



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural (NCADR)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Geanne Rocha da Silva

Efeito da utilização do óleo de dendê na dieta sobre a qualidade do sêmen *in natura* de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados em Belém, Pará

Belém
2012

Geanne Rocha da Silva

Efeito da utilização do óleo de dendê na dieta sobre a qualidade do sêmen *in natura* de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados em Belém, Pará

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia

Co-orientação: Prof. Dr. Cristian Faturi
Prof. Dr. José de Brito Lourenço Junior

**Belém
2012**

Geanne Rocha da Silva

Efeito da utilização do óleo de dendê na dieta sobre a qualidade no do sêmen *in natura* de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados em Belém, Pará

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia.

Data: Belém-PA: 23/08/2012

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia
Embrapa Pecuária Sudeste
Orientador e Presidente

Prof. Dr. André Maciel Guimarães e Silva
Universidade Federal do Pará
Examinador Titular

Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues
Universidade Federal Rural da Amazônia
Examinador Titular

**A Deus
Dedico**

AGRADECIMENTO

A Deus pelas conversas íntimas, pelas dúvidas esclarecidas, pelo companheirismo em momentos de solidão carnal, por ser meu amigo, meu pai, meu guia, meu protetor... Obrigada, obrigada, obrigada!

Aos meus pais, por acreditarem em mim, me auxiliando sempre que necessário.

A minha irmã Giselle Rocha e meu irmão George Rocha, por sempre estarem dispostos a tudo que eu necessitasse. Obrigada por me buscarem na madrugada, obrigada pelas visitas aos finais de semana, levando alegria e incentivo sempre.

Aos meus sobrinhos Kaio e Kauê, que sempre queriam visitar os búfalos aos fins de semana, tornando as visitas dia de festa.

A minha “rainha”, “filha”, “amiga” Anna Beatriz, que é fascinada pela minha profissão, sempre querendo saber e aprender, quando muitas vezes acordava cedo para “trabalhar”. Obrigada rainha, por entender quando tenho que está ausente, por me esperar para eu dá o beijo de boa noite e pelo sorriso maravilhoso ao acordar.

Ao Tio Valdez e à Tia Helena que sempre me ampararam durante toda a minha trajetória acadêmica, desde a entrada na graduação à saída da pós-graduação.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Rossetto Garcia, por ser meu espelho profissional, por ser correto, sempre coerente, pela sutileza de suas palavras ao comentar um “erro”, pela confiança, por ser conselheiro, por ser determinado, por ser entre os “filhos científicos” o “Master”.

Ao Professor Cristian Faturi, um agradecimento muito especial por suas fundamentais contribuições estatísticas, indispensáveis para a conclusão do trabalho, por sua co-orientação, disponibilidade e amizade.

Ao Professor Dr. José Lourenço Junior, Talmir Quinzeiro e Benjamin Nahúm pela acolhida, pelas dúvidas esclarecidas, pela disponibilidade e pelo empenho que foram fundamentais para a realização do trabalho.

Ao Arnaldo Algaranhar, pelo companheirismo nessa batalha, pelos momentos de descontração, apoio e discussão, necessários para o engrandecimento pessoal e profissional.

À doutoranda Priscila Kahwage, pela amizade incondicional, por sempre estar disposta a ajudar, por sua indispensável presença desde o começo ao fim da execução do trabalho. Hoje continua indispensável na minha vida pessoal, através de uma grande amizade, erguida com objetivos comuns.

Aos estagiários Késya Freitas, Jakeline Pessoa, Raimundo Neto, Arilson Cardoso, Aline, Marcela e Sarah, muito obrigada pelo empenho na execução do trabalho de campo.

À Professora Dra. Carla Moraes, pela amizade, conselhos e disposição para me acolher sempre que eu precisava.

À Universidade Federal Rural da Amazônia, em especial ao Professor Dr. André Meneses, que disponibilizou o Laboratório de Análises Clínicas para realização das análises bioquímicas necessárias para compreensão do trabalho.

À médica veterinária Esp. Larissa Seixas, pelo esforço depositado nas análises bioquímicas.

A toda equipe do Hovet - LAC/UFRA, Dennis Lima, Verena, Marconi, Keitty Reis, Sinerey Aragão, Flávia Matos e Georgina pelo carinho, companhia e incentivos.

