIELLI et al., 2006).

O consumo é controlado por fatores físicos e fisiológicos, o fator físico refere-se à distensão física do rúmen-retículo e o fisiológico é regulado pelo balanço energético. Além disso, o consumo pode variar em função do animal, pela variação de peso, estado fisiológico ou nível de produção; em função do alimento, pela capacidade de enchimento, densidade energética ou nível de FDN; das condições de alimentação, pela disponibilidade de alimento, espaço no comedouro ou frequência de alimentação; e das condições climáticas (MERTENS, 1992).

O aumento da densidade energética da ração obtida pela suplementação com lipídio é uma estratégia nutricional que pode ser utilizada no confinamento, com vantagens de não apresentar os inconvenientes distúrbios metabólicos digestivos causados por rações com alta proporção em grãos, ricas em amido. Entretanto parecem limitações dessa aplicação, as evidências de que a adição de lipídios possa agir negativamente sobre a fermentação ruminal, diminuindo a digestão da fibra e o consumo de matéria seca (VARGAS et al., 2002).

A digestibilidade é outro fator importante na avaliação de alimentos. É definida como processo de conversão de macromoléculas dos alimentos em compostos mais simples, que podem ser absorvidos a partir dos diversos compartimentos do trato gastrointestinal, onde vários fatores podem influenciar a digestão do alimento, como a composição dos alimentos e das rações, efeito associativo entre alimentos, preparo e forma de arrazoamento, taxa de degradabilidade e relação proteína:energia e fatores relacionados ao animal (VAN SOEST, 1994).

De acordo com Coelho da Silva e Leão (1979), a digestibilidade do alimento representa a capacidade do aproveitamento dos seus nutrientes pelo animal em maior ou menor escala, e é expressa pelo coeficiente de digestibilidade do nutriente, sendo isto uma característica do alimento e não do animal.

Portanto, o coeficiente de digestibilidade indica a quantidade percentual de cada nutriente do alimento que o animal tem condições de utilizar e é determinado pela diferença entre as quantidades de nutrientes consumidas e as excretadas nas fezes (COELHO DA SILVA & LEÃO, 1979; VAN SOEST, 1994).

2.3 Comportamento ingestivo

O estudo do comportamento ingestivo é uma ferramenta de suma importância para a nutrição animal, pois através deste entende-se os fatores que atuam na regulação da ingestão de alimentos e água, bem como estabelecer ajustes que potencializem o ganho na produção (MENDONÇA et al., 2004).

O comportamento ingestivo está relacionado com o consumo de alimento ou de substâncias nutritivas, incluindo sólidos e líquidos, sendo que as diferentes espécies apresentam características particulares quando se refere a ingestão de alimento e água (RIBEIRO, 2006). Dessa forma, Mendes Neto et al. (2007) ressaltaram que o comportamento ingestivo de ruminantes é fundamental para entender os processo de digestão dos alimentos, sua eficiência de utilização e absorção e, da manutenção das condições ruminais, sendo que cada um desses processos é resultado de uma complexa interação do metabolismo do animal com as propriedades físicas e químicas da ração. Ressalta-se que o animal pode mudar seu comportamento para superar situações de limitação do consumo e para obter quantidade necessária de nutrientes.

Para a avaliação do comportamento ingestivo são estudados parâmetros como, tempo de alimentação, ruminação, ócio, períodos de ruminação e eficiência de alimentação e ruminação, (MENDONÇA et al., 2004).

Ribeiro et al. (2006) reportaram que as atividades de alimentação e ruminação dependem de fatores que estão relacionados a frequência e ao tempo de alimentação, aonde a frequência de alimentação e ruminação pode estar

relacionada ao hábito alimentar de cada espécie, e o tempo de alimentação e da velocidade com que esta é efetuada, podem estar ligadas a morfologia da forragem, tempo gasto na apreensão do alimento e redução do tamanho da partícula, bem como às características inerentes ao concentrado.

A ruminação compreende a soma da regurgitação, mastigação, salivação e deglutição do bolo. Os processos de remastigação e salivação levam aproximadamente 50 a 60 segundos. Durante esses processos ocorre a mastigação merícica, que é a mastigação do bolo ruminal, realizada durante a ruminação. Já a mastigação total, compreende a mastigação merícica e a mastigação realizada durante a alimentação, tem de 50 a 70 movimentos por minuto, dependendo das características do alimento (RIBEIRO, 2006).

De acordo com Fischer et al. (1998), os períodos gastos com a ingestão de alimento são intercalados com um ou mais períodos de ruminação ou de ócio; e o fornecimento de alimento influencia o ritmo da ruminação, sendo mais elevado durante a noite. Existem diferenças entre os indivíduos quanto à duração e a divisão das atividades, podendo ser condicionadas pelo apetite dos animais, sua anatomia e o suprimento das exigências energéticas que seriam influenciadas pela relação volumoso: concentrado.

Ribeiro et al. (2006) rações ricas em volumoso (60% a 100%) proporcionam maior tempo de ruminação, maior produção salivar, e baixa produção de ácidos graxos voláteis (AGV), enquanto com rações ricas em concentrado (40% a 65%) proporcionam um menor tempo de ruminação, com baixa produção salivar e alta concentração de AGV.

Em animais mantidos em confinamento, os períodos de alimentação podem variar em função da ração: se o alimento for rico em energia pode durar de uma a duas horas, e de seis ou mais para alimentos com baixos teores energéticos (Van Soest, 1994). Segundo Baumont et al. (2000), normalmente, são ofertadas duas refeições por dia e a maior parte do consumo de alimento diário (cerca de 60 a 80%) ocorre durante essas duas principais refeições.

Cardoso et al. (2006) os pequenos ruminantes têm a capacidade de adaptação às mais diversas condições de alimentação, manejo e ambiente, modificando seus parâmetros de comportamento ingestivo para alcançar e manter determinado nível de consumo compatível com as exigências nutricionais, o qual depende de outras variáveis, como a qualidade dos ingredientes da ração, sobretudo as forragens, e os

teores de fibra, que está associada ao estímulo da mastigação, produção de saliva, motilidade do rúmen e manutenção ruminal.

Dessa forma, o estudo do comportamento ingestivo pode elucidar problemas relacionados à diminuição do consumo em épocas críticas, atribuída aos efeitos das práticas de manejo e dimensionamento das instalações, da qualidade e da quantidade da ração (ALBRIGHT, 1993).

2.4 Influência da suplementação lipídica sobre a reprodução

A alimentação exerce influência sobre a reprodução, e os nutrientes apresentam mecanismos específicos de atuação sobre a eficiência reprodutiva. Os níveis nutricionais podem afetar o desenvolvimento e a função dos órgãos reprodutivos, além de acarretar alterações do funcionamento do sistema endócrino envolvido com a reprodução.

O consumo insuficiente de energia acarretará na redução do desempenho reprodutivo, que em machos, se dá pelo atraso na entrada à puberdade, redução da libido e queda na produção de espermatozóides (PIRES E RIBEIRO, 2006).

A influência do nível de lipídios na ração sobre as funções reprodutivas ainda não é totalmente compreendida, mas sabe-se que aumentando a densidade energética da ração, ocorre aumento de substrato na forma de acetil-CoA para síntese de hormônios esteróides, altera a expressão gênica em tecidos reprodutivos, modula a secreção de prostaglandinas (SANTOS E SÁ FILHO, 2006). Em função disso, têm aumentado as pesquisas avaliando o uso de diferentes fontes de ácidos graxos, principalmente aqueles mais insaturados sobre parâmetros reprodutivos em ruminantes. Para que os ácidos graxos insaturados tenham efeitos benéficos na reprodução, eles devem resistir a biohidrogenação ruminal e serem absorvidos no intestino delgado tal quais como foram fornecidos na ração.

O fornecimento de óleos vegetais, ricos em ácido oleico (18:1) e linoleico (18:2) aumentam a gliconeogênese pelo incremento na produção de propionato no rúmen, acarretando na elevação nos níveis de insulina, fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), além de

aumentar a concentração circulante de colesterol (CHALUPA et al., 1986; THOMAS et al. 1997).

A suplementação lipídica pode elevar taxa de colesterol na circulação sanguínea e este é precursor de hormônios esteróides, importantes para o processo de maturação sexual e espermatogênese. Dessa forma, aumentando as concentrações sanguíneas de colesterol, concomitantemente, pode haver aumento nos níveis circulantes dos esteróides (SARTORI E MOLLO, 2007).

Os esteróides são lipídios estruturais presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas, sendo o colesterol o mais importante esterol nos tecidos animais (NELSON & COX, 2002). Além de constituir membranas biológicas, o colesterol possui atividades biológicas específicas e essenciais, como, por exemplo, participar da síntese dos ácidos biliares, da vitamina D e ser o precursor dos hormônios esteróides (ALBERTS et al., 1997).

Henricks (1991) afirmou que a progesterona, a testosterona e o 17- β estradiol são esteróides intimamente relacionados e são sintetizados a partir do colesterol, o qual pode ser oriundo da síntese “de novo” a partir do acetato, do colesterol armazenado no interior das células ou do colesterol lipoprotéico.

O colesterol, principal componente estrutural da membrana, tem um importante papel como regulador da função da membrana plasmática (YEAGLE, 1985). Para desempenhar sua função a membrana plasmática deve se apresentar em estado de fluidez sendo este estado afetado principalmente pela composição relativa entre o colesterol e os fosfolipídios e pela temperatura à qual a membrana é exposta (RATES, 2011). De acordo com Darin-bennett et al. (1977) as espécies que apresentam espermatozóides mais resistentes ao choque térmico são aquelas em que estas células contêm maior concentração de colesterol na membrana, menor superfície da cabeça e maior proporção de ácidos graxos insaturados x saturados.

A inclusão de óleos e gorduras vegetais, contendo ácidos graxos insaturados, promovem também alterações no perfil dos ácidos que constituem a membrana celular, isso contribui de certa forma para o aumento de sua fluidez, permitindo que durante um processo de criopreservação, ocorra um favorecimento na entrada do crioprotetor na célula, acarretando assim, em uma maior resistência desta ao congelamento (MAGGIONI et al., 2008).

A composição de ácidos graxos do tecido adiposo e das membranas celulares reflete a composição dos lipídios da ração, havendo muitos trabalhos que confirmam

que os lipídios da ração são incorporados nos lipídios teciduais (STUBBS & SMITH, 1984).

O balanço dietético entre ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 pode ser o principal responsável pela qualidade do sêmen in natura, uma vez que a fluidez da membrana do espermatozóides é grandemente relacionada à sua composição lipídica(OLIVEIRA et al., 2006).

Strzezek et al. (2004) avaliando o efeito do fornecimento de um suplemento contendo ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes (PROSPERM[®]) observaram que a inclusão de ácidos graxos poliinsaturados na ração proporcionou melhoria nas características bioquímicas e na qualidade espermática do sêmen in natura de suínos.

Oliveira et al. (2006) em pesquisa com varrões observaram que o uso de óleo comercial PUFA[®] e óleo de peixe nas rações desses animais demonstraram ser mais eficiente para a produção e viabilidade das células espermáticas.

O uso de diferentes fontes de ácidos graxos na alimentação, que possa influenciar no desempenho reprodutivo de machos, foram avaliados em galos (RODENAS et al. 2005), coelhos (ANDREAZZI et al., 2004), suínos (OLIVEIRA et al., 2006), apresentando bons resultados na qualidade do sêmen, entretanto são raros os trabalhos que tenham avaliado tais efeitos na qualidade espermática de ruminantes, especificamente em caprinos

2.5 Célula espermática

2.5.1 Estrutura do espermatozóide

O espermatozóide é uma célula alongada, consistindo de uma achatada cabeça contendo o núcleo e uma cauda que contém o aparelho necessário para a motilidade celular. Além disso, é recoberto pela plasmalema, ou membrana plasmática, e possui cinco regiões estruturais: cabeça, colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (FAWCETT, 1975).

A forma da cabeça é determinada pela forma de núcleo, e este possui um DNA altamente condensado que é rodeado por um envelope nuclear (AMANN & GRAHAM, 1993). O acrossoma é uma organela altamente especializada que se assemelha a um lisossoma celular e cobre a porção anterior da cabeça (AMANN & GRAHAM, 1993; ABOU-HAILA & TULSIANI, 2000), e é rodeado pela membrana acrossomal interna e externa que contém grânulos secretórios derivados do complexo de Golgi que secretam enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases, e hidrolases ácidas. Estas enzimas hidrolíticas são responsáveis pela penetração dos oócitos (FAWCETT, 1975; AMANN & GRAHAM, 1993; ABOU-HAILA & TULSIANI, 2000).

A cauda do espermatozóide é composta de colo e pela peça intermediária, principal e terminal. O colo conecta a cabeça à peça intermediária, e forma uma placa basal que se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior do núcleo. O colo também contém o centríolo proximal que é responsável pela contractilidade necessária para o movimento da cauda do espermatozóide (AMANN & GRAHAM, 1993).

Os componentes estruturais da peça intermediária são a mitocôndria, fibras densas exteriores, axonema, e *annulus*. A mitocôndria fornece a energia responsável pela motilidade dos espermatozóides com a produção de ATP. As nove fibras densas exteriores, originadas na peça intermediária, que estende-se à porção caudal da peça principal, provêm rigidez à cauda (AMANN & GRAHAM, 1993). O axonema é composto de nove pares de microtúbulos envolvendo 2 filamentos centrais, e estende-se da região de colo à peça terminal com as fibras que ficam progressivamente mais finas e são responsáveis pela motilidade de espermatozóides. O *annulus* provê uma clara distinção da porção caudal da peça intermediária e o começo da peça principal (FAWCETT, 1975). A peça principal é composta centralmente do axonema e sua associação de fibras grosseiras. As fibras provêm a rigidez precisa para movimento da cauda (AMANN & GRAHAM, 1993). A peça terminal possui apenas o axonema recoberto pela membrana plasmática (FAWCETT, 1975).

2.5.2 Membrana plasmática

A célula espermática é envolvida pela membrana plasmática que é formada basicamente por uma bicamada lipídica contendo proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolípídios organizados em um mosaico fluído (SINGER & NICHOLSON, 1972). As proteínas integrais e periféricas são aproximadamente 50% do peso da membrana, e estão entremeadas ao longo da bicamada lipídica. As proteínas integrais são canais através da membrana e as proteínas periféricas podem ser removidas facilmente da membrana (AMANN E GRAHAM, 1993).

Os lipídios que compõem a membrana plasmática dos espermatozóides mamíferos são preferencialmente os insaturados, o que conferem a ela uma consistência fluída. O grau de fluidez da membrana depende da composição lipídica e da temperatura. Em temperaturas mais baixas, ocorre pouca movimentação lipídica e a bicamada assume uma forma quase cristalina. Quanto maior a proporção dos ácidos graxos saturados, maior é a temperatura de transição sólido-fluído da membrana (NELSON E COX, 2002).

Os fosfolipídios estão em um arranjo lamelar que organiza a cadeia de ácido graxo em uma barreira hidrofóbica à água, prevenindo a entrada de água ou outras moléculas. À temperatura corporal, a membrana plasmática está no estado fluído e o arranjo lamelar permite aos fosfolipídios moverem-se livremente ao longo da bicamada (AMANN & PICKETT, 1987; AMANN & GRAHAM, 1993). A proporção colesterol: fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura, são responsáveis por determinar a fluidez da membrana. De uma forma geral, regiões da membrana com alto teor de colesterol são menos fluídas que porções com maior proporção de fosfolipídios (AMANN & PICKETT, 1987). No entanto, espécies que apresentam maior proporção de colesterol: fosfolipídios, a exemplo dos humanos (0,99) e coelhos (0,88) apresentam menores danos causados à membrana durante o processo de resfriamento, quando comparado a espécies que apresentam menor proporção de colesterol, como carneiros (0,38) e bovinos (0,45) (DARIN-BENNETT et al, 1977).

As temperaturas das células diminuem, durante o processo de resfriamento, que antecede o congelamento, e a membrana passa por uma fase de transição do

estado líquido para o estado cristalino. As proteínas se agregam ao longo da membrana, promovendo o aumento de sua permeabilidade e a redução da atividade metabólica dos espermatozoides. Os danos desta fase de transição são frequentemente irreversíveis e é conhecido como choque térmico (HOLT & NORTH, 1984; AMANN & PICKETT, 1987; AMANN & GRAHAM, 1993). O choque térmico acarreta alterações no espermatozoide, como: o aumento do movimento circular fechado, a perda acelerada da motilidade, danos na membrana plasmática e acrossomal, decréscimo na produção de energia, perda de moléculas e íons (GRAHAM, 1996).

De uma forma geral, a criopreservação provoca lesões à membrana celular, principalmente, devido a alterações térmicas, mecânicas, químicas e ao estresse osmótico. Contudo, os prejuízos sofridos pela membrana plasmática no processo de criopreservação são atribuídos à desidratação celular e formação de cristais de gelo (PARKS & GRAHAM, 1992).