À Universidade Federal do Pará, em especial à Professora Dra. Luiza Helena Meller da Silva, Dr. Antônio Rodrigues e a toda equipe do Laboratório de Análises Físicoquímicas de Alimentos, que viabilizaram as análises lipídicas nas dietas experimentais dos animais, sendo estas de fundamental importância para nossa pesquisa.

Aos funcionários da Embrapa lotados na Unidade de Pesquisa Animal “Senador Álvaro Adolpho”: Éder, Elanderson, Januário, Juarez e Osvaldo, pela colaboração na execução do trabalho.

À Embrapa Amazônia Oriental, pela colaboração e apoio ao ceder animais, funcionários, instalações, laboratórios e equipamentos para a viabilização do trabalho de campo e laboratorial (Projeto Rede de Inovação em Reprodução Animal, códigos 01.07.01.02.04 e 01.07.01.02.03).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro sob a forma de bolsa de estudos, nível mestrado.

À Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia e à Embrapa Amazônia Oriental, que através do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, permitem o aperfeiçoamento técnico-científico, engrandecendo o nível profissional que nos cerca.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da incorporação de óleo de palma sobre os níveis lipídicos séricos e a qualidade espermática de touros bubalinos. O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Amazônia Oriental, com 12 touros bubalinos previamente selecionados, com idade média de $3,47 \pm 0,92$ anos e peso inicial de $456,8 \pm 50,4$ kg. Os touros foram confinados e divididos em dois grupos, de acordo com a raça, idade e a alimentação recebida. A alimentação (milho triturado, farelo de trigo e silagem de milho; proporção volumoso/concentrado de 50%) em cocho coletivo. O Grupo CONT recebeu dieta sem adição de óleo de palma e o Grupo ÓLEO recebeu dieta com adição de 2% de óleo de palma sobre a MS. Foram realizadas as análises bromatológica e de perfil de ácidos graxos dos alimentos. Foram investigados o perfil lipídico sérico, os aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* e as relações entre eles. A análise estatística contemplou a análise de variância (Anova), a comparação de médias pelo teste de Tukey, além das correlações de Pearson ($P < 0,05$). O Grupo ÓLEO teve consumo 71,23% superior de ácidos graxos saturados e 55,40% superior de ácidos graxos insaturados em relação ao Grupo CONT. Efeitos significativos em relação aos grupos, para os parâmetros séricos, foram observados para triglicerídeos, colesterol, HDL e lipídeos totais, com valores maiores para o Grupo ÓLEO e, efeitos significativos em relação a período para colesterol, LDL, VLDL e lipídeos totais ($P < 0,05$). Com relação aos parâmetros seminais, houve significativa redução em turbilhonamento e integridade de membrana plasmática, e redução da concentração seminal em função do período para o Grupo ÓLEO. Houve correlação significativa entre as variáveis: triglicerídeos e defeitos menores ($r = -0,412$; $P = 0,006$), LDL e defeitos totais ($r = -0,333$; $P = 0,030$), VLDL e viabilidade espermática ($r = 0,381$; $P = 0,012$), lipídeos totais e defeitos menores ($r = -0,366$; $P = 0,017$), e lipídeos totais e defeitos totais ($r = -0,309$; $P = 0,046$). Apesar de haver relação entre maiores níveis de lipídeos séricos e melhor morfologia espermática e do uso do óleo de palma não reduzir a qualidade do sêmen *in natura* a níveis abaixo dos fisiológicos, seu uso a 2% na dieta não favoreceu efetivamente os parâmetros relacionados com elevação da qualidade seminal e potencial fertilidade dos touros.

Palavras chaves: Óleo de palma. Bubalino. Espermatozoide. Qualidade seminal. Sêmen *in natura*

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of incorporation of palm oil on serum lipid levels and sperm quality of buffalo bulls, since research about palm oil seed for reproductive purposes are scarce. The study was conducted at Embrapa Eastern Amazon, and used 12 pre-selected buffalo bulls, with a mean age of 3.47 ± 0.92 years and weight of 456.8 ± 50.4 kg. The bulls were fed and divided into two groups according to diet received. Diets were isoproteic (cracked corn, wheat bran and corn silage; proportion roughage / concentrate 50%) and were offered in collective pens. Animals of CONT Group (n = 5) received a control diet and OIL Group (n = 7) received the same diet with addition of 2% of palm oil on the DM. Analyses were performed using chemical and fatty acid profile of foods. Serum lipid profile, physical and morphological features of raw semen were investigated, including the relations between them. Statistical analysis included analysis of variance (ANOVA), comparison of means by Tukey test and Pearson correlations ($P < 0.05$). Increased lipid consumption was noted related to saturated fat acids (71.23%) and unsaturated fat acids (55.40%) in OIL Group. Significant effects for serum parameters were observed for triglycerides, cholesterol, HDL and total lipids, with higher values for the OIL Group, and significant effects over time for cholesterol, LDL, VLDL and total lipids ($P < 0.05$). Regarding to semen parameters, there was a significant reduction in gross motility and integrity of plasmatic membrane, and reduced seminal concentration on the period for the OIL Group. There was significant correlation between the variables: triglycerides and minor defects ($r = -0.412$, $P = 0.006$), LDL and total defects ($r = -0.333$, $P = 0.030$), VLDL and viability ($r = 0.381$, $P = 0.012$), total lipids and minor defects ($r = -0.366$, $P = 0.017$), and total lipids and total defects ($r = -0.309$, $P = 0.046$). Although an observed relationship between higher levels of serum lipids and better sperm morphology, and no reduction of fresh semen quality by palm oil addition below the physiological levels, the use of 2% of palm oil in the diet did not improve effectively the parameters related to semen quality and bulls fertility.

Keywords: Palm oil. Buffalo. Sperm. Semen quality. Raw semen

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Variação do perfil lipídico do óleo dos frutos do dendezeiro, óleo de palmiste e óleo de palma.	18
Tabela 2: Composição alimentar das dietas oferecidas aos touros bubalinos de acordo com a exigência nutricional. Belém, Pará, 2012.	30
Tabela 3: Perfil dos ácidos graxos das dietas experimentais. Belém, Pará, 2012.	31
Tabela 4: Consumo de matéria seca - MS (kg/dia), matéria seca por peso vivo - MSPV (%), proteína (kg/dia), extrato etéreo - EE (kg/dia) e ácidos graxos - AG (g/dia) por búfalos alimentados com dietas sem e com inclusão de óleo de palma. Belém, Pará, 2012.	35
Tabela 5: Níveis séricos de lipídeos (Média ± DP) de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma. Belém, Pará, 2012.	36
Tabela 6: Níveis séricos de lipídeos (Média ± DP) de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma, de acordo com os períodos experimentais (58 dias cada). Belém, Pará, 2012.	36
Tabela 7: Avaliação dos parâmetros seminais <i>in natura</i> de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma. Belém, Pará, 2012.	37
Tabela 8: Comparação da concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL) de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma, conforme dieta e período. Belém, Pará, 2012.	37
Tabela 9: Correlação de Pearson entre as variáveis triglicerídeos e defeitos menores, LDL e defeitos totais, VLDL e viabilidade espermática, e lipídeos totais e defeitos totais. Belém, Pará, 2012.	38
Tabela 10: Perfil dos ácidos graxos dos alimentos utilizados na formulação das rações experimentais. Belém, Pará, 2012.	62
Tabela 11: Características seminais de touros bubalinos nos dois períodos experimentais. Belém, Pará, 2012.	63
Tabela 12: Parâmetros seminais fisiológicos de touros bubalinos.	63
Tabela 13: Correlação de Pearson entre as variáveis seminais e variáveis lipídicas séricas. Belém, Pará, 2012.	64
Tabela 14: Variação do peso corporal, escore corporal e perímetro escrotal dos búfalos durante o período experimental. Belém, Pará, 2012.	64

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

AG=ácido graxo

AGL= ácido graxo livre

AGI= ácido graxo insaturado

AGS= ácido graxo saturado

apoC-II = apoproteína C-II

EE = extrato etéreo

HDL = lipoproteína de alta densidade

LDL = lipoproteína de baixa densidade

MS = matéria seca

REL = retículo endoplasmático liso

VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade

VLD_r = receptor de lipoproteína de muito baixa densidade

C12:0 = ácido láurico

C14:0 = ácido mirístico

C16:0 = ácido palmítico

C16:1= ácido palmitoleico

C18:1= ácido esteárico (ω 9)