2.6 Particularidades do sêmen caprino

O sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides e secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As principais substâncias orgânicas presentes no sêmen caprino são frutose, sorbitol, inositol, ácido cítrico, fosfolípidios, glicerilfosforilcolina, prostaglandinas e proteínas. O pH se mantém muito próximo a 7,0 por um complexo sistema tampão. A energia necessária para manter a motilidade e viabilidade dos espermatozoides procede dos açúcares especialmente da frutose, presente no plasma seminal. (EVANS & MAXWELL, 1987)

O sêmen caprino apresenta particularidades que o diferencia do de outras espécies, sendo dentre elas, a mais importante, a síntese e secreção de enzimas pelas glândulas bulbo uretrais liberadas no plasma seminal (SIMPLÍCIO & MACHADO, 1989).

Segundo Roy (1957) a secreção da glândula bulbouretral de bodes possui uma enzima de coagulação da gema de ovo (EYCE), e na presença de cálcio a enzima EYCE, que é uma fosfolipase A, atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitina. Essa reação de hidrólise promove a atividade fusogênica da membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina.

Uma fração glicoprotéica do plasma seminal de caprinos (SBUIII), também originada das glândulas bulbouretrais, interage com o diluente à base de leite, provocando inibição da motilidade espermática, ruptura do acrossoma e morte celular espermática. A SBUIII foi identificada por Nunes (1982) e é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e também os triglicerídeos contidos no leite desnatado, resultando no ácido oléico, que é tóxico aos espermatozoides (PELLICERRUBIO et al., 1997). Entretanto, estudos mais recentes identificaram essas duas enzimas como sendo a mesma molécula (LEBOEUF et al., 2000).

O conhecimento da EYCE e da SBUIII é extremamente relevante quando se observa que a maioria dos diluentes utilizados para caprinos possui gema de ovo, leite ou ambos em sua composição. Para contornar este problema, Memon et al. (1985) sugeriram que o sêmen fosse centrifugado para retirada destas enzimas. No entanto, a opinião entre autores (ISLAM et al. 2006; PURDY, 2006; VIANA et al. 2006; COLOMA et al. 2010) sobre os benefícios da centrifugação varia muito.

Estudos realizados por Islam et al. (2006), e Coloma et al. (2010) observaram melhoras do sêmen centrifugado em relação ao não centrifugado. Por outro lado, resultados satisfatórios foram relatados para o sêmen não centrifugado (ROCA et al. 1997; VIANA et al. 2006).

As divergências em relação a centrifugação do sêmen podem estar relacionadas com a estação do ano em que o sêmen foi coletado, a metodologia de centrifugação ou ainda ao diluente utilizado (PURDY, 2006).

Entretanto, a eliminação do plasma seminal a fim de minimizar os efeitos negativos sobre a conservação do sêmen, pode afetar a capacitação "in vivo" dos espermatozoides, visto que o plasma seminal possui enzimas e outras substâncias importantes para a fertilidade do sêmen (MAXWELL & JOHNSON, 1999).

2.7 Criopreservação

2.7.1 Aspectos básicos da criopreservação

O processo de criopreservação de sêmen inclui as etapas que inicia com a coleta de sêmen, diluição, centrifugação, resfriamento e congelamento até a manutenção da capacidade funcional do espermatozóide pós descongelamento. Embora alguns desses estágios possam ser relativamente inócuos, existem pelo menos dois estágios de estresse pelos quais as células espermáticas passam durante o congelamento e descongelamento. O primeiro está relacionado aos efeitos das mudanças na temperatura e o segundo aparece por causa da formação e dissolução do gelo (WATSON, 1995).

Para adquirir uma boa taxa de sobrevivência dos espermatozoides após a congelação é necessário estabelecer as velocidades de resfriamento, congelamento e descongelamento (MAZUR, 1984). O resultado do processo de criopreservação depende de interações entre meios diluidores, crioprotetores, curva de resfriamento e descongelamento. Estas etapas são responsáveis por reduzir os danos causados pelo choque térmico, reduzindo a formação de cristais de gelo intercelulares e propiciando uma adequada desidratação celular (HOLT, 2000). O resfriamento dos espermatozoides a temperaturas acima de 0° C causa perdas prematuras e irreversíveis na motilidade, altera as propriedades físicas da membrana, aumento da sua permeabilidade e perda de moléculas e íons intracelulares (WATSON, 1981).

A adição do crioprotetor ao meio de congelação provoca saída de água das células e diminuindo seu volume, devido à exposição a um ambiente hiperosmótico. À medida que o crioprotetor penetra dentro das células ocorre entrada de água e aumento do volume celular. Durante a remoção do crioprotetor do meio, após a descongelação, ocorre o reverso, pois quando este sai do interior das células ocorre concomitante saída de água provocando diminuição do volume celular. As mudanças no volume celular, induzidas pela adição e remoção do crioprotetor no meio, são distintas daquelas ocorridas durante o resfriamento e o reaquecimento, portanto, estas duas etapas do processo de criopreservação podem ser potencialmente prejudiciais as células (GILMORE et al., 1998).

Muitos compostos são utilizados como crioprotetores, como, o glicerol, metanol, etileno-glicol, 1-2, propanediol e o dimetil sulfóxido (DMSO). O glicerol é o mais utilizado na criopreservação da célula espermática de várias espécies (HOLT, 2000), pois quando penetra na célula espermática altera a viscosidade do citoplasma e os processos de difusão da membrana plasmática (HAMMERSTEDT et al., 1978). O glicerol ao penetrar a bicamada lipídica da membrana plasmática provoca alterações na estrutura lipídica, na estabilidade e permeabilidade da membrana celular, e outras alterações ocorrem, como interferência nas respostas das vias enzimáticas e na capacidade de fusão da membrana do espermatozóide acelerando o processo de capacitação, o que contribui para a redução na viabilidade do espermatozóide (WATSON, 1995).

O problema mais evidente na congelação do sêmen é a perda da motilidade espermática. A criopreservação e a descongelação promovem a cristalização da água e mudanças osmóticas no meio extracelular, resultando em alterações nos componentes da membrana plasmática, aumentando a sua permeabilidade, provocando uma redução na atividade metabólica, danos no acrossoma e de outras estruturas, como alterações nas concentrações de eletrólitos intracelulares com conseqüente perda de fertilidade (HOFMO & ALMLID, 1992).

A cristalização do meio extracelular ocorre dependendo da velocidade de resfriamento e dos crioprotetores utilizados. As células ficam expostas a soluções hiperosmóticas, resultando na saída de água de seu interior e influxo de íons; já na descongelação acontece o efeito inverso, com influxo de água para o meio intracelular podendo acarretar ruptura da membrana plasmática. No intuito de obter-se uma boa sobrevivência das células espermáticas após a descongelação faz-se necessário o controle osmótico e químico do meio extracelular. A escolha da composição do diluidor, natureza dos crioprotetores e outros nutrientes como açúcares, quelantes, cálcio, antioxidantes e proteínas da gema de ovo ou do leite, vêm demonstrando ter influência na sobrevivência da célula espermática (HOLT, 2000).

2.7.2 Colesterol x Ciclodextrina

A relação entre níveis de colesterol da membrana plasmática dos espermatozóides e susceptibilidade ao choque térmico está bem estabelecida (RATES, 2011).

O colesterol é responsável em reduzir a fluidez da membrana acima da temperatura de transição, mas aumenta a fluidez da membrana quando resfria para temperatura abaixo da fase de transição (ROTTEM et al., 1973; CULLIS & HOPE, 1985). Sabe-se que o colesterol altera a membrana espermática, protegendo a célula durante o resfriamento. Portanto, a adição de colesterol pode ajudar a minimizar ou eliminar a fase de transição durante o processo de resfriamento (GRAHAM & FOOTE, 1987). A Perda de colesterol da membrana plasmática de células criopreservadas tem sido observada em suínos e garanhões (CEROLINI et al., 2001; MOORE et al., 2005), o que causa uma capacitação pré-matura das células. A Capacitação pré-matura é uma razão para reduzir a viabilidade de espermatozóides criopreservados na reprodução de fêmeas (WATSON, 1995). Moore et al. (2005) demonstraram que a adição de colesterol carregado pela ciclodextrina permitiu as células de manter um elevado teor de colesterol, e impedir as células de sofrer pré maturação para a capacitação, e aumentar a viabilidade.

A Ciclodextrina é um oligossacarídeo cíclico, composto de unidades glicosídicas, produtos da degradação do amido, que é capaz de incorporar várias substâncias sem a formação de ligações covalentes no centro do círculo que compõe sua estrutura (CHALLA et al., 2005). Desta forma, o colesterol é incorporado à membrana plasmática do espermatozóide. A ciclodextrina é uma forma de alterar o conteúdo de colesterol da membrana celular (OHVO et al., 1997; ATGER et al., 1997). Durante anos, complexos de drogas e ciclodextrina foram utilizados na indústria química que os usa como um veículo, pois são amorfos, de boa solubilidade, atóxicos, e capazes de formar complexos cristalinos com drogas (PITHA et al., 1988).

Quando ciclodextrinas são incubadas com espermatozóides, elas medeiam à remoção de colesterol que induz capacitação espermática (CHOI & TOYODA, 1998; CROSS, 1999; VISCONTI et al., 1999). Alternativamente, se as ciclodextrinas são carregadas com colesterol, as ciclodextrinas transferem colesterol abaixo de um

gradiente de concentração para a membrana plasmática do espermatozóide, resultando num aumento dos níveis de colesterol na membrana (PURDY & GRAHAM, 2004a)

As formas mais comuns de ciclodextrina produzidas possuem seis (α), sete (β), ou oito (γ) unidades de glicosídicas (SAENGER, 1980). A superfície externa da β -ciclodextrinas é hidrofílica, fazendo então solúvel em água, e elas têm uma cavidade interna hidrofóbica. As propriedades hidrofóbicas permitem as ciclodextrinas encapsularem compostos insolúveis, que são moléculas naturais e sintéticas como hormônios, vitaminas e compostos lipídicos (CHALA et al., 2005). Estes tornam-se solúveis em soluções aquosas como as β -ciclodextrinas que têm maior afinidade das três formas citadas, por compostos lipídicos, como o colesterol (YANCEY et al., 1996; OHVO et al., 1997; CHRISTIAN et al., 1997; CHOI & TOYODA, 1998; CROSS, 1999). Existem também ciclodextrinas modificadas, sintetizadas a partir da α , β e γ ciclodextrinas, por meio da substituição dos grupos hidroxila por grupos hidroxipropila, metila e sulfobutila. Essas modificações melhoram sua solubilidade, reduzem sua toxicidade e aprimoram sua habilidade de dissolver esteróides em solução aquosa (CHALLA et al., 2005). Portanto, a β -ciclodextrina tem uma maior eficiência de aceitar o colesterol e aumentar a solubilidade da água quando metilada (YANCEY et al., 1996).

2.7.3 Ciclodextrina e Colesterol versus Criopreservação

A incorporação e remoção de colesterol em membranas de células tem sido reportado para vários tipos de células (KILSDONK et al, 1995; YANCEY et al., 1996; CHRISTIAN et al, 1997), inclusive em espermatozóides (CHOI E TOYODA, 1998; CROSS, 1999; IBORRA et al., 2000; PURDY & GRAHAM, 2004; MOORE et al., 2005; MOCE & GRAHAM, 2006). Em particular, a ciclodextrina (heptasacarídeo cíclico que consiste em β (1–4) unidades de glicopirranose), que têm um centro hidrofóbico, efetivamente remove colesterol da membrana espermática, induzindo a capacitação do espermatozóide. A ciclodextrina pode alterar o conteúdo de colesterol da membrana celular (CHRISTIAN et al., 1997; VISCONTI et al., 1999), e se são pré-carregadas com colesterol elas adicionam o colesterol dentro das

membranas (PURDY & GRAHAM, 2004)). Se o sêmen de garanhões (COMBES et al., 2000; MOORE et al., 2005; AMORIM, 2008 SIPIZZIRI et al., 2010), bovinos (Purdy e GRAHAM, 2004; MOCE E GRAHAM, 2006; AMORIM et al., 2009), ou carneiros (MOCÉ et al., 2010) são tratados com ciclodextrinas carregadas com colesterol (CCC) antes do congelamento, eles exibem maiores taxas de sobrevivência após criopreservação que o sêmen não tratado.

A saída de colesterol da membrana plasmática é o passo inicial para a capacitação. É um evento necessário para os espermatozoides adquirirem habilidade para fertilização (LANGLAIS & ROBERTS, 1985; EHRENWALD et al., 1988). Iborra et al. (2000), relataram que espermatozoides de caprinos, tratados metil- β -ciclodextrina foram capazes de sofrer reação acrossômica. Parinaud et al. (2000) observaram que espermatozoides de humanos incubados com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrinas apresentaram maior afinidade de ligação com a zona pelúcida do que espermatozoides não tratados. O aumento da afinidade de ligação foi atribuído em decorrência ao aumento do número de espermatozoides capacitados devido à saída de colesterol da membrana plasmática (PARINAUD et al., 2000).

As CCCs têm sido utilizadas em uma variedade de espécie para aumentar a crio-sobrevivência em bovinos (PURDY & GRAHAM, 2004; MOCÉ & GRAHAM, 2006) garanhões (MOORE et al., 2005; SIPIZZIRI et al., 2010), e carneiros (MOOCÉ et al., 2010). Purdy e Graham (2004) reportaram que espermatozoide fresco de bovino tratado com CCC era retardado na habilidade deles sofrerem capacitação e reação acrossômica, proporcionando assim aumento da sua viabilidade.

2.8 Teste de ligação

A zona pelúcida é uma matriz extracelular transparente que envolve o oócito e embrião jovem, e em mamíferos compreende três glicoproteínas: ZPA, ZPB e ZPC. A ZP é um receptor espécie-específico de espermatozoides capacitados e induz a reação acrossômica, elimina a especificidade de espécies para espermatozoides e as interações da zona pelúcida. Ensaio *in vitro* com oócitos desnudados permitiram observar a ligação de heterólogos (SINOWATZ et al., 2003)

Métodos padrões de análises dos parâmetros preconizados para indicar a fertilidade de um macho ainda são a motilidade, morfologia e concentração espermática (CBRA, 1998). Dessa forma a habilidade do espermatozóide em se ligar a zona pelúcida (capacidade fecundante) pode ser considerado um valioso teste na análise da eficácia do processo de criopreservação do sêmen (BARBATO et al., 1998).

Ensaio de ligação da zona pelúcida *in vitro* foram utilizados para determinar as interações espermatozóide-oócitos em muitas espécies domésticas como suínos (AMORIM, 2008), eqüinos (MOORE et al., 2005), bovinos (AMORIM et al., 2009), caprinos (SANTOS, 2010) e carneiros (MOCÉ et al., 2010).

Os eventos bioquímicos relacionados à fertilização e a capacidade fecundante são difíceis de mensurar por meio de técnicas básicas de análise de sêmen. Assim, podem se utilizar os testes de ligação e penetração da zona pelúcida como técnicas de avaliação do potencial de capacitação e reação acrossômica do espermatozóide (AMORIM et al., 2009).

O teste de penetração oocitaria, apresenta vantagens em comparação à fertilização “*in vitro*”, pois é de rápida execução e também não é necessário maturação do oócito e avaliação do desenvolvimento embrionário, sendo somente necessário a avaliação da ligação/penetração do espermatozóide na membrana do oócito. Esse teste pode ser realizado por microscopia de fluorescência (corante de Hoechst 33258) ou por microscopia de luz (corante acetato deorceína) (HEWITT & ENGLAND, 1997).

As glicoproteínas da zona pelúcida de muitos mamíferos e da membrana perivitelina da gema do ovo de galinha, apresentam uma grande similaridade permitindo que ocorra ligação dos espermatozoides a esta membrana (BARBATO et al., 1998).

Dessa forma, o teste de ligação á membrana perivitelinica da gema do ovo, por ser uma técnica simples e rápida, pode ser utilizado para identificar a subfertilidade de machos (BARBATO et al., 1998), além disso pode ser utilizado para avaliar os danos ocasionados ou avaliar danos aos espermatozoides ocasionados em decorrência do processo de criopreservação do sêmen (AMANN et al., 1999).

2.9 Avaliação espermática

A qualidade do sêmen e sua relação com fertilidade têm grande importância na produção animal. Testes laboratoriais são realizados para determinar a qualidade do sêmen para a sua aprovação e utilização em inseminações artificiais, o que torna de fundamental importância uma análise precisa (PERIS et al., 2004). Avaliações por sondas fluorescentes das membranas, plasmática, acrossomal e mitocondrial e o uso de sistemas computadorizados para avaliação da motilidade espermática, são testes esclarecedores para determinar de forma objetiva a qualidade do sêmen (CELEGHINI, 2005).

2.9.1 Motilidade espermática

As análises de motilidade não prever com precisão a potencial de fertilização de uma amostra de sêmen e não apresentam uma alta correlação com a fertilidade, em parte porque outros parâmetros dos espermatozoides são necessários para que estes possam fertilizar um óvulo, além do movimento. No entanto, análises de motilidade de espermatozoides deve ser realizadas para avaliar a qualidade dos espermatozoides e para avaliar uma das funções dos espermatozoides que se sabe afetam a capacidade de fertilização (GRAHAM, 2001).