C18:2= ácido linoleico (ω 6)

C18:3= ácido linolênico (ω 3)

C20:1 = ácido aracdônico

C22:5 = ácido docosapentaenoico

C22:6 = ácido docosahexaenoico

FAMES = ésteres metílico de ácidos graxos

P1 = Período experimental 1

P2 = Período experimental 2

PUFAS = (*polyunsaturated fatty acid*) ácidos graxos poli-insaturados

ROS = (*reactive oxygen species*) espécies reativas ao oxigênio

vs. = *versus*

% = porcentagem

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 CARACTERÍSTICAS DO ÓLEO DE PALMA OU DE DENDÊ	18
3.2 OS LIPÍDEOS E SEU USO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL	19
3.3 METABOLISMO DIGESTIVO E INCORPORAÇÃO CELULAR DE LIPÍDEOS POR RUMINANTES	21
3.4 MEMBRANA ESPERMÁTICA E SUA RELAÇÃO COM COLESTEROL E LIPOPROTEÍNAS NA CAPACITAÇÃO	22
4 EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE PALMA NA DIETA SOBRE A LIPIDEMIA E A QUALIDADE SEMINAL DE TOUROS BUBALINOS (<i>Bubalus bubalis</i>)	26
4.1 INTRODUÇÃO	27
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.2.1 Local, Período e Animais Experimentais	29
4.2.2 Manejo Alimentar	29
4.2.3 Perfil dos Ácidos Graxos da Dieta	31
4.2.4 Método de Colheita do Sêmen	32
4.2.5 Avaliação Seminal Imediata	32
4.2.6 Teste Hiposmótico (HOS)	33
4.2.7 Viabilidade e Morfologia Espermática	33
4.2.8 Avaliação Lipídica no Soro Sanguíneo	33
4.2.9 Análise Estatística	34
4.3 RESULTADOS	34
4.3.1 Consumo dos Alimentos	34
4.3.2 Níveis Séricos de Lipídeos	35
4.3.3 Características do Sêmen <i>in natura</i> e Correlações com Lipídeos Séricos	36
4.4 DISCUSSÃO	38
4.5 CONCLUSÃO	44

4.6 REFERÊNCIAS	45
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A	61
ANEXO B	62

1 INTRODUÇÃO

A importância da nutrição na produção animal vem sendo estudada desde o início da domesticação dos animais. A relação entre nutrição e reprodução é complexa e sabe-se que a nutrição afeta o processo reprodutivo de diferentes espécies, com influência na puberdade, na produção de gametas, no desenvolvimento placentário e na lactação. O uso de óleos na alimentação animal, dentre eles o óleo de palma (*Elaeis guineensis*), além de oferecer grande quantidade de energia ao animal, pode promover melhora na qualidade espermática devido à incorporação dos lipídios oriundos da dieta pelas células espermáticas. O fornecimento de gordura pode elevar positivamente os parâmetros reprodutivos, pois há relatos que a inclusão de óleos na ração é capaz de modificar o perfil de ácidos graxos (AG) dos espermatozoides, impactando positivamente na qualidade seminal (ARLAS, 2008).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), o Pará é o principal produtor nacional de dendê, sendo responsável por 81,87% da produção. A cultura do dendê ocupa no Pará uma área de 52.244 mil hectares, com quantidade produzida de 1.058.318 toneladas com rendimento médio em torno de 20.258 t/ha. O dendê é utilizado na produção de óleo, com produtividade anual média de 2.076 toneladas de óleo por hectare, nas plantações adultas (NUNES, 2007). Assim, o aproveitamento de produtos gerados pelas agroindústrias regionais, no caso, no estado do Pará, pode ser uma alternativa para alimentação de ruminantes, pois o fruto é disponível e industrializado o ano todo.

O fruto do dendê produz dois tipos de óleo: óleo de dendê ou de palma (*palm oil*, como é conhecido no mercado internacional), extraído da parte externa do fruto, o mesocarpo; e o óleo de palmiste (*palm kernel oil*), extraído da semente (EMBRAPA, 2011). Os óleos vegetais mais produzidos na safra de 2007/2008 no mundo foram o óleo de palma e o óleo de palmiste, atingindo produção de 45,61 milhões de toneladas (40,80 milhões de toneladas de óleo de palma e 4,81 milhões de toneladas de óleo de palmiste). Esse montante corresponde a 35,57% da produção mundial de óleos vegetais (USDA, 2008).

A ingestão de lipídios na nutrição animal pode, hipoteticamente, trazer benefícios sobre o desempenho reprodutivo de machos e fêmeas e, recentemente, fontes de óleos à base de gorduras poli-insaturadas têm sido utilizadas na tentativa de melhoria dos aspectos quantitativos e qualitativos do sêmen em sua fase *in natura* (DOLATPANAH et al., 2008).

Paralelamente, a produção e comercialização de reprodutores bubalinos pelo estado do Pará tem ganhado grande impulso. Somente no primeiro trimestre de 2012, aproximadamente 100 touros bubalinos com idade reprodutiva entre 24 a 36 meses foram exportados da

mesorregião nordeste do estado do Pará, tendo como destino a Venezuela (informação verbal)¹. Com o aumento da demanda interna e externa por genética para melhoramento de rebanhos bubalinos e a estratégia de alguns países em adquirir animais vivos para multiplicação, faz-se necessário o uso de dietas energéticas na alimentação de machos bubalinos, o que pode contribuir para elevar o número de touros jovens disponíveis anualmente para a reprodução a campo e diminuir os gastos na produção desses animais. Esse recurso nutricional pode, também, contribuir para elevar a eficiência e o aproveitamento dos touros-elite mantidos em centrais de inseminação artificial, uma vez que se busca elevar a fertilidade do sêmen.

¹ADEPARÁ, informações cedidas por ADEPARÁ, Santa Isabel do Pará, 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a introdução de óleo de palma na alimentação de touros bubalinos a fim de verificar se os lipídeos provenientes desta fonte afetam a produção e a qualidade seminal dos animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

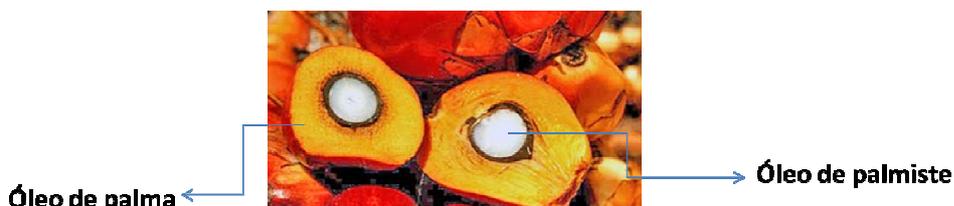
- a) Avaliar se a inclusão do óleo de palma na dieta interfere no perfil lipídico do soro sanguíneo.
- b) Avaliar o efeito da inclusão de óleo de palma na dieta sobre as características físicas e morfológicas do sêmen bubalino *in natura*.
- c) Estudar a correlação dos níveis séricos de lipídeos com a qualidade seminal.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ÓLEO DE PALMA OU DE DENDÊ

As gorduras de origem vegetal e animal contêm ácidos graxos insaturados (AGI), e saturados (AGS), dentre eles o palmítico, linoleico, linolênico, sendo o ácido linoleico mais frequentemente encontrado em sementes oleaginosas (FUSTON, 2004). Os frutos do dendezeiro produzem dois tipos de óleos distintos: o óleo de dendê ou óleo de palma, encontrado no mesocarpo (polpa do fruto); e o óleo de palmiste, extraído da amêndoa do fruto (FURLAN JÚNIOR et al., 2006), conforme Figura 1.

Figura 1: Localização, no fruto do dendê, dos pontos de extração dos dois tipos de óleos.



Fonte: www.campestre.com.br

A composição do óleo de palma é variável de acordo com diferentes autores, Entretanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999) estabelece um perfil lipídico aceitável para o óleo de palma, expresso na Tabela 1.

Tabela 1: Variação do perfil lipídico do óleo dos frutos do dendezeiro, óleo de palmiste e óleo de palma.