Gillan et al. (2008) demonstraram que, o uso combinado de avaliações de diagnóstico in vitro (avaliação de motilidade, morfologia, a concentração, a viabilidade, integridade acrossomal e cromatina) realizada imediatamente pós-descongelamento do espermatozoide de bovinos, apresentam uma alta correlação com a fertilidade. Embora as relações entre motilidade e outros parâmetros de qualidade de espermatozoides, bem como campo de fertilidade variam de baixo a alto, a mobilidade é um parâmetro importante e sua avaliação é relativamente simples, pelo que é amplamente utilizado para avaliar o sêmen fresco ou congelado.

A motilidade é avaliada visualmente por microscopia de contraste, e está pode ser influenciada pelo observador. Nesse contexto, a avaliação da motilidade subjetiva realizada por meios ópticos análise microscópica apresenta variações de

30 a 60% para os mesmos ejaculados (VERSTEGEN et. al., 2002). Vários sistemas foram desenvolvidos de modo a impedir que estes preconceitos e, dentre eles, o sistema de análise computadorizada das células espermáticas (CASA) é um dos mais importantes.

Sistemas de análise computadorizada das células espermáticas (CASA) é uma ferramenta valiosa para avaliação de espermatozoíde, uma vez que permite informações mais precisas e mais rápidas, sobre a cinética espermática, quando comparado com métodos manuais. Este sistema utiliza-se de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados, para sua avaliação. Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação ou wobble (WOB), expressos em percentual; velocidade curvilinear (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP), expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em Hertz; amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), expresso em micrômetros (VERSTEGEN et al., 2002).

A Motilidade progressiva e total dos espermatozoides são parâmetros de movimento obtido pelo CASA e utilizado para a avaliação do espermatozoíde. A Motilidade total refere-se ao espermatozoíde que exibir qualquer tipo de movimento, enquanto que a progressiva refere-se ao espermatozoíde móvel e a frente em uma linha (ROUGE, 2003). Para estimar com mais precisão a qualidade do espermatozoíde de uma amostra (fresca, refrigerada ou congeladas-descongeladas), vários testes laboratoriais devem ser realizados, dentre eles viabilidade, capacitação e reação acrossômica.

2.9.2 Integridade da membrana e viabilidade espermática

A avaliação das células espermáticas por técnicas que apresentem grande acurácia, maior objetividade e repetibilidade é de grande importância. Dentre as técnicas de avaliação do sêmen, vem sendo usado as sondas fluorescentes, por suas características de marcar estruturas específicas das células e detectar integridade estrutural ou funcional de forma clara (CELEGHINI, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide, como o brometo de etídio (HALANGK et al., 1984), corantes supravitais Hoechst 33342 (H342) e 33258 (MAXWELL et al., 1997; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006), SYBR-14 (PURDY & GRAHAM, 2004; PETERSON et al., 2007) e diacetato de carboxifluoresceína (DCF) (HARRISON & VICKERS, 1990; COLETO et al., 2002). No entanto, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associado a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática. Esta sonda possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997; ARRUDA, 2000; COLETO et al., 2002; ARRUDA, et al., 2003; CELEGHINI, 2005; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006; PETERSON et al., 2007).

Coleto et al. (2002) relataram que o uso do diacetato de carboxifluoresceína em combinação com o iodeto propídeo para avaliação da viabilidade espermática, apresentou uma pequena correlação entre a técnica de fluorescência, motilidade e o vigor espermáticos ($r = 0,1403$).

O Isotiocianato de fluoresceína (FITC), é uma sonda fluorescente, comumente utilizada para avaliação da integridade acrossomal dos espermatozoides em muitas espécies (SUKARDI et al., 1997). FITC é prendido a uma lectina, isolada da semente de plantas que especificamente se liga aos resíduos de açúcar (TROWBRIDGE, 1974). Aglutinina de *Pisum sativum* (PSA, aglutinina da ervilha) e aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA, aglutinina do amendoim) são as principais aglutininas usadas para determinar a integridade do acrossoma (GRAHAM, 2001). A lectina de amendoim cora o acrossoma com uma maior intensidade e com uma ligação menos específica que outras lectinas como a PSA (GRAHAM, 1996).

A associação de sondas fluorescentes de forma a permitir a avaliação da membrana plasmática do acrossomo e da mitocôndria tem sido empregada nas pesquisas realizadas nos últimos anos, todavia, muitos dos protocolos são laboriosos e demorados tornando difícil sua aplicação na rotina da avaliação seminal (CELEGHINI, 2005).

Para simplificar o uso combinado de sondas fluorescentes no sêmen de bovino, Celeghini (2005) testou várias associações para avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial: PI com FITC-PSA e Rodamina 123; PI com FITC-PSA e Mito Tracker Green FM (MITO); PI com FITC-PSA e a Mito Tracker Red (CMXRos) e; PI com FITC-PSA e JC-1. Dentre os protocolos testados a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 foi a escolhida devido a sua simplicidade, alta repetibilidade e acurácia e por fornecer um maior número de dados em relação às demais combinações.

Peterson et al. (2007) utilizaram uma combinação de sondas SYBR®14/IP, para avaliar a integridade da membrana de espermatozoides caprinos e relataram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HAILA A, TULSIANI DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. **Arch Biochem Biophys.**; 379(2), p.173-82, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. et al. **Biologia Molecular da célula**, 3. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1291 p.

ALBRIGHT, J. L. Feeding behavior of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.2, p.485-498, 1993.

AMANN RP and GRAHAM JK. Spermatozoal Function. In: **Equine Reproduction (A.O. McKinnon and J.L. Voss Eds.) Lea e Febiger**. Philadelphia, London. p. 715-745, 1993.

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

AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. K.; SPIZIRRI, B. et al. Effect of Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.58, n.2, p.201-204, 2009.

ANDREAZZI, M.A.; SCAPINELLO, C.; MORAES, G.V. et al. Avaliação da qualidade do sêmen em coelhos alimentados com rações contendo diferentes fontes de óleos vegetais. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 26, n. 1, p. 87-93, 2004.

ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – **Universidade de São Paulo**, 2000. 120p. Tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Science Veterinariae**, v.31 (Suplemento), p.230-231, 2003.

ATGER, V.M; DE LA LLERA MOYA, M; STOUDET, G.W. et al. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. **Journal Clinical Investigation**, 99:773-780, 1997.

BARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.58, p.686-699, 1998.

BARBOSA, L.P. **Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen, em programas de inseminação artificial em caprinos da raça Alpina**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 71p. Dissertação (Mestrado em Veterinária).

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. (Ed.) **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2001, p.44-57.

BAUMONT, R. How forage characteristics influence behaviour and intake in small ruminants: A Review. **Livestock Production Science**, v.64, p.15-18, 2000.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.; **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal : Funep, 538p, 2006.

BORJA, M. S.; OLIVEIRA, R. L.; RIBEIRO, C. V. D. M. et al. Effects of Feeding Licury (*Syagrus coronate*) Cake to Growing Goats. **Asian-Australian Journal Animal Science**. v. 23, nº. 11 : 1436 – 1444, 2010.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J. et al. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 6, n. 2, artigo n. 43, 2005.

CHALUPA, W.; VECCHIARELLI, B.; ELSER, A.E. et al. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.5, p.1293-1301, 1986.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**. 121(3), p. 395-401, 2001.

CHOI, Y.H; TOYODA, Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein free medium. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1328–1333, 1998.

CHRISTIAN, A.E.; HAYNES, M.P.; PHILLIPS, et al. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **Journal of Lipid Research**, v.38, p.2264–2272, 1997.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, MG. 49p.(Manual), 1998.

COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F. et al. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl., v.56, p.127–132, 2000.

CROSS, N.L. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.92–98, 1999.

CULLIS, P.R.; HOPE, M.J. Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In: **Biochemistry of lipids and membranes** (D.E. Vance and J.E. Vance Eds.) Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA pp.25-72, 1985.

CARDOSO, A.R.; CARVALHO, S.; GALVANI, D.B. et al. Comportamento ingestivo de cordeiros alimentados com rações contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.604-609, 2006.

COLETO, ZF; GUERRA, MMP; BATISTA AM. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, p.101-104, 2002.

COLOMA, M.A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. et al. The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. In: **Theriogenology**. vol. 73, p. 900 – 908, 2010.

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

CHURCH & DWIGHT CO. Megalac-r, rumen bypass fat. **EFA Alert Research Summary**. 28 p. 2002

COELHO DA SILVA, J.F.& LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livricones, 1979. P.380

CREPALDI, I. C.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de.; RIOS, M. D. G.; PENTEADO, M. de V. C.; SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, 2001.

DE CARVALHO, I. N. O. **Óleo de Soja Residual na Alimentação de Cabritos**. 2009. 26f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

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

EMEDIATO, R. M. S.; SIQUEIRA, E.R.; STRADIOTTO, M.M. et al. Desempenho de ovelhas da raça Bergamácia alimentadas com dieta contendo gordura protegida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1812-1818, 2009.

EVANS G, MAXWELL WMC. **Salamon's. Artificial insemination of sheep and goats**. Butterworth Publishers, Sydney 1987

FRANCO, M. Gordura inerte é boa fonte de energia. **DBO**. Ano 26, nº 321, p. 45, 2007.

FAWCETT, D.W. **The mammalian spermatozoon**. Dev Biol.; 44(2):394-436, 1975.

FISCHER, V.; DESWYSEN, A.G.; DÉSPRÉS, L. et al. Padrões nictemerais do comportamento ingestivo de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.2, p.362- 369, 1998.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal of Reproduction Science** 68(3-4), p.249-65, 2001.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; PETER, A.T.; et al. Determination of plasma

membrane characteristics of boar spermatozoa e their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**. v. 58, p. 28-36, 1998.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America*. **Equine Practice**. 12 (1): 119-129, 1996.

GRAHAM, J.K; FOOTE, R.H.; HOUGH, S.R. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, and boar. **Biology of Reproduction**. 37(1), p.181-188, 1987.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science** 68, p.239–247, 2001.

GILLAN, L., KROETSCH, T., CHIS MAXWELL, W.M. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, 103, p.201–214, 2008.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, e mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p. 55-64, 1990.

GHOREISHI, S.M.; ZAMIRI, M.J.; ROWGHANI, E. et al. Effect of a calcium soap of fatty acids on reproductive characteristics and lactation performance of fat-tailed sheep. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, p.2389-2395, 2007.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAM, J. K., NOLAM, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HAMMERSTEDT, R.H.; KEITH, A.D.; SNIPES, W.C. et al. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock e osmolality on sperm. **Biology of Reproduction**, 18, p.686-696, 1978.

HENRICKS, D.M. Biochemistry and physiology of the gonadal hormones. In: Cupps, P.T. **Reproduction in domestic animal**. 4. ed. San Diego: Academic Press, p. 81-118, 1991.

- HE, L., BAILEY, J.L., BUHR, M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential, **Biology of Reproduction**, v.64, p.69–79, 2001.
- HESS, B. Suplementação de gordura para vacas de corte em reprodução. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos. 12, **Palestras...** Uberlândia, Conapec Jr., Uberlândia. CD-Rom, 2008.
- HUANG, Y.; SCHOONMAKER, J.P.; OREN, S.L.; et al. Calcium salts of CLA improve availability of raçãory CLA. **Livestock Science**, v.122, n.1, p.1-7, 2009
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.50, p.123–139, 1997.
- HOFMO, P.O.; ALMLID, T. Recents developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. **Rep. Dom. Anim.** 26(1), 1992.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, 62:3-22, 2000.
- HOLT, W.V; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal of Experimental Zoology**. 230(3), p.473-83, 1984.
- IBORRA, A., COMPANYO, M., MARTINEZ, P. et al. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.62, p.378–83, 2000.
- ISLAM, R.; AHMED, K.; DEKA, B.C. Effect of holding and washing on the quality of goat semen. In: **Small Ruminant Research**. vol. 66, p. 51 – 57, 2006.
- KILSDONK, E.P.C., YANCEY, P.G., STOUTD, G.W., BANGERTER, F.W., JOHNSON, W.J., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.17250–56, 1995.
- LADBROOKE, B.D., WILLIAMS, R.M., CHAPMAN, D. Studies on lecithin–cholesterol–water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.150, p.333–340, 1968.

LANDIM-ALVARENGA FC, ALVARENGA MA, SEIDEL GE JR, SQUIRES EL, GRAHAM JK. Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. **Theriogenology**. 56(5),p.937-953, 2001.

LANGLAIS J, ROBERTS KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian sperm. **Gamete Research**. 12: 183-224, 1985.

LEBOEUF B.; RESTALL B.; SALAMON S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, 62, p.113-141, 2000.

MALAN, S.W. The improved Boer goat. **Small Ruminant Research**, v.36, p.165-170, 2000.

MARCO-JIMÉNEZ,F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S. et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v.52, p.295-304, 2006.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P.P.; ITO, R.H. et al. Efeito da nutrição sobre a reprodução de ruminantes: uma revisão. **PUBVET**, v.2, n.11, 2008.

MANERA, D.B.; VOLTOLINI, T.V.; SOUZA, R.A. et al. Avaliação quantitativa e morfológica de carcaças de ovinos mantidos em pastagens irrigadas suplementados com concentrado contendo diferentes resíduos da produção de biodiesel. In: **4º Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte**. João pessoa-PB, 2009.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of raçõory fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews Reproduction**, v.5, p.38-45, 2000.

MAXWELL, W.M.C; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362, 1999.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology** 48, p.209-219, 1997.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology** 247(3 Pt 1) p.125- 142, 1984.

MEDEIROS, S.R.; **Uso de lipídios na ração de ruminantes**. Informe Técnico, Macal Nutrição Animal, Campo Grande, 2007.

MEMON, M.A.; BRETZLAFF, K.N.; OTT, R.S. Effect of washing on motility and acrosome morphology frozen-thawed goat spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research** , v.46, n. 2, p.473-475, 1985.

MENDES NETO, J. CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Comportamento ingestivo de novilhas leiteiras alimentadas com polpa cítrica em substituição ao feno de capim-tifton 85. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.618-625, 2007.

MENDONÇA, S.S.; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Comportamento ingestivo de vacas leiteiras alimentadas com rações à base de cana-de-açúcar ou silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.723-728, 2004.

MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 29, 1992, Lavras. **Anais...** Lavras: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia/SBZ, p.188-219, 1992.

METZ, P. A. M. **Fontes de gordura na ração de novilhos terminados em confinamento**. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de ciências rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival **Journal of Animal Science**, v.84, p.826–833, 2006.

MOCÉ, E., PURDY, P. H., GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 236-247, 2010.

MOORE, A.I., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241–249, 2005.

MORAES, E. A., GRAHAM, J. K., TORRES, C. A. A., et al. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v.118, p. 148-154, 2010.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger princípios da bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NUNES J. Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc., 33f. **These** de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie. Paris, 1982.

OHVO, H.; OLSIO, C.; SLOTTE, J.P. Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux in cultured fibroblasts. **Biochimica Biophysica Acta**. 1349:131-141, 1997.

OLIVEIRA, S.L.; FIALHO, E.T.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, J.A.; FREITAS, R.T.F.; ZANGERONIMO, M.G. efeito da inclusão de diferentes tipos de óleo na ração de varrões sobre a qualidade do sêmen "in natura". **Ciência agrotécnica**, v.30, n.6, p.1205-1210, 2006.

PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Fat in lactation rations: Review. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.1, p.1-14, 1980.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídios. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006.

PARINAUD, J.; VIEITEZ, G.; VIEU, C.; COLLET, X.; PERRET, B. Enhancement of zona binding using 2-hydroxypropyl- beta-cyclodextrin. **Hum Reprod**. 15(5):1117-20, 2000.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology** 38, p.209-22, 1992.

PELLICER-RUBIO, M. T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biology of Reproduction**, v.27(5), p.1023-1031, 1997.

PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between spermandrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, 2004.

PETERSON K, KAPPEN MAPM, URSEM PJF, NÖTHLING JO, COLENBRANDER B, GADELLA BM. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch Al-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v.67, p.863-871, 2007.

PIRES, A.V. & RIBEIRO, C.V.M. Aspectos da nutrição relacionados à reprodução. IN: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Ed. Funep, Jaboticabal-SP, 2006.

PITHA, J.; IRIE, T.; SKLAR, P.B. et al. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. **Life Science**, 43(6), p.493-502, 1988.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. In: **Small Ruminant Research**. vol. 63, p. 215-225, 2006.

PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.48, p.36-45, 2004.

RATES, D.M. Efeito da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides sobre o congelamento e fertilidade do sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal de Viçosa, 2011.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, n. 27, 2007.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat 69 spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Ruminant Research**. vol. 25, p. 147 – 153, 1997.

ROTTEM, S.; YASHOUV, J.; NE'EMAN, A.; RAZIN, A. Composition, ultra-structure and biological properties of membrane from Mycoplasma mycoides var. capri cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. **Biochimica et Biophysica Acta**, 323, p.495-508, 1973.

RIBEIRO, V.L.; BATISTA, A.M.V.; CARVALHO, F.F.R. et al. Comportamento ingestivo de caprinos Moxotó e Canindé submetidos à alimentação à vontade e restrita. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 28, n. 3, p. 331-337, 2006.

RIBEIRO, V.L. Comportamento Ingestivo de Caprinos Moxotó e Canindé, submetidos à alimentação à vontade e restrita. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

RODENAS, C.E.O.; MURGAS, L.D.S.; MACIEL, M.P. et al. Características seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. **Ciência e agrotecnologia**, v.29, p.160-167, 2005.

ROUGE, M., 2003. **Sperm motility**. Disponível em: <<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks>>. Acessado em 23 de agosto de 2012.

ROY, A. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, London, p. 179-318, 1957.

SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. **Angewandte Chemie International ed. in English**, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 37, p. 185–249, 1995.

SANTOS, J.E.P. ; SÁ FILHO, M. F. Nutrição e reprodução em bovinos. IN: **2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2006, Londrina. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, 2006. p. 30-48.

SANTOS, M. C. R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozóides caprinos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SARTORI, R.; MOLLO, M.R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.197-204, abr./jun. 2007.

SILVA, M.M.C.; RODRIGUES, M.T.; RODRIGUES, C.A.F. et al. Efeito da suplementação de lipídios sobre a digestibilidade e os parâmetros da fermentação ruminal em cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.246-256, 2007.

SIMPLÍCIO, A. A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO

ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais....** Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.171-177

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

SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMULLER, C. et al. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. **Reproduction in Domestic Animals**. 38(2), p.141-146, 2003.

SPIZZIRI, B. E., FOX, M. H., BRUEMMER, J. E., SQUIRES, E. L., GRAHAM, J. K. Cholestesrol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p.255-264, 2010.

STEPONKUS, P.L.; DOWGERT, M.F.; GORDON-KAMM, W.J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation, **Cryobiology**, v.20, p.448-465, 1983.

STRZEZEK, J.; FRASER, L.; KUKLINSKA, M. et al. Effects of raçãory supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Reproductive Biology**,v. 4, n. 3, p. 271-287, 2004.

STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, Philadelphia, v. 779, p. 89-137, 1984.

SUKARDI, S., CURRY, M.R., WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status e viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, 46(1 -2), p.89-96, 1997.

TAVARES, A.M.A.; VÉRAS, A.S.C.; BATISTA, A.M.V. et al. Níveis crescentes de feno em rações à base de palma forrageira para caprinos em confinamento: Comportamento ingestivo. **Acta Scientarium Animal Sciences**, v.27, n.4, p.497-504, 2005.

THOMAS, M.G.; BAO, B.; WILLIANS, G.L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence growth in cows fed with isoenergetic diets. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 12-25, 1997.

TRALDI A. S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: **FEINCO 3**, 2006.

TROWBRIDGE, I.S. Isolation e chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*. **Journal Biological Chemistry**, 249(18), p.6004-12, 1974.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VARGAS, L. H.; LANA, R.P.; JHAM, G.N. et al. Adição de Lipídios na Ração de Vacas Leiteiras: Parâmetros Fermentativos Ruminais, Produção e Composição do Leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, Viçosa, jan./fev.2002.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L. et al. Avaliação *in vitro* do semen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. In: **Ciência Animal Brasileira**. vol 7, p. 67 – 76, 2006.

YAMAMOTO, S.M.; MACEDO, F.A.F.; ZUNDT, M. Fontes de óleo vegetal na ração de cordeiros em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.703-710, 2005.

YANCEY, P.G; RODRIGUEZA, W,V; KILSDONK, E.P. et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. **Journal Biological Chemistry**, 271(27):16026-34, 1996.

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.822, p.267–287, 1985.

WATSON, P.F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 871-891 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science** v. 60-61 p. 481-492, 2000.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes, In: MORRIS, G.J., CLARKE, A. (Eds.), **Effects of Low Temperatures on Biological Membranes**, Academic Press, New York, p.189–218, 1981.

ZANINI, S. F.; TORRES, C.A.A.; BRAGAGNOLO, N. et al. Fontes de óleo e níveis de vitamina E sobre desempenho produtivo e reprodutivo de galos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, n. 5, p. 71, 2003.

4. Artigos

4.1 Artigo 1 (submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

Intake, digestibility, and feeding behavior of goats fed with diets containing different lipid sources

Consumo, digestibilidade e comportamento ingestivo de caprinos alimentados com rações contendo diferentes fontes lipídicas

Wilson Duarte Ferrari Junior¹, Elenice Andrade Moraes¹ Bruno Gonçalves da Silva¹, Laicia Rios Lima¹, Wasley Carlos Gonçalves de Matos¹, Carina Silva de Oliveira¹

¹ Federal University of Vale do São Francisco (UNIVASF), BR 407 Road, Km 12 Lote 543 Irrigation Project Nilo Coelho – S/N C1, Petrolina, PE 56300-000, Brazil. *e-mail: wilsonferrarijunior@hotmail.com

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of inclusion of different lipid sources in the diet of goats on intake, digestibility of nutrients and feeding behavior. We used 16 male goats without defined breed bulls, which were confined and subjected to experimental diets. The treatments consisted of four diets: control (C) and supplemented with other licuri pie (TL), soybean oil residual (OSR) and inert fat (GI - Megalac E ®). The experimental period lasted 84 days, divided into three sub-periods of 28 days, for the evaluation of the feeding behavior. Evaluation of digestibility was held between the 69th and 76th day of the experimental period. The experimental design used was a randomized complete block design with four replications. The variables were analyzed using ANOVA and means were compared by Tukey test at 5% probability. The dry matter, crude protein, neutral detergent fiber, non-fiber carbohydrates, lipids, and total digestible nutrients were similar among diets ($P>0.05$). The digestibility of dry matter, neutral detergent fiber and ether extract were similar among diets ($P>0.05$). The use of licuri pie, soybean oil and residual inert fat lipid sources in diets for goats did not affect intake and digestibility of nutrients. However, the inclusion of the licuri pie interfered on the

behavior parameters, providing a longer rumination.

Keywords: energy demand, fat supplement, inert fat, licuri pie

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes fontes lipídicas na ração de caprinos sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes e o comportamento ingestivo. Foram utilizados 16 caprinos machos sem padrão racial definido, não castrados, que foram confinados e submetidos as rações experimentais. Os tratamentos consistiram de quatro rações: controle (C) e demais suplementadas com torta de licuri (TL), óleo de soja residual (OSR) e gordura inerte (GI – Megalac E[®]). O período experimental teve duração de 84 dias, dividido em três subperíodos de 28 dias de duração, para avaliação do comportamento ingestivo. Avaliação da digestibilidade foi realizada entre o 69º e 76º dia, do período experimental. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos ao acaso com quatro repetições. As variáveis foram submetidas à análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os consumos de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro, carboidratos não fibrosos, extrato etéreo e nutrientes digestíveis totais foram semelhantes entre as rações ($P>0,05$). Os coeficientes de digestibilidade de matéria seca, fibra em detergente neutro e extrato etéreo foram semelhantes entre as rações ($P>0,05$). A utilização da torta de licuri, do óleo de soja residual e da gordura inerte como fontes lipídicas em rações para caprinos não influenciaram o consumo e a digestibilidade dos nutrientes. Entretanto, a inclusão da torta de licuri, interferiu sobre os parâmetros do comportamento, proporcionando um maior tempo de ruminação.

Palavras chave: suplemento lipídico, demanda energética, gordura inerte, torta de licuri

Introduction

Feeding influences on reproduction, and the nutrients have specific mechanisms of action on reproductive performance. The nutrient levels can affect the development and the function of reproductive organs, and cause changes in the functioning of the endocrine system involved with the reproduction.

Thus, insufficient consumption of energy can entail the reduction of reproductive performance, which in males is caused by the delay in age at puberty, reduced libido, and decreased sperm production (Pires & Ribeiro, 2006).

Therefore, the increase in energy density achieved by the supplementation of the feed with lipid is a nutritional strategy that can be used in supplementing animals with a view to entry into the mating with advantages not present the drawbacks of metabolic disorders caused by digestive diets with high proportion in grains rich in starch (SALLA et al. 2003). However, their use in ruminant rations is still a lot of contradictions, given the still limited knowledge of the levels, forms of inclusion and its effects on consumption (NRC, 2001).

The inclusion of lipids, besides increasing energetically the quality of ration and the efficiency of the animals, it also increases the absorption capacity of fat soluble vitamins and essential fatty acids providing important for the tissue membranes (Palmquist & Mattos, 2006).

Lipid levels in the diet may influence the intake and digestibility of nutrients. The reduction in dry matter intake is related to the control chemostatic consumption, while the decrease in fiber digestibility is related to the direct toxic effect of unsaturated fatty acids on rumen microorganisms, which explains the saturated fats are less problematic than the unsaturated and the physical effect by the coating of food particles with fat, resulting in reduced contact with these ruminal microorganisms (Medeiros, 2007).

There are several sources of lipids that can be used in feeding for ruminants, including, oil seeds, such as what is obtained from the Licuri pie (Borja et al., 2010), derived from vegetable oil frying process, such as soybean oil residual (De Carvalho, 2009), which unlike other food waste is not biodegradable and its disposal becomes a problem for the industry and the environment, and inert fat (Silva et al., 2007).

Therefore, goats, by having different metabolism and feeding behavior in relation to other ruminant species can be expected to exhibit different responses to the provision of lipids (Van soet, 1994; Chilliard et al. 2003).

This study aimed to evaluate the influence of the supply of different lipid sources on intake, digestibility of nutrients and ingestive behavior of male goats.

Materials and Methods

The present study was performed under the institutional approval of the Federal University of Vale do São Francisco (Univasf) throughout the experimental protocol being conducted according to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the Ethics Committee on Animal Use of this institution, under the number 27091063.

The experiment was conducted at the Department of Goat's College of Animal Science, located in the Campus of Agricultural Sciences, Federal University of Vale do São Francisco in the period from March to June, 2012.

We used 16 male goats without defined breed bulls, with initial body weight of 25 ± 4.5 kg. The animals were dewormed against endo and ectoparasites, and housed in individual pens provided with feeders and drinkers.

The experimental design used was a randomized complete block design with four replications, with blocks defined according to the weight and age at the beginning of the experiment. The experimental period lasted 84 days, preceded by 10 days of the adaptation of the animals to the facilities, management, and experimental diets. The assessment of the intake and digestibility of the nutrients were carried out between the 69th and 76th day of the experimental period. The assessment of feeding behavior occurred during three periods: the first observation in the 26th and the other on the 52nd and 78th days of the experiment.

We evaluated four treatments consisted of a control diet (C - corn as an energy source), and three test diets, each one containing a form of lipid supplementation: licuri pie (TL); residual soybean oil (OSR) and calcium salts of long chain fatty acids (Inert fat - Megalac E ®).

The composition of experimental diets and nutrient ingredients is presented in the Table 1.

The diets were formulated according to the NRC (2007) to gain 100 g/day, being composed of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum) as forage and concentrate-based ground corn grain, soybean meal, mineral mixture, and vitamin with forage: concentrate (50:50) as total diet.

Table 1 - Percentage composition and chemistry of diets with different fat sources

Ingredients %MS	Treatments ²			
	C	TL	OSR	GD
Ground corn grain	28.00	20.00	25.40	25.10
Soybean meal	20.90	10.00	21.60	21.60
Licuri Pie	—	18.20	—	—
Frying Waste	—	—	2.00	—
Inert fat	—	—	—	2.30
Mineral and vitaminic mixture ¹	1.10	1.00	1.00	1.00
Elephant grass	50.00	50.00	50.00	50.00
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00
Nutrients %MS	C	TL	OSR	GD
Mineral matter (% MM)	9.52	9.13	9.64	8.42
Crude protein (PB)	16.55	16.53	17.63	17.62
Ether extract (EE)	3.32	5.21	5.31	4.94
Neutral detergent fiber (FDN)	48.72	50.83	44.21	45.12
Acid detergent fiber (FDA)	27.70	30.50	24.81	25.32
Lignin (LIG)	9.52	14.15	10.43	10.73
Non Fibrous Carbohydrate (CNF) ²	24.00	20.33	25.31	25.92
Total digestible nutrients (NDT) ³	82.62	80.41	82.52	86.83

¹Composition in Kg: 70g of P; 200g Ca; 5000mg of Mg; 10g of S; 100g of Na; 340mg of Fe;

440mg of Cu; 3010mg of Zn; 1480mg of Mn; 48mg of I; 25mg of Co; 20mg of Se; max. of 700mg; 6 mg of Cr; 250.000 UI of vitamin A; 40.000 UI of vitamin D3; 350 UI of vitamin E.

²Treatments: C=control; TL= licuri pie; OSR= residual soybean oil; GD= inert fat

² CNF: $100 - (\text{FND} + \text{PB} + \text{EE} + \text{MM})$

³ NDT = $(\text{PB}_D + \text{CNF}_D + \text{FDN}_D + \text{EE}_D \times 2,25) - 7$ (NRC, 2001)

The animals were weighed at the beginning and at the end of the trial period. The total feeding was provided ad libitum twice a day at 08 and 16 hours, and the remains were collected and weighed each day to determine the daily consumption. The amount of feed was calculated to allow approximately 15% of the remains. Water was provided ad libitum. To determine the digestibility of the nutrients, it was collected the food provided, the leftovers, and the feces (total collection) of each animal during the period between 69th and 76th day of the experimnt. It was made a composite sample of feces and other leftovers from each animal over the collection period. For total fecal collection, appropriate bags were used, made of canvas and attached by strips of nylon to not cause discomfort to the animals. The animals went through an adjustment period of six days, with the collection bags before starting the experiment. Samples of the food provided, leftovers, and feces were placed in plastic bags and stored at -15° C for subsequent chemical analysis.

In the Laboratory of Food Science and Animal Nutrition of the CCA/UNIVASF, samples of food, leftovers, and feces were subjected to pre-drying at 55° C for 72 hours, ground in a knife mill type *Thomas-Willey* with a sieve with 1 mm and stored in plastic containers, properly sealed for laboratory analysis. In the pre-dried samples, it was determined dry matter (DM), mineral matter (MM), organic matter (MO), crude protein (PB), ether extract (EE), neutral detergent fiber (FDN), fiber acid detergent (FDA) and acid detergent lignin (LDA) according to the procedures described by Silva & Queiroz (2002).

The values of non-fiber carbohydrates (CNF) were obtained by the equation: $\text{CNF} = 100 - (\% \text{ Ash} + \% \text{ PB} + \% \text{ EE} + \% \text{ FDN})$, according to Sniffen et al. (1992). The levels of total digestible nutrients were estimated by the following equation: $\text{NDT} = (\text{digestible PB} + (\text{digestível EE} \times 2.25) + (\text{digestible CNF} + \text{digestible FDN}) - 7$, in which: the value 7 refers to the metabolic fecal NDT (NRC, 2001).

The digestibility coefficients (DC) of DM, PB, FDN, FDA and EE were calculated according to Coelho da Silva & Leão (1979):

$$\text{CD} = [(\text{kg nutrient intake} - \text{nutrient excreted kg}) / (\text{kg nutrient intake}) \times 100$$

To evaluate the ingestive behavior, the animals were submitted to visual observation, in three distinct periods with intervals of 25 days, starting at 10h and always giving a period of 24 uninterrupted hours with 5 minute intervals between the assessments by the method of instant

scan to determine the time spent eating, ruminating, and idling (JONHSON & COMBS, 1991). At night observation of animals during the days of evaluation, the environment was maintained with artificial lighting. To estimate the average intake of DM and FDN by feeding period, considered the voluntary intake of DM and FDN of the 26th day of each experimental period, being the 27th day leftovers computed.

The variables were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% probability, using the statistical program SISVAR 5.1.

Results and Discussion

The inclusion of lipid sources in the diet did not affect ($P > 0.05$) the DM, PB, FDN, EE, CNF, and NDT (Table 2).

The fat supplementation in diets for ruminants has been related to the decrease in dry matter intake. Although not well elucidated, the mechanisms by which fat supplementation reduces consumption involve effects on rumen fermentation in intestinal motility, the acceptability of rations, in the release of gut hormones and fat oxidation in the liver (Allen, 2000). From this information, the lack of significant difference between treatments can be explained by the ether extract of rations, because the higher level was 5.3% in the diet with soybean oil residual, i.e., below the limit of 7% recommended by the literature (Palmquist & Jenkins, 1980).

Table 2 - Nutrient intake by confined goats fed different lipid sources in feed

Nutrients	Treatment ²				EPM ¹
	C	TL	OSR	GI	
CMS (g/day)	1572	1356	1219	1450	213.04
CMS (%PV)	3.44	3.28	2.74	3.18	0.30
CPB (g/day)	235	189	183	221	31.42
CFDN (g/day)	884	841	704	826	121.71
CEE (g/day)	40	42	36	43	5.79
CCNF (g/day)	303	199	208	256	38.48
CNDT (g/day)	1287	974	926	1215	194.17

²Treatments: C=control; TL= licuri pie; OSR= residual soybean oil; GD= inert fat

¹Average pattern error

The DM intake obtained in this experiment was higher than that found by Silva et al. (2007), who evaluated the effect of inclusion of soybean oil (OS), calcium salts of long chain fatty acids (SC) and soybean (GS) to feed goats, and recorded values of 0.73, 0.87 and 0.77 (kg/animal/day), respectively. This fact can be explained because the diets of this study

present a mair ratio of forage to concentrate, and lower levels of EE (5%) compared the diets of the abovementioned study, which showed levels of EE around 6%.

Similarly, Maia et al. (2006), working with dairy goats observed that supplementation with oils (canola, rice, and soy) did not affect the intake of DM, MO, PB, FDN, CNF, and NDT. However, Yamamoto et al. (2005) used soybean oil, canola and flaxseed in diets for feedlot lambs and found a reduction in DM intake of diets supplemented with canola oil compared to control. This may result relates to the making available of the lipid source because the oil has a greater dispersion of the particles of food by preventing the adhesion of microorganisms responsible for the degradation of the fiber. Furthermore, the sources tested may have influenced the acceptability of feed for animals, when compared to lipid sources used in this experiment, causing the activation of mechanisms that could affect consumption.

In the present study, the ether extract content supplied was 3.32, 5.21, 5.31 and 4.94% DM of the diets, respectively in control diets, licuri pie, soybean oil, and residual inert fat. Although the inclusion of lipid sources have provided an increase of around 2% in the ether extract of rations, apparently did not exert a negative effect on the digestibility of the forage, and, consequently, on the voluntary intake. Furthermore, another aspect to be considered is that, apparently, the sources added lipid showed high acceptability by animals.

The digestibility of DM, MO, FDN and EE did not differ ($P>0.05$) between treatments (Table 3). This suggests that the inclusion of sources of lipids evaluated kept the balance of rumen microorganisms, and as a consequence, digestion similar to the control diet.

Silva et al. (2007) evaluated the effect of the inclusion of soybean oil, calcium salts of long chain fatty acids (Megalac ®) and soybean in the diet of goats, observed that the digestibility of DM, MO, PB and CNF were not affected with the inclusion of these supplements. Confirming these data, Maia et al. (2006), in a study with goats supplemented with lipid sources (canola oil, rice and soybeans) reported that the digestibility coefficients of DM, MO and PB were similar among diets.

Table 3 - Nutrient digestibility of diets containing different lipid sources provided for goats confined

Parameters	Treatment				EPM
	C	TL	OSR	GI	
DMS ¹	81.14a	73.84a	77.21a	84.71a	2.82
DMO ²	81.15a	73.86a	77.23a	84.74a	2.82
DFDN ³	77.80a	67.59a	72.39a	88.19a	3.51
DPB ⁴	88.49a	78.36b	81.86ab	88.39a	2.24

DEE ⁵	76.50a	77.86a	83.94a	87.13a	3.66
DCNF ⁶	97.33a	91.76ab	90.24b	95.76ab	1.60
DNDT ⁷	81.53ab	75.08b	79.25ab	87.13a	2.42

Medium in the line followed by different letters differ at 5% probability by Tukey test.

¹DMS = Apparent digestibility of dry matter; ²DMO = Apparent digestibility of organic matter, ³DFDN = digestibility of neutral detergent fiber, ⁴DPB = Crude protein digestibility; ⁵DEE = Apparent digestibility of ether extract, ⁶DCNF = Apparent digestibility of non-fiber carbohydrates; ⁷DNDT = total digestible nutrients

C = control; TL = licuri pie; OSR = residual soybean oil; inert fat

In this work, the diet control and the supplemented with fat sources showed digestibility of similar FDN, suggesting that the ruminal conditions remained constant for all diets. These results are in agreement with those reported by Smith et al. (2007), to assess that the inclusion of three fat sources (soya oil, calcium, soybean) to feed goats, no reductions in the ruminal digestion Fibre, even when the supplement used was soybean oil.

Some authors report that by including lipid in the diet of ruminants there is no reduction in the utilization of protein, however, in this study there was no difference ($P > 0.05$) in protein digestibility between the control diets and inert fat. The diets supplemented with licuri pie and residual soybean oil showed lower levels compared with the control diet ($P < 0.05$). This demonstrates that in part, the protein of the licuri pie can be complexed to the cell wall, which may affect its availability to rumen microorganisms. Regarding the diet with soybean oil residual may be related to its way of providing because the oil has a higher dispersion of food particles reduces the availability of the nutrient to ruminal microorganisms. Yamamoto et al., (2005) evaluated the effect of different sources of vegetable oil (soybean, canola and flaxseed) in diets for lambs, observed that the inclusion of oils did not alter the digestibility of DM, MO and PB. However, Silva et al. (2007) observed a decrease in PB (84.21% and 78.44% control feed ration with inert fat) lactating goats ingesting inert fat, however, these authors balanced rations so that the ratio of metabolizable energy fermentable/crude protein and level of EE in the diet were kept constant.

On the digestibility of EE, no significant changes were observed ($P > 0.05$) between control and supplements.

These results differ from those found by Lana et al. (2005), that when assessing the effects of the addition of soybean oil and/or ethanolic extract of propolis in feeding dairy goats, found an increase in digestibility of CP and EE, animals that received soybean oil in the diet compared to control animals. Likewise, other authors (Yamamoto et al., 2005; Silva et al., 2007) to include different sources of fat in the diet of sheep and goats, reported that the

digestibility of EE was influenced by the addition of these sources, noting lowest digestibility for the control diet. Borja et al. (2010) used licuri pie at different levels (0, 15, 30 and 45% DM basis) in the diet of goats, and observed that the digestibility of EE increased linearly with the inclusion of the pie, probably due to the increasing percentage of EE in feed treatment contributing to improved nutrient digestion.

The digestibility of the CNF control diet did not differ ($P > 0.05$) compared to diets with licuri pie and inert fat, and these did not differ from supplemented with soybean oil residual. These data are in agreement with those found by Maia et al. (2006) evaluated the inclusion of oils in the feed sources Saanen goats, and found that this addition has reduced approximately 18% CNF digestion of these diets compared with the control.

In the Table 4 we present the results of DM and FDN (kg/day) and behavioral parameters: time of ingestion and rumination (minutes/day), (min/g DM) and (min/g FDN) and idle time (minutes/day) during 24 hours.

Table 4 - Feeding behavior in 24 hours of confined goats fed different lipid sources in feed

Parameters	Treatments ¹				EPM
	C	TL	OSR	GD	
MS intake (Kg/day)	1.37a	1.08a	1.19a	1.24a	0.11
FDN intake (Kg/day)	0.73a	0.63a	0.64a	0.67a	0.07
Ingestion (min/day)	224.20a	292.52a	225.03a	231.21a	18.38
min/g MS	0.23a	0.29a	0.20a	0.19a	0.03
min/g FDN	0.46a	0.50a	0.39a	0.37a	0.08
Rumination (min/day)	313.3b	459.6a	294.2b	318.3b	27.99
min/g MS	0.18a	0.19a	0.19a	0.17a	0.02
min/g FDN	0.50b	0.77a	0.52b	0.51 b	0.06
Leisure (min/day)	902.5a	687.9b	920.8a	890.4a	34.63

Medium in the line followed by different letters differ at 5% probability by Tukey test.

¹Treatments: C = control; TL = licuri pie; OSR = residual soybean oil; GD= inert fat
DM= dry material; FDN= neutral detergent fiber, min = Minute.

The CMS, CFDN and the time of intake did not differ ($P > 0.05$) between treatments. However, the animals fed diets containing licuri pie were higher ($P < 0.05$) rumination time, and because of this was recorded a lower ($P < 0.05$) leisure time to this feed.

The lack of effect of the addition of these lipid sources in the diet on some variables of feeding behavior, could be related in part to the absence of differences in DM and FDN of these diets (Table 4). Salla et al. (2003) working with Jersey cows in early lactation fed diets

with different fat sources (tallow, calcium salts of palm oil, and ground soybean), observed that there was no effect of treatments on DM and FDN or on the behavioral characteristics. Corroborating this data, Borja et al. (2009) evaluated the behavior of crossbred Holstein x Zebu cows fed with different inclusion levels of oil licuri in concentrate, on a DM basis, found that the oil content licuri did not influence feeding behavior and physiological parameters these animals.

Regarding the DFDN did not differ ($P > 0.05$) among diets, which shows that consumption in this experiment may have been set by the physical effect of the fiber, because the proportion of roughage used in feed caused the animals had an intake of suitable fiber. This can be seen when one observes that, even providing numerically lower dry matter intake, the animals fed the diet with pie licuri consumed the same amount of FDN that those subjected to other rations. This was due to the diet containing licuri pie present a higher FDN in its composition.

It was observed that the time spent on rumination differed ($P < 0.05$) between treatments, with the highest value observed in animals fed the diet containing licuri pie (459.5 min/day) compared to the control diets (313.3 min/day), soy oil, residual (294.1 min / day) and inert fat (318.3 min / day), respectively. The more time spent for rumination provided by the diet containing licuri pie may be due to quality and higher FDN, FDA and LDA, in its composition, since according to Van Soest (1994) the time spent on rumination is proportional cell wall content of the food, or the higher the fiber content of the feed the larger the ruminating time.

Carvalho et al. (2006) evaluated the effect of five levels FDN (20, 27, 34, 41 and 48%) in the diet of lactating Alpine goats, observed that the time spent eating and ruminating increased and decreased with idleness elevation of the FDN in the ration. The time spent ruminating in the animals fed 41% and 48% FDN in the ration was similar to rumination of animals fed diets containing licuri pie this experiment (Table 2). This may be related to the fact that the present rations similar fiber contents.

Furthermore, it was found that the idle time taken to differ ($P < 0.05$) between treatments with the lowest value observed in animals fed the diet containing licuri pie (686.6 min/day) diets compared control (898.3 min/day), soybean oil waste (916.6 min/day) inert fat (882.9 min/day). This result was expected, because the longer the time spent for rumination, the less time spent idle, then it can be inferred that the licuri pie by presenting a higher FDN and LDA when compared to other supplements, influenced the outcome of this parameter, since it contributed to an increased level of FDN and LDA in the diet, thereby providing a greater

retention time of digesta in the rumen and consequently greater rumination activity.

Regarding feeding time, there was a greater demand for animal food in the morning and afternoon, which corresponded to periods of supply of rations, there was less demand in the evening and night periods (Table 5). These observations confirm the stimulation of distribution of ration on feeding activity (Fischer et al., 1998).

Table 5 - Feeding behavior of goats per shift confined receiving different lipid sources in feed

Parameters (min/day)	Shifts				EPM
	Morning	Afternoon	Evening	Night	
Ingestion	69.6 b	105.5 a	43.1 c	25.0 d	3,93
Rumination	117.7 a	34.3 c	63.8 b	130.4 a	5.50
Leisure	172.7 c	220.2 b	253.1 a	204.6 b	6.93

Medium in the line followed by different letters differ at 5% probability by Tukey test.

A similar result was reported by Ribeiro et al. (2006), in research with goats Moxotó and Canindé in confinement, subjected to restricted feeding and ad libitum twice a day (8:15 hours). These authors observed that the demand for food by animals concentrated around the feeding schedules, between 8:09 am and 15 at 18 pm, also featuring two meals with less intensity in 22 hours and 24 hours and between 1 and 2 o'clock.

Likewise, Tavares et al. (2005) in an experiment with crossbred goats in Alpine, observed that the feeding activity peak reached in time supply of food at 8 am and remained relatively constant until the late afternoon and decreasing overnight. Souza et al. (2010), evaluating the behavior of goats and sheep fed hay or silage maniçoba, found that feeding time was corresponding to the feeding times (8 and 9 am and between 15 and 17h).

In relation to the time spent for rumination, shifts in the morning and dawn, were those with the highest frequency of this activity, being more intense in the graveyard shift (Table 5).

The period of reduced incidence of rumination was observed during the afternoon, especially in the time of feeding. Tavares et al. (2005) reported similar behavior for crossbred goats in Alpine, where it was observed that animals ruminating over during the night and early morning, with two moments of intense rumination, the first checked between 4am and 6am and the second, 20h at 22h. Souza et al. (2010) also observed in experiments with sheep and goats, the animals ruminating over during the night and morning, with two moments of rumination, the first between 2 and 5pm and the second between 20 and 24 hours.

In relation to the time spent for leisure activity, this behavior was more intense during the night. Similarly, Ribeiro et al. (2006), working with goats Moxotó and Canindé in confinement, found that this activity was most intense between the hours of 16:20 hours.

Conclusions

The use of licuri pie, soybean oil and residual inert fat lipid sources in diets for goats did not affect intake and digestibility of nutrients.

The inclusion of soybean oil and residual inert fat in the diet of male goats did not influence the activities of feeding behavior. However, the inclusion of licuri pie interfered on the behavior parameters, providing a longer rumination.

Acknowledgments

The Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for financing the project and the scholarship masters.

References

- ALLEN, M.S. Effects of diet on shortterm regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal Dairy of Science**, v.83, p.1598-1624, 2000.
- BORJA, M. S.; OLIVEIRA, R. L.; RIBEIRO, C. V. D. M.; BAGALDO A. R.; CARVALHO, G. G. P.; SILVA, T. M.; LIMA, L. S.; BARBOSA, L. P. Effects of Feeding Licury (*Syagrus coronate*) Cake to Growing Goats. **Asian-Aust. Journal Animal Science** v. 23, n°. 11 : 1436 – 1444, 2010.
- BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.; **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal : Funep, 538p, 2006.
- BORJA, M.S.; GARCEZ NETO, A.F.; OLIVEIRA, R.L.; LIMA, L.S.; BAGALDO, A.R.; BARBOSA, L.P.; FARIA, E.F.S. Óleo de licuri no concentrado administrado a vacas Holandesas X Zebu em, sobre o comportamento ingestivo e conforto térmico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.2, p.344-355, 2009.
- CARVALHO, S.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H.; RODRIGUES, C. A. F. Comportamento ingestivo de cabras Alpinas em lactação alimentadas com rações contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro proveniente da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.2, p.562-568, 2006.
- CHILLIARD, Y. et al. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal Dairy of Science**, v.86, p.1751-1770, 2003.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380p.
- JOHNSON, T.R., COMBS, D.K. 1991. Effects of prepartum diet, inert rumen bulk, and racion polyethylene glycol on dry matter intake of lactating dairy cows. **Journal Dairy of**

Science, 74(3):933-944.

LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; QUEIROZ, A.C.; RODRIGUES, M.T.; EIFERT, E.C.; MIRANDA, E.N.; ALMEIDA, I.C. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.650-658, 2005.

MAIA, F.J.; BRANCO, A.F.; MOURO, G.F. Inclusão de fontes de óleo na ração de cabras em lactação: digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais e sanguíneos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n. 4, p.1496-1503, 2006.

NATIONAL REQUIREMENT COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, DC:National Academy Press, 2001. 157, 381p.

NATIONAL REQUIREMENT COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**. National Academy of Science, Washintgton, D.C. 2007. 347p

PALMIQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídios. In: **Nutrição de Ruminantes**. 1. ed. Jaboticabal: Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires e Simone Gisele de Oliveira, cap. 10, p. 287-310, 2006.

PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Fat in lactation ration: Review. **Journal Dairy of Science**, v.63, n.1, p.1-14, 1980.

PIRES, A.V. & RIBEIRO, C.V.M. Aspectos da nutrição relacionados à reprodução. IN: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Ed. Funep, Jaboticabal-SP, 2006.

RIBEIRO, V.L.; BATISTA, A.M.V.; CARVALHO, F.F.R. et al. Comportamento ingestivo de caprinos Moxotó e Canindé submetidos à alimentação à vontade e restrita **Acta Scientarium Animal Sciences**, v.28, n.3, p.331-337, 2006.

SALLA, L.E., FISCHER, V., FERREIRA, E.X., MORENO, C.B., JUNIOR, W.S. e DUARTE, L.A. Comportamento ingestivo de vacas Jersey alimentadas com rações contendo diferentes fontes de gordura nos primeiros 100 dias de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32: 683-689, 2003.

SOUZA, E.J.O.de; GUIM, A.; BATISTA, A.M.V.; ALBUQUERQUE, D.B. de; MONTEIRO, C.C.F.; ZUMBA, E.R.F.; TORRES, T.R. Comportamento ingestivo e ingestão de água em caprinos e ovinos alimentados com feno e silagem de Maniçoba. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.4, p.1056-1067, 2010.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

- SOUZA, A.R.D.L.; MEDEIROS, S.R.; MORAIS, M.G.; OSHIRO, M.M.; JÚNIOR, R.A.A.T. Ração com alto teor de gordura e desempenho de tourinhos de grupos genéticos diferentes em confinamento. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, n.7, p.746-753, 2009.
- SILVA, M.M.C.; RODRIGUES, M.T.; RODRIGUES, C.A.F. et al. Efeito da suplementação de lipídios sobre a digestibilidade e os parâmetros da fermentação ruminal em cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.246-256, 2007.
- SNIFFEN, C.J.; CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluation of cattle diets. II Carbohydrate and protein availability. **Journal Animal Science**, v.70, n.3, p.3562-3577, 1992.
- YAMAMOTO, S.M.; MACEDO, F.A.F.; ZUNDT, M. Fontes de óleo vegetal na ração de cordeiros em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.703-710, 2005.
- TAVARES, A.M.A.; VÉRAS, A.S.C.; BATISTA, A.M.V. et al. Níveis crescentes de feno em rações à base de palma forrageira para caprinos em confinamento: Comportamento ingestivo. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.27, n.4, p.497-504, 2005.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- VARGAS, L.H.; LANA, R.P.; JHAM, G.N. et al. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.522-529, 2002.

4.2 Artigo 02 (à ser submetido para a revista *Reproduction, Fertility and Development*)

The effect of lipid inclusion in the diet and in the goat's fresh semen about a potential fertilize of a thawed sperm

Elenice Andrade Moraes¹, Wilson Duarte Ferrari Junior¹, Mário Adriano Ávila Queiroz¹, Bruno Golçalves da Silva¹, Laicia Rios Lima¹, Wasley Carlos Gonçalves de Matos¹, Carina Silva de Oliveira¹

¹Federal University of Vale do São Francisco (UNIVASF), Rodovia BR 407, Km 12 Lote 543 Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N C1, Petrolina, PE 56300-000, BRAZIL. E-mail: elenice.moraes@univasf.edu.br

Abstract

Cryopreservation promotes damage to the membrane of the sperm, minimizing their quality pos thawing. During this process, sperm cells undergo intracellular and extracellular stress, promoting membrane destabilization, which allows the formation of an intracellular ice, resulting in the death of the cell. The addition of the lipid in the sperm membrane, before it is frozen and chilled, can alleviate its stress, improving the quality of a post thawing sperm. The objective was to evaluate the inclusion of inert fat source in the diet and in the goat's fresh semen about a potential fertilize of a thawed sperm. It was utilized eight male goats without a defined bred, not registered; they were confined in individual stalls with water *ad libitum*, elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum) and a daily concentrated supplement. The animals were distributed in a entirely randomized delimitation, in a 2 x 4 factorial arrangements, with two energy sources (corn and inert fat) and four levels of cholesterol in addition of cyclodextrin (CCC) in the semen (0; 0,5; 0,75 and 1,5 mg CCC/120 millions of sperm/mL). There was no interaction between the types of experimental ration (control and inert fat) and concentrations of cholesterol in the semen before cryopreservation ($P>0,05$). Sample of animal's semen in the control group did not differ in the total and progressive motility, sperm viability and the connection test between those treated with inert fat ($P>0,05$), just as it did not differ from the concentration of CCC ($P>0,05$). In conclusion, the addition of cholesterol in the semen before freezing and the supply of inert fat in the goat's ration did not influence the rates of motility, viability and the number of sperms connected to the egg yolk's perivitelline membrane after thawing.

Key Words: Cholesterol, cryopreservation, inert fat, motility, connectivity test.

Introduction

The cryopreservation of the semen is used in genetic improvement programs and it contributes to the preservation of the animal's high genetic value and it can be used in cases where the artificial insemination should be held in places of difficult access from the artificial insemination centers.

However, the process of cryopreservation promotes the destabilization of the sperm membrane manifested in different ways, either by intracellular ice formation, osmotic capacity change, or lysis by expansion, having as a consequence death of the cell (Steponkus et al., 1983; Mazur, 1984). The destabilization occurs when the membrane passes through the membrane transition phase, the fluid phase to the gel phase, with a decreasing temperature. As the temperature decreases, the proteins aggregate along the membrane, promoting an increase in its permeability and the reduction of the metabolic activity of the sperm. The damages of this transition phase are often irreversible and are known as heat shock (Holt & North, 1984; Amann & Pickett, 1987; Amann & Graham, 1993). The heat shock leads to an alteration in the sperm, such as: increasing the closed circular motion, the accelerated loss of motility, damages to the acrosome and plasmatic membrane, decreased production of energy, loss of molecules and ions (Graham, 1996). In general, the losses suffered by the membrane plasma during the process of cryopreservation are attributed to the cell dehydration and formation of ice crystals (Parks & Graham, 1992).

However, the destabilization of the membrane can be alleviated with the addition of lipids in the spermatid membrane before it is chilled and frozen, minimizing the damages caused by heat shock. (Watson, 1981; Hammerstedt et al., 1990; He et al., 2001).

The addition of cholesterol in liposome reduces the temperature of the transition phase and if the cholesterol is sufficiently added, this phase is eliminated, contributing to a better quality of cryopreserved semen (Ladbrooke et al., 1968).

Thus, the incorporation and removal of cholesterol in the cell membranes has been reported for several cell types (Kilsdonk et al, 1995; Yancey et al., 1996; Christian et al, 1997), including sperms (Choi & Toyoda, 1998; Cross, 1999; Iborra et al., 2000; Purdy & Graham, 2004a; Moore et al., 2005; Mocé & Graham, 2006). In particular, the cyclodextrin (heptasaccharid cyclic that consists in β (1–4) units of glucopyranose), that has a hydrophobic core, effectively removes cholesterol from spermatid membrane, inducing sperm capacitation. The cyclodextrin can alter the cholesterol content of the membrane cell (Christian et al., 1997;

Visconti et al., 1999), and if they are pre-loaded with cholesterol they add cholesterol into the membranes (Purdy & Graham, 2004). If the sperm of stallions (Combes et al., 2000; Moore et al., 2005; Sipizziri et al., 2010), bovines (Purdy & Graham, 2004a; Mocé & Graham, 2006; Amorim et al., 2009), or rams (Mocé et al., 2010) are treated with cyclodextrin loaded with cholesterol (CCC) before freezing, the sperms shows higher rates of survivor after cryopreservation than the semen of those untreated.

The influence on the levels of lipids in the ration on reproductive functions are not yet completely understood, but it is known that increasing the energetic density on the ration, it occurs an increase of cholesterol levels in the bloodstream and this is the course for steroid hormone synthesis, important for the process of sexual maturation and spermatogenesis (Sartori & Mollo, 2007).

Currently there are several studies showing the influence of lipids inclusion on the quality of the sperm in different species, or with inclusion in the ration of animals, as already described for cockerels (Zanine et al., 2003; Rodenas et al. 2005), rabbits (Andreazzi et al., 2004), and pigs (Oliveira et al., 2006), or with the addition in the ejaculation of asinine (Rates, 2011) bovines (Purdy & Graham, 2004a; Amorim et al., 2009; Moraes et al., 2010), horses (Moore et al., 2005; Amorim , 2008; Sipizziri et al., 2010), and rams (Mocè et al., 2010).

Current studies about cryopreservation, aim the utilization of protocols that reduces the sperm deaths during their freezing and the damages caused to the survivors, the objective is to evaluate the inclusion of inert fat in the diet and in the goat's fresh semen about a potential fertilize of a thawed sperm.

Methods and Materials

Ethics

The present study was conducted after the unconstitutional approval of the Federal University of Vale do São Francisco (Univasf), being all the experimental protocol was conducted in accordance with the Ethical Principles of animal experimentation adopted by the Committee of Ethics in the use of animals from that institution under the number of 27091063.

Chemical Reagents

All the chemical reagents used in this study were acquired from sigma-Aldrich of Brazil (São Paulo, SP, Brasil) with the exception of SYBR-14/PI (LIVE/DEAD Sperm Viability®, Molecular Probes, Eugene, OR).

Cholesterol Preparation

Methyl- β -cyclodextrin was loaded with cholesterol as described by Purdy and Graham (2004a). Briefly, 200 mg of cholesterol (C-3045) were dissolved in 1 ml of chloroform. In a beaker were dissolved 1 g of methyl- β -cyclodextrin (C-4555) in 2 mL of methanol. Then, an aliquot of 0,45 mL cholesterol solution was added to the cyclodextrin solution, and stirred until the combination of the solutions became clear. After the mixture was placed in a petri dish and the solvents were removed using a stream of nitrogen gas with a minimum purity of 90%. The resulting crystals were placed on a heating plate to dry for 24 hours, after this time, the plate was then removed and stored in 22°C glass tubes. The job of the cholesterol solution was carried by cyclodextrin (CCC) and was prepared by adding 50 mg of CCC in 1 mL of B-TALP (Graham et al., 1986) a 37 °C and homogenized by agitation with the aid of a tube shaker.

Preparation of diluents

The solution of egg yolk TRIS consisted of 3,62 g from Tris, 0,50 g fructose, 1,99 g citric acid, 0,006g penicillin G, 2,5% egg yolk, 2% de glycerol in 100 mL of distilled water (Evans e Maxwell, 1987).

For the diluents preparation B-TALP, was used 0,569 g of NaCl, 0,023 g of KCl, 0,004 g of KH_2PO_4 , 0,209 g of NaCO_3 , 0,025 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,008 g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0022g of sodium pyruvate, 0,368 ml of sodium lactate, 0,09 g of glyucose, 0,238 g of HEPES, 0,30 g bovine albumin serum, for 100 ml of water Mili Q (Graham et al. 1986).

Animals and Managements

It was used eight male reproducer goats without a standard defined race (SPRD), of proven fertility, aged between 12 and 24 months. They were confined in individual stalls with water *ad libitum*, elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum) and a daily concentrated supplement, according to the demands established by NRC (2007).

The animals were distributed in a entirely randomized delimitation, in a factorial arrangements 2 x 4, with two types of rations (control n=4 and inert fat n=4) and four concentration of cholesterol in the semen of each animal (0; 0,5; 0,75 and 1,5 mg). The

animals received the rations (Table 1) during a period of 80 days of adaptations so the spermatogenic cycle of this specie were under the effect.

Collection, processing, and cryopreservation of the semen

The methodologies used in semen samples were performed in groups of animals that received the experimental rations with or without inert fat, having in each group four reproducers.

It was collected five ejaculates per animal, in a total of 40 ejaculates, from each experimental group that received the rations. Samples were collected by the artificial vagina method, using a female mannequin. The ejaculate was stored in a graduated tube, protected from sunlight with a laminate paper and packed inside a Styrofoam container, with the objective to maintain the temperature on 37°C during the collection. Immediately after the collection, a physical examination of the semen was performed, as: volume, color, turbulence, total and progressive motility and determination of spermatic concentration.

The ejaculation volume was determined using a pipettor to determine with greater precision.

The turbulence, using a scale from 0 to 5 was evaluated by the deposition of a drop of semen in the blade and it was observed in a microscopic objective in an increase of 20x (CBRA, 1998).

The total and progressive motility were determined through a computerize analyzes (CASA, Sperm vision[®], Minitube, Brasil) and just the ejaculated sperm containing a motility greater than 70% were used. To evaluate the motility, 10 µl of semen each ejaculation was placed between a blade and a cover slip preheated to 37 °C and then evaluated.

The concentration was determined using a photometer (SDM6[®] Minitube, Brazil) and a 546 nm filter to determine the spermatic density based on the opacity of the ejaculation. To analyze, 8 µL of fresh semen sample were withdrawn and placed in microcurvet, which contained 4ml of NaCl 0,9%, and the count performed by the number of cells per unit volume estimated by the opacity of the ejaculate, which was measured by the percentage of transmission and absorbance of the sample.

After the physical exam the fresh semen diluted in 3 mL of TRIS in a graduate falcon tube, homogenized and centrifugated at 800 G per 7 minutes (Mook e Wildeus, 2008). After centrifugation, the supernatant was discarded and the sperm pellet (sptz) was resuspended with 1 mL of TRIS, then determined a concentration of ejaculate for the division of aliquots and inclusion of cholesterol concentration: Control; 0,5 ; 0,75 and 1,5 mg of CCC in 120 x

10^6 spz/mL. The treated samples were exposed at room temperature for 15 minutes. Then, they were placed under refrigeration at 5°C in a plastic container for two hours with the diluents TRIS and the pallets. After this period the samples were filled in pallets of 0,5 mL, French model, to a final concentration of 120 million sperms/mL. Then, the pallets were arranged horizontally on a freezing ramp for 7 minutes in vapor of N₂ liquid 4 cm from its surface, using a Styrofoam box. Finally, immersed directly in N₂ liquid and stored in cryogenic tank until analysis.

Thawing of Samples

The pallets containing samples of each treatment were thawed in a water bath at a 37°C during 30 seconds, and then determined the total and progressive motility, sperm viability and a binding test were performed to the membrane of the egg yolk (MPV).

Sperm Evaluation

Total and progressive motility

The cryopreserved sperm samples after the determination of the total and progressive motility were analyzed after 10 minutes using CASA software Spermvision[®] (Minitube, BRAZIL).

The total and progressive motility, expressed a percentages, were determined in a total of 2000 cells using at least five are as (fields) of slide.

Sperm viability

After thawing the sperm were diluted in the ratio of 1:1 with diluents B-TALP (Graham, et al.,1986) and after the homogenization a 100 µL aliquot was withdraw and it was added in an eppendorf tube containing 2,5 µL of dye solution SYBR-14 and propidium iodide (PI) (LIVE/DEAD Sperm Viability[®] - Molecular probes) also, previously thawed in a warm water at 37°C during 60 seconds. The fluorescent cells were measured using a filter to detect the dye SYBR-14 and to detect PI. Using this protocol, all cells were stained with SYBR-14, they were distinguished from egg yolk particles, and only non-viable cells were stained with PI, after the incubations of the samples at room temperature for 15 minutes

A 8µL sperm aliquot of each sample were placed on a pre-heated blade of 37 °C and a minimum of 100 cells per sample were analyzed, for the evaluation of membrane integrity

using a epifluorescence microscope (Zeiss® Axioimage 2). Sperm cells with complete membrane showed a green coloring while damaged membrane cells showed a red coloration.

Binding test using an egg yolk's perivitelline membrane (MPV)

Sperm Preparation

After thawing the sample was suspended in 1 mL of B-TALP containing 35 µg of Hoechst 33342 (B-2261) incubated for 15 minutes at 37 °C, and then resuspended to a final concentration of 2×10^6 sperms/mL in B-TALP.

MPV preparation and binding test

The ability of the goat sperm to bind to oocytes membrane was performed using the perivitelline membrane of a chicken egg yolk, as described by Barbato et al. (1998) and modified as follows. The perivitelline membranes (MPVs) were prepared by separating the clear egg yolk and the excess removal using a paper towel. The intact egg yolk was placed in a piece of parafilm, the membrane of the yolk was ruptured and the yolk was gently washed with B-TALP maintaining the membrane in the parafilm. The membrane was then removed from the parafilm and placed in a glass Petri dish then washed several times with B-TALP until the solution was clear and without any residue from the egg yolk. The MPV was gently opened and cut into small squares (1x1 cm), using a spectrophotometer curvet. Each MPV square was placed in test tubes (10x100x0,6 mm) containing 1 mL of TALP. Two MPV were used as replicates for each treatment.

Aliquots of 25 µl sperm solution stained with Hoechst 33342 were added to each tube containing the MPV.

The membranes and the sperms were incubated for 2 hours, at 37 °C in an atmosphere of 5% of CO₂ in the air, the tubes were gently agitated every 30 minutes to keep the membrane open. After incubation, each membrane was placed in another tube containing 1 mL of B-TALP and washed 5 times to remove the sperms that did not bind. Each MPV square was placed on a blade, to gently open and remove any crease, covered with a cover slip and examined using a fluorescence microscope with an increase of 400x. The number of sperm bind to the membrane, counted in six random fields for each piece of MPV, was determined by the relative number of sperm membrane for each treatment was calculated by dividing the total number of sperm bind to that particular MPV by the number of sperm bind to the same

control group. The average for the two replicates for the membranes was determined for each treatment.

The analysis was performed with the utilization of the program SAS 9.2. The variables were subjected to analysis of variance and to the Turkey test for comparison of averages between sources of ration and between cholesterol levels used, with level of significance of 5%. When there was interaction it was determined the effect of cholesterol level within each source.

Results

There was no interaction between the types of experimental ration (control and inert fat) and the concentrations of cholesterol in the semen before cryopreservation ($P>0,05$). Thus, it was evaluated separately for the experimental rations and concentrations of CCC added in the fresh semen.

The mean values observed are similar to the normality standard considered for species (CBRA, 1998).

After thawing, the total and progressive motility of animal's sperm treated with rations containing control and inert fat was 32,30 e 25, 24%, respectively. Samples of animal's semen of the control group did not differ in the total and progressive motility of those treated with inert fat in the ration ($P>0,05$). Likewise, it did not differ ($P>0,05$) as a function of the CCC concentrations (Table 2).

The semen samples of animals treated or not with ration containing inert fat or subjected to different concentrations of cholesterol, did not differ as a sperm viability ($P>0,05$; Table 2).

Samples of semen from the control group did not differ as the number of sperm bind to MPV(Figure 1) from those treated with inert fat in the ration ($P>0,05$).

After cryopreservation the percentages of the total and progressive motility of sperm bind to MPVs were similar to untreated sperm (69 sptz) and treated with 0,5 mg (68 sptz), 0,75 mg (75 sptz), 1,5 mg (57 sptz) (Table 3).

Discussion

The cryopreservation process decreases the quality of sperm after thawing (Moore et al., 2005). During this process, sperms undergo intracellular and extracellular stress, promoting destabilization of the membrane (osmotic modifications, lipid-protein organization

in the membrane) this allows the formation of intracellular ice, resulting in death of the cell (Steponkus et al., 1983; Mazur, 1984).

Destabilization occurs when the membrane passes through the transition phase, the fluid phase to gel phase, with decreasing temperature and it can be attenuated with the addition of lipids in the membrane before cooling and freezing. (Watson, 1981; Hammerstedt et al., 1990; He et al., 2001). The effect of adding cholesterol in the sperm membrane appears to be the in the reduction of temperature for the transition phase. (Purdy & Graham, 2004b). During this process, there is a loss of phospholipids, increase membrane permeability, membrane ruptures and cellular death (Moore et al., 2005). The sufficient addition of cholesterol can eliminate the transition phase, through the inhibition of crystallization in the hydrocarbon chains, reducing the damages caused to the membrane and making the lipids remain in a liquid state even with a temperature reduction (Purdy & Graham, 2004a).

In the present study, there was no effect ($P>0,05$) of rations nor the levels of CCC on parameters of total and progressive motility for thawed sperms (Table 2). This corroborates with the results found by Oliveira et al. (2010), that after cryopreservation of stallion's semen they did not observed the difference between the group treated with CCC ($1,5 \text{ mg}/120 \times 10^6 \text{ spz/mL}$) and the control group in the evaluation of progressive motility (CLC - $20,4 \pm 13,7\%$ e CT- $20,0 \pm 10,0\%$).

Lipid sources did not influence ($P>0,05$) the parameters of total and progressive motility of goat's sperm after cryopreservation. Corroborating with these data, Andreazzi et al. (2004) adding different lipid supplements in the ration of rabbits (canola oil, corn or soy) did not observed the effect on the progressive motility of the sperm. Similarly, Rodenas et al.(2005), in studies with cockerels breeders with bloodline Lohmann- LSL, evaluated the effect of providing three types of oil(Soy, Canola and Sunflower oil), and two levels of vitamin E (200 and 400 mg/kg of ration) in the ration of these animals, on the reproductive parameters, and reported that lipid supplementation did not influence in the total motility of sperms of this species.

Evaluating the effect of cholesterol incorporation to the bovine sperms membrane Purdy & Graham (2004a) they incubated semen with various concentration of CCC (0,75, 1,5, 3,0, 4,5, 6,0 e 7,5 mg/mL of semen) and observed that the addition of 1,5 mg/mL, before freezing, resulting in a higher percentage of motility after thawing (60% vs 42%) the samples that were added cholesterol compared to those without addition. The samples incubated with 1,5, 3,0 and 4,5 mg/mL showed higher percentage of viable cells (55, 60 and 57%), while the samples without CCC showed an equal value of 46%, after thawing. Similar results were

reported by Moore et al. (2005) that working with semen from stallions with proven low cryoresistance, observed a high percentage of motility (67% vs 50%) for semen treated with 1,5 mg of CCC before freezing in comparison to the control.

Cyclodextrin is a cyclic oligosaccharide produced by the degradation of starch which, when complexed to cholesterol, has the ability to incorporate into the plasma membrane, forming a new supply of this steroid in the aqueous phase. On the other hand, the use of cyclodextrin alone causes removal of cholesterol from the membrane, inducing sperm capacitation (Purdy & Graham, 2004a).

Combes et al. (2000), Amorim et al., (2009) and Mocé et al. (2010) by working with stallions, bulls and sheep, respectively, reported an increase in sperm motility after sperm cryopreservation with addition of CCC. This is probably due to improve stability of plasmatic membrane, at low temperatures, while the addition of cholesterol.

Barrera-compean et al. (2005) after cryopreservation of goat's sperm, they evaluated different concentration of CCC (0; 1,5; 2,0; 2,5 and 3 mg/240 x 10⁶ sperm) they found total sperm motility of 42, 46, 50, 52 e 50%, respectively. The motility results obtained in this study were lower than those reported by the authors cited above. Probably, this variation is attributed to differences in the fertilization ability between individuals, because they are animals without a defined racial standard, when compared to other studies that used a high breeding with genetic potential. These authors observed a decrease in motility parameters by adding 3mg of CCC. According to Purdy & Graham (2004), the upper limit of CCC addition for bovine is 6mg/120 x 10⁶ of sperm cells, from this amount the effect becomes negative for sperm survival, affecting membrane function.

We did not observe any effect on ration and levels of CCC on the viability of sperm cells ($P>0,05$). Mocé & Graham (2006) observed improvement in the percentages of sperm viability and motility of bovine semen after thawing using 2mg/mL of CCC. Although the role of cholesterol is not yet entirely clear, the authors argue that the addition of this steroid increases the cholesterol phospholipids relation to values similar to those observed in species resistant to cold shock, like rabbits (0,88) and humans (0,99).

Corroborating with the above data, Amorim et al. (2009) using cholesterol or cholesterol conjugates and incubating bovine semen for 15 minutes at 22°C before freezing and was found a high percentage of sperm motility and viability in comparison to the control with added de 1,5 e 0,75 mg/mL of CCC conjugated with pelargonate after thawing.

In the present study, the binding assay MPV proved that cryopreserved goat's sperm can bind to MPV, indicating that it has a similar receptor as the caprine species. This is

confirmed by most species of mammals that have glycoprotein in the pellucid zone similar to the perivitelline membrane of chicken egg yolk (Barbato et al., 1998). The pellucid zone is a species-specific receptor capacitated sperm and induces the acrosome reaction, eliminates the specificity of species for the sperm and the pellucid zone interaction. *In vitro* assays with denude oocytes was possible to observe the binding of heterologous (Sinowatz et al., 2003), which allows one to predict efficacy testing for the quality of sperm.

Although this experiment was not evaluated, previous data suggested that sperm linked to ZP will undergo acrosome reaction, being able to penetrate (Sinowatz et al., 2003).

Biochemical events related to fertilization and fertilizing capacity are difficult to measure using basic techniques of semen analysis. Thus, the tests can be used to bond and penetrate the pellucid zone as a technical assessment potential for capacitation and acrosome reaction of the sperm (Amorim et al., 2009). The sperm binding test *in vitro* and oocytes, are affected by many variables, such as the natural variability between oocytes of the donor conditions, laboratory condition, being necessary a large number of oocytes to conduct evaluations. The MPV may be the most appropriate alternative, since it shows behavior similar to the binding assay to the oocyte of goats, besides eliminating some variables, among them the natural variation between oocytes, because a single yolk can be fragmented to be used for different doses, evaluating more than one individual or treatment. The binding assay MPV stills represent a better logistics, it is much easier to acquire membranes of chicken egg than it is to get oocytes of goat (Santos, 2010). The membrane binding test to perivitellinic egg yolk, being a quick and simple technique can be used to identify the male sub fertility (Barbato et al., 1998).

We did not observe any effect ($P>0,05$) in the ration nor the levels of addition of CCC, on the number of cells linked to MPV. This may be related to the absence of difference in progressive motility and viability among the groups, and possibly with the same conditions of fertilization. Amorim et al. (2009) to work in conjunction with cholesterol or the cholesterol in bovine semen, it was observed a high percentage of motility, sperm viability and the number of sperm linked to MPV in comparison with the addition control of 1,5 mg/ml of CCC after thawing. Similarly, Sipizirri et al., (2010), working with added equine cholesterol, found a high percentages of motility and number of sperm bind to oocytes ZP, for treated semen compared to those untreated.

During cryopreservation occurs a significant amount of cholesterol loss in the membrane, and that is pointed as one of the main causes of premature capacitation, which causes the cryopreserved sperm to maintain a lower viability in the female tract when

compared to fresh semen (Cerolini et al., 2001; Moore et al., 2005). Studies show that the addition of cholesterol to the membrane prevents this loss during cryopreservation (Moore et al., 2005). However, cholesterol excess can affect the occurrence of acrosome capacitation and reaction (Purdy & Graham, 2004b).

More studies need to be conducted to evaluate the effect of RACE vs. SPRD, level of inert fat as the levels lower than 1,0 mg of cholesterol to determine a concentration, which is effective to provide an improvement in sperm quality in goats, after cryopreservation.

Conclusion

The supply of inert fat in the ration, and the addition of cholesterol in the semen before freezing did not influence rates of motility, viability and the number of sperm bind to MPV after thawing.

References

- Amorim, E. A. M.; Graham, J. K.; Spizirri, B.; Meyers, M.; Torres, C. A. A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.58, n.2, p.201-214, 2009.
- Andreazzi, M.A. **Evaluation of semen quality and levels of testosterone serum in rabbits fed with ration containing different sources of vegetable oils**. Maringá, PR: Universidade Estadual de Maringá – UEM, 2002. Thesis (D) – Universidade Estadual de Maringá, 2002.
- Barbato, G.F.; Cramer, P.G.; Hammerstedt, R.H. A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.58, p.686-699, 1998.
- Barrera-Compean, M. H.; Purdy, P. H.; Dzakuma, J. M.; Newton, G.R.; Nuti, L. C. Cholesterol-loaded cyclodextrins improves post-thaw goat sperm motility. **Journal of Animal Science**, v. 83(Suppl.1):153, 2005.
- Cerolini, S.; MalDjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**. 121(3):395-401, 2001.
- Christian, A.E.; Haynes, M.P.;Phillips, M.C.; Rothblat, G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **J Lipid Res.**, v.38, p.2264–2272, 1997.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA. **Manual for breeding and andrologic exam of animal semen**. 2.ed. Belo Horizonte, MG:1998. 31p.(Manual).
- Combes, G.B.; Varner, D.D.; Schroeder, F.; Burghardt, R.C.; Blanchard, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.56, p.127–132, 2000.
- Cross, N.L. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. **Mol Reprod Dev.**, v.53, p.92–98, 1999.
- Evans, G.; Maxwell, W. M. C. **Salomon's artificial insemination of sheep and goats, butter worths**, Wellington, New Zeland. 1987.

- Graham, J.K., Foote, R.H., Parrish, J.J. Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull sperm into zona-free hamster eggs, **Biol. Reprod.** 35 413–424, 1986.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolas, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.
- He, L., Bailey, J.L., Buhr, M.M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential, **Biol. Reprod.**, v.64, p.69–79, 2001.
- Ladbrooke, B.D., Williams, R.M., Chapman, D. Studies on lecithin–cholesterol–water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction, **Biochim. Biophys. Acta**, v.150, p.333–340, 1968.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American J Physiol.** 247(3 Pt 1):C125- 42, 1984.
- Mocé, E., Purdy, P. H., Graham, J. K. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 118, p. 236-247, 2010.
- Mocé, E., Graham, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival **J. Anim. Sci.**, v.84, p.826–833, 2006.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241–249, 2005.
- Mook, J. L.; Wildeus, S. Effect of egg yolk level, washing and extended pre-freeze equilibration on postthaw motility of buck semen. **Southern section American Society of Animal Science annual Meeting**. Dallas, TX, 2008.
- National Requirement Council - NRC. **Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids**. National Academy of Science, Washington, D.C. 2007. 347p.
- Purdy, P.H.; Graham, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.48, p.36-45, 2004a.
- Purdy, P.H., Graham, J.K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. **Biol. Reprod.**, v.71, p.522-527, 2004b.
- Rodenas, C.E.O.; Murgas, L.D.S.; Maciel, M.P. et al. Seminal Characteristics of cockerels fed with supplemented ration with different oils and levels of vitamin E. **Cienc. Agrotec.**, v.29, p.160-167, 2005.
- Sartori, R.; Mollo, M.R. Influence of food intake on the reproductive physiology of the female bovine. **Brazilian Magazine of Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.197-204, abr./jun. 2007.
- Sinowatz, F.; Wessa, E.; Neumuller, C.; Palma, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. **Reprod Domest Anim.** 38(2):141-146, 2003.
- Spizziri, B. E., Fox, M. H., Bruemmer, J. E., Squires, E. L., Graham, J. K. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. **An. Reprod. Sci.**, v. 118, p.255-264, 2010.
- Steponkus, P.L.; Dowgert, M.F.; Gordon-kamm, W.J. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during freeze–thaw cycle: the influence of cold acclimation, **Cryobiology**, v.20, p.448–465, 1983.
- Visconti, P.E.; Galantino-homer, H.; Ning, X.; Moore, G.D.; Valenzuela, J.P.; Jorgez, C.J. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.3235–42, 1999.
- Zanini, S. F.; Torres, C.A.A; Bragagnolo, N. et al. Source of oil and vitamin E levels on the productive performance of cockerels. **Brazilian Magazine of Poultry Science**, Campinas, n. 5, p. 71, 2003.

Table 1 – Percentage and chemical composition of experimental diets

¹ Composition in Kg:70g of P; 200g Ca; 5000mg of Mg; 10g of S; 100g of Na; 340mg of Fe; 440mg of Cu; 3010mg of Zn; 1480mg of Mn; 48mg of I; 25mg of Co; 20mg of Se; max. of 700mg; 6 mg of Cr; 250.000 UI of vitamin A; 40.000 UI of vitamin D3; 350 UI of vitamin E. ² Types of ration:C= control ; IF= inert fat

Ingredients %MS	Ration ²	
	C	IF
Ground corn grain	28,00	25,10
Soybean	20,90	21,60
Inert Fat (Megalac E [®])	—	2,30
Vitamin and mineral mixture ¹	1,10	1,00
Elephant Grass	50,00	50,00
TOTAL	100,00	100,00
Nutrients %MS	C	GD
Mineral matter (MM)	9,52	8,42
Gross Protein (GP)	16,55	17,62
Ether extract (EE)	3,32	4,94
Neutral detergent fiber (NDF)	48,72	45,12
Acid detergent fiber (ADF)	27,70	25,32
Acid detergent lignin (ADL)	9,52	10,73
Carbohydrate non fibrous (CNF)	24,00	25,92
Total digestible nutrients (TDN)	82,62	86,83

Table 2. Total progressive motility and viability of sperm, goats treated or not with inert fat in the ration, subjected to different concentrations of cholesterol in semen before cryopreservation

There was no difference between averages by Tukey test ($P>0,05$)

IF=Inert fat

Ration	Cholesterol concentration (mg/120 x 10 ⁶ spz/mL)					CV(%)
	0	0,5	0,75	1,5	Average	
Total Motility						
Control	28	31	32	29	30	
IF	36	28	36	29	32	
Average	32	29	34	29		40,19
Progressive Motility						
Control	22	25	25	23	24	
IF	29	22	29	22	25	
Average	25	23	27	22		47,69
Viability						
Control	28	34	29	24	29	
IF	36	26	33	26	31	
Average	32	30	31	25		47,69

Table 3. Number of sperm, of goats treated or not with inert fat in the ration, subjected to different concentrations of cholesterol, in the fresh semen before cryopreservation, linked to MPV

There was no difference between averages by Tukey test ($P > 0,05$)
IF=Inert fat

Ration	Cholesterol concentration (mg/120 x 10 ⁶ spz/mL)				Average	CV(%)
	0	0,5	0,75	1,5		
Binding test						
Control	64	75	71	62	68	
IF	74	62	79	53	67	
Average	69	68	75	57		40,60

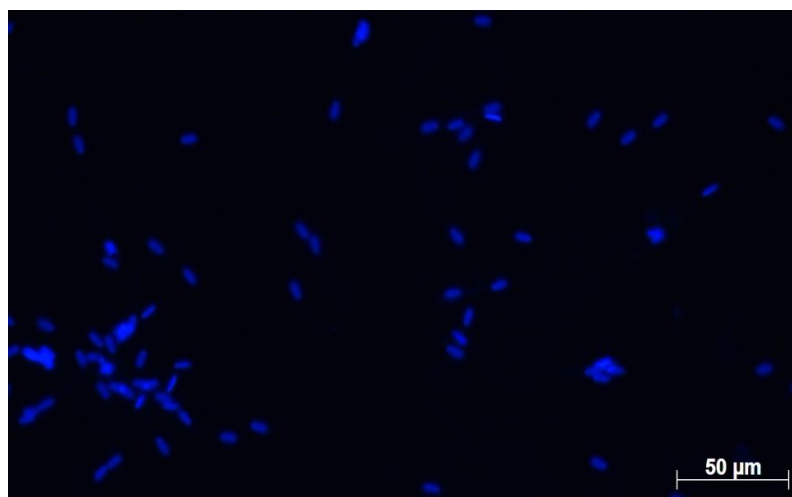


Figure 1 – Sperm treated with CCC linked to MPV.

5. CONCLUSÃO GERAL

A adição de diferentes fontes lipídicas na ração de caprinos não influenciou o consumo e a digestibilidade dos nutrientes.

O fornecimento de diferentes fontes lipídicas, como óleo de soja residual e gordura inerte na ração de caprinos não alteraram o comportamento ingestivo.

A inclusão da torta de licuri aumentou o tempo despendido na ruminação.

O fornecimento de gordura inerte na ração e a adição de colesterol no sêmen antes do congelamento de caprinos não promoveu melhoria do potencial fertilizante dos espermatozoídes.

6. ANEXOS

Preparo dos diluentes

1. TRIS 2% de Glicerol (Diluyente TRIS)

TRIS	100 mL
Trizma	3,62 g
Frutose	0,5 g
Ácido cítrico	1,99 g
Penicilina G	0,006 g
Gema de ovo	2,5 %
Glicerol	2,0 %
pH (6,8-7,2)	

1.2 Bull Media – TALP (Diluyente B-TALP)

Bull Talp	Quantidade em 100 mL
<u>Tyrodes</u>	
NaCl	0.569 g
KCl	0.023 g
KH ₂ PO ₄	0.004 g
NaHCO ₃	0.209 g
*CaCl ₂ .2H ₂ O	0.025 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.008 g
<u>Talp</u>	
Na Pyruvate	0.0022 g
Na Lactate	0.368 mL
Glucose	0.090 g
HEPES	0.238 g
BSA	0.300 g
Osmolaridade (300-310 mOsm) e pH (7.2-7.4)	

*Adicionar por último

Estatística experimental

Arquivo analisado:

G:\tabelas consumo.dbf

Variável analisada: CONSUMO_%P

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.078019	0.359340	0.967	0.4402
erro	12	4.460875	0.371740		
Total corrigido	15	5.538894			
CV (%) =	19.30				
Média geral:	3.1593750	Número de observações:		16	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 1,28042960552976 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4

Erro padrão: 0,304852252465573

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	2.740000	a1
3	3.177500	a1
1	3.280000	a1
0	3.440000	a1

Variável analisada: CONSUMO_MS

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	267754.419819	89251.473273	0.492	0.6947
erro	12	2178495.951925	181541.329327		

Total corrigido 15 2446250.371744

 CV (%) = 30.45
 Média geral: 1399.4768750 Número de observações: 16

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 894,796051195174 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 213,038335357209

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	1218.717500	a1
1	1356.657500	a1
3	1450.285000	a1
0	1572.247500	a1

 Variável analisada: CONSUMO_DE

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	7408.750000	2469.583333	0.625	0.6123
erro	12	47395.000000	3949.583333		
Total corrigido	15	54803.750000			
CV (%) =	30.31				
Média geral:	207.3750000		Número de observações:	16	

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 131,981160883216 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 31,4228552702222

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	183.500000	a1
1	189.500000	a1

3 221.500000 a1
 0 235.000000 a1

Variável analisada: CONS_DE_FD

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	72023.187500	24007.729167	0.405	0.7520
erro	12	711053.750000	59254.479167		
Total corrigido	15	783076.937500			
CV (%) =	29.90				
Média geral:	814.0625000	Número de observações:		16	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 511,207122165233 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 121,711214732524

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	704.000000 a1	
3	826.000000 a1	
1	841.500000 a1	
0	884.750000 a1	

Variável analisada: CONS_DE_EE

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	129.500000	43.166667	0.321	0.8099
erro	12	1612.500000	134.375000		
Total corrigido	15	1742.000000			
CV (%) =	28.62				
Média geral:	40.5000000	Número de observações:		16	

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 24,3442019371376 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 5,79601155968481

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	36.000000	a1
0	40.250000	a1
1	42.250000	a1
3	43.500000	a1

Variável analisada: CONS_DE_CN

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	27903.687500	9301.229167	1.570	0.2478
erro	12	71082.250000	5923.520833		
Total corrigido	15	98985.937500			
CV (%) =	31.86				
Média geral:	241.5625000	Número de observações:	16		

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 161,631596762706 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 38,4822063859823

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	199.000000	a1
2	207.750000	a1
3	256.250000	a1
0	303.250000	a1

Variável analisada: CONS_DE_ND

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	378006.500000	126002.166667	0.836	0.4999
erro	12	1809716.500000	150809.708333		
Total corrigido	15	2187723.000000			
CV (%) =	35.28				
Média geral:	1100.7500000	Número de observações:		16	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 815,550678281409 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 194,171128346449

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	926.250000	a1
1	974.000000	a1
3	1215.250000	a1
0	1287.500000	a1

Arquivo analisado:

D:\Wilson\Mestrado\Mestrado FACEPE - Experimento\Dissertação-nutrição\Digestibilidade\Planilhas\DIGESTIBILIDADE WILSON - 29-10.dbf

Variável analisada: DAPMS

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	267.501369	89.167123	2.801	0.0853
erro	12	382.033125	31.836094		
Total corrigido	15	649.534494			
CV (%) =	7.12				
Média geral:	79.2293750	Número de observações:		16	

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 11,8493953756668 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 2,82117412392429

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	73.842500	a1
2	77.212500	a1
0	81.145000	a1
3	84.717500	a1

Variável analisada: DAPPB

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	301.993319	100.664440	5.009	0.0177
erro	12	241.166975	20.097248		
Total corrigido	15	543.160294			
CV (%) =	5.32				
Média geral:	84.2793750	Número de observações:	16		

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 9,41465908169167 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 2,2414977089363

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	78.365000	a1
2	81.865000	a1 a2
3	88.392500	a2
0	88.495000	a2

Variável analisada: DAPFDN

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	485.260219	161.753406	3.275	0.0588
erro	12	592.691775	49.390981		
Total corrigido	15	1077.951994			
CV (%) =	9.37				
Média geral:	74.9943750	Número de observações:		16	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 14,7591086700099 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 3,51393587199596

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	67.590000	a1
2	72.392500	a1
0	77.800000	a1
3	82.195000	a1

Variável analisada: DAPCNF

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	132.831319	44.277106	4.294	0.0282
erro	12	123.736425	10.311369		
Total corrigido	15	256.567744			
CV (%) =	3.42				
Média geral:	93.7768750	Número de observações:		16	

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 6,74364130903974 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 1,60556600222476

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	90.240000	a1
1	91.762500	a1 a2
3	95.767500	a1 a2
0	97.337500	a2

Variável analisada: DAPMO

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	267.689225	89.229742	2.802	0.0852
erro	12	382.135550	31.844629		
Total corrigido	15	649.824775			
CV (%) =	7.12				
Média geral:	79.2487500	Número de observações:		16	

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 11,8509837104273 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 2,82155228405689

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	73.865000	a1
2	77.227500	a1
0	81.157500	a1
3	84.745000	a1

Variável analisada: DAPEE

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	303.467169	101.155723	1.879	0.1869
erro	12	646.017475	53.834790		
Total corrigido	15	949.484644			
CV (%) =	9.02				
Média geral:	81.3618750	Número de observações:		16	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 15,4087643415793 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 3,66860973610349

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	76.505000	a1
1	77.860000	a1
2	83.947500	a1
3	87.135000	a1

Arquivo analisado:

D:\wilson\Estatistica\NDT estatistica.dbf

Variável analisada: NDT

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATA	3	302.944425	100.981475	4.298	0.0281
erro	12	281.914350	23.492863		
Total corrigido	15	584.858775			
CV (%) =	6.00				
Média geral:	80.7487500	Número de observações:		16	

 Teste Tukey para a FV TRATA

DMS: 10,1789802487449 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 2,42347181229739

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	75.080000	a1
T2	79.252500	a1 a2
T0	81.530000	a1 a2
T3	87.132500	a2

Arquivo analisado:

G:\Nutrição\Comportamento ingestivo (wilson experimento - P-estatist-Geral) 01-10-12.dbf

Variável analisada: I

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	39201.562500	13067.187500	3.223	0.0315
erro	44	178372.916667	4053.929924		
Total corrigido	47	217574.479167			
CV (%) =	26.18				
Média geral:	243.2291667	Número de observações:	48		

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 69,4260579516234 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 18,3800841588625

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	224.166667	a1
2	225.000000	a1
3	231.250000	a1
1	292.500000	a1

Variável analisada: R

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	209039.062500	69679.687500	7.407	0.0004
erro	44	413947.916667	9407.907197		
Total corrigido	47	622986.979167			
CV (%) =	28.00				
Média geral:	346.3541667	Número de observações:		48	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 105,762303267987 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12

Erro padrão: 27,999861899912

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	294.166667	a1
0	313.333333	a1
3	318.333333	a1
1	459.583333	a2

Variável analisada: O

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	428129.166667	142709.722222	9.916	0.0000
erro	44	633212.500000	14391.193182		
Total corrigido	47	1061341.666667			
CV (%) =	14.11				
Média geral:	850.4166667	Número de observações:		48	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 130,807543338614 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 34,6304215753266

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	687.916667	a1
3	890.416667	a2
0	902.500000	a2
2	920.833333	a2

Variável analisada: CMS

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.552723	0.184241	1.111	0.3547
erro	44	7.293925	0.165771		
Total corrigido	47	7.846648			
CV (%) =	33.44				
Média geral:	1.2177083	Número de observações:		48	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 0,443954739061575 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 0,117534045680132

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1.076667	a1
2	1.178333	a1
3	1.243333	a1
0	1.372500	a1

Variável analisada: CFDN

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.080175	0.026725	0.447	0.7208
erro	44	2.632417	0.059828		
Total corrigido	47	2.712592			
CV (%) =	36.53				
Média geral:	0.6695833	Número de observações:		48	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 0,266707584125482 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 0,0706090477648766

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.630000	a1
2	0.640833	a1
3	0.672500	a1
0	0.735000	a1

Variável analisada: CONSMINGMS

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.062690	0.020897	1.142	0.3425
erro	44	0.804908	0.018293		
Total corrigido	47	0.867598			
CV (%) =	59.18				
Média geral:	0.2285417	Número de observações:		48	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 0,147479365840793 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 0,0390441749946148

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	0.195833	a1
2	0.202500	a1
0	0.228333	a1
1	0.287500	a1

Variável analisada: CONSMINGFD

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.141640	0.047213	0.494	0.6880
erro	44	4.201692	0.095493		
Total corrigido	47	4.343331			
CV (%) =	71.55				
Média geral:	0.4318750	Número de observações:		48	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 0,336953629923088 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 0,0892062182176045

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	0.368333	a1
2	0.391667	a1
0	0.464167	a1
1	0.503333	a1

Variável analisada: RUMMINGMS

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.006142	0.002047	0.272	0.8453
erro	44	0.330983	0.007522		
Total corrigido	47	0.337125			
CV (%) =	47.20				
Média geral:	0.1837500	Número de observações:		48	

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 0,0945716818036952 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 0,0250372197685241

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	0.165833	a1
0	0.182500	a1
1	0.191667	a1
2	0.195000	a1

 Variável analisada: RUMMINGFDN

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.620517	0.206839	3.723	0.0180
erro	44	2.444350	0.055553		
Total corrigido	47	3.064867			
CV (%) =	40.75				
Média geral:	0.5783333	Número de observações:		48	

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 0,2570039187123 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 12
 Erro padrão: 0,068040067295497

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	0.504167	a1
3	0.513333	a1
2	0.520833	a1 a2
1	0.775000	a2

Arquivo analisado:

G:\Nutrição\Comportamento ingestivo (wilson experimento - P-estatist-turno) 01-10-12.dbf

Variável analisada: IN

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TURNO	3	176214.973958	58738.324653	79.140	0.0000
erro	188	139534.895833	742.206893		
Total corrigido	191	315749.869792			
CV (%) =	44.80				
Média geral:	60.8072917	Número de observações:	192		

Teste Tukey para a FV TURNO

DMS: 14,4187098720761 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 48
 Erro padrão: 3,93225680729934

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
madrugada	25.000000	a1
noite	43.125000	a2
manha	69.583333	a3
tarde	105.520833	a4

Variável analisada: RUM

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TURNO	3	295107.682292	98369.227431	67.552	0.0000
erro	188	273764.062500	1456.191822		
Total corrigido	191	568871.744792			
CV (%) =	44.10				
Média geral:	86.5364583	Número de observações:	192		

 Teste Tukey para a FV TURNO
 -----DMS: 20,1963647446254 NMS: 0,05
 -----Média harmonica do número de repetições (r): 48
 Erro padrão: 5,50793333483718

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
tarde	34.270833	a1
noite	63.750000	a2
manha	117.708333	a3
madrugada	130.416667	a3

 Variável analisada: OCIOOpção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TURNO	3	161076.562500	53692.187500	23.276	0.0000
erro	188	433668.750000	2306.748670		
Total corrigido	191	594745.312500			
CV (%) =	22.59				
Média geral:	212.6562500	Número de observações:	192		

 Teste Tukey para a FV TURNO
 -----DMS: 25,4193271768613 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 48
 Erro padrão: 6,93233466898172

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
manha	172.708333	a1
madrugada	204.583333	a2
tarde	220.208333	a2
noite	253.125000	a3

Estatística artigo 2

Thursday, January 28, 2013 1 exp 1 20:29

The GLM Procedure
 Least Squares Means
 Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

LSMEAN			total_ Motility	Standard	
Number	ração	dose	LSMEAN	Error	Pr > t
1	Megalac	0	36.2346154	2.4497913	<.0001
2	Megalac	0.5	28.0511538	2.4497913	<.0001
3	Megalac	0.75	36.2111538	2.4497913	<.0001
4	Megalac	1.5	28.6180769	2.4497913	<.0001
5	control	0	27.8800000	2.4497913	<.0001
6	control	0.5	31.0880769	2.4497913	<.0001
7	control	0.75	31.9723077	2.4497913	<.0001
8	control	1.5	28.5607692	2.4497913	<.0001

LSMEAN			Progressive_ motility	Standard	
Number	ração	dose	LSMEAN	Error	Pr > t
1	Megalac	0	29.2907692	2.3047098	<.0001
2	Megalac	0.5	21.6730769	2.3047098	<.0001
3	Megalac	0.75	28.8230769	2.3047098	<.0001
4	Megalac	1.5	22.0123077	2.3047098	<.0001

5	control	0	21.7950000	2.3047098	<.0001
6	control	0.5	25.3003846	2.3047098	<.0001
7	control	0.75	25.4103846	2.3047098	<.0001
8	control	1.5	22.8192308	2.3047098	<.0001

Thursday, January 28, 2013 1 exp 2 20:38

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
ração	2	Megalac control
dose	4	0 0.5 0.75 1.5

Number of Observations Read 160
Number of Observations Used 160
exp 1 20:38

Thursday, January 28, 2013 2

The GLM Procedure

Dependent Variable: viability

F Value	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
1.84	Model Pr > F 0.0834	7	2575.24375	367.89196
	Error	152	30389.45000	199.93059
	Corrected Total	159	32964.69375	

Mean	R-Square	Coeff Var	Root MSE	viability
29.64375	0.078121	47.69869	14.13968	

LSMEAN	viability		Standard	
Number	ração	dose	LSMEAN	Error Pr > t
1	Megalac	0	35.6500000	3.1617289 <.0001
2	Megalac	0.5	26.2500000	3.1617289 <.0001

3	Megalac	0.75	33.4000000	3.1617289	<.0001
4	Megalac	1.5	26.3000000	3.1617289	<.0001
5	control	0	28.0000000	3.1617289	<.0001
6	control	0.5	34.3500000	3.1617289	<.0001
7	control	0.75	29.1000000	3.1617289	<.0001
8	control	1.5	24.1000000	3.1617289	<.0001

Thursday, January 28, 2013 1 exp 3 20:41

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
ração	2	Megalac control
dose	4	0 0.5 0.75 1.5

Number of Observations Read 160
 Number of Observations Used 160
 exp 1 20:41

Thursday, January 28, 2013 2

The GLM Procedure

Dependent Variable: MPV_bind

F Value	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
	Pr > F			
1.58	Model	7	8452.1000	1207.4429
	0.1438			
	Error	152	115799.8000	761.8408
	Corrected Total	159	124251.9000	

Mean	R-Square	Coeff Var	Root MSE	MPV_bind
67.97500	0.068024	40.60532	27.60146	

The GLM Procedure
 Least Squares Means
 Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

The GLM Procedure
Least Squares Means
Adjustment for Multiple Comparisons: Tukey

LSMEAN Number	ração	dose	MPV_bind LSMEAN	Standard Error	Pr > t
1	Megalac	0	74.2000000	6.1718749	<.0001
2	Megalac	0.5	61.6500000	6.1718749	<.0001
3	Megalac	0.75	79.1000000	6.1718749	<.0001
4	Megalac	1.5	57.3500000	6.1718749	<.0001
5	control	0	63.6500000	6.1718749	<.0001
6	control	0.5	74.6000000	6.1718749	<.0001
7	control	0.75	71.1500000	6.1718749	<.0001
8	control	1.5	62.1000000	6.1718749	<.0001