PERFIL LIPÍDICO ACEITÁVEL ANVISA (1999) (g/100g)	ÓLEO DE PALMA BRUTO Miranda et al. (2001) (%)	ÓLEO DE PALMA BRUTO Soares et al. (2011) (%)	
Ac. láurico (12:0)	0,4		
Ac. mirístico (14:0)	0,5 a 2,0		
Ac. palmítico (16:0)	35 a 47	32 a 45%	
Ac. palmitoleico(16:1)	0,6		
Ac. esteárico (18:0)	3,5 a 6,5	32 a 45%	
Ac. oleico (18:1)	36 a 47	32 a 58	43,04%
Ac. linoleico (18:2)	6,5 a 15	5 a 11	11,36%
Ac. linolênico (18:3)	<0,5		
Ac. aracdônico (20:0)	<1,0		

Fonte: Adaptado de Anvisa(1999), Miranda et al. (2001) e Soares et al. (2011)

3.2 OS LIPÍDEOS E SEU USO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Os lipídeos são constituintes orgânicos importantes na alimentação, não só pelos seus elevados valores energéticos, como também pelos ácidos graxos essenciais contidos na fração lipídica dos alimentos naturais. Diversos trabalhos têm mostrado que a utilização de diferentes tipos de óleos na dieta exerce forte influência sobre as características seminais de varrões (OLIVEIRA et al, 2006), garanhões (ARLAS, 2008), búfalos (ADEEL et al, 2009), homem (FATMA et al, 2009), coelhos (GLIOZZI et al, 2009) e galos (SURAI et al, 2000).

Óleos e gorduras são constituídos, predominantemente, por triglicerídeos, os quais são formados por três ácidos graxos unidos por ligação éster a uma molécula de glicerol. Os AG são ácidos carboxílicos, com cadeias hidrocarbonadas (saturadas ou insaturadas) de 4 a 36 átomos de carbono, derivados dos hidrocarbonetos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007). Ao entrarem nas células, os ácidos graxos podem ser oxidados para gerar energia, podem ser armazenados como triglicerídeos ou serem usados na síntese de membranas. Em quase todos os ácido graxos de ocorrência natural, as ligações duplas estão na configuração *cis* e os ácidos graxos na configuração *trans* são produzidos por fermentações ruminais (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

As gorduras são ricas em AGS e se caracterizam por serem sólidas à temperatura ambiente, enquanto os óleos são ricos em AGI e são líquidos (CURI et al., 2002). A principal diferença entre os AG está no comprimento da cadeia hidrocarbonada e, quando insaturados, no número e posições das duplas ligações e na configuração *cis*- e *trans*- (MORETTO; FETT, 1998). Os AG ômega-3/ ω -3 (linolênico) e ômega-6/ ω -6 (linoleico) são considerados os principais AG essenciais, pois não podem ser sintetizados no organismo. São necessários para as funções biológicas e, portanto, precisam ser fornecidos pela dieta (CURI et al., 2002). São os precursores dos demais ácidos da série (ou família) ω -3 e ω -6, respectivamente (CARTER, 1993).

A utilização de alimentos ricos em lipídios na dieta de ruminantes é de grande valia (APPER-BOSSARD et al., 2006; DEGARIS et al., 2008) por aumentar a densidade energética da dieta. A gordura é utilizada na dieta de ruminantes para aumentar a concentração de energia e melhorar o desempenho animal, sem aumentar a ingestão de carboidratos não estruturais (SALLA et al., 2003), diminuindo os riscos de ocorrências de acidose ruminal, quando o teor de gordura na dieta é de, no máximo, 6% de extrato etéreo (EE) na matéria seca (MS). Contudo, a adição de gordura acima dessas quantidades pode

prejudicar a digestibilidade de fibra no rúmen e/ou provocar distúrbios metabólicos, comprometendo o desempenho animal (FERNANDES et al., 2002).

Devido ao fato das forragens conterem concentrações lipídica limitadas (LISTA et al, 2008), predominantemente ácido graxos poli-insaturados (PUFAs, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*), faz-se necessário o uso de fontes concentrada de lipídeos, como os óleos de sementes oleaginosas, com objetivo de incrementar tanto a produção quanto a reprodução de ruminantes (ARLAS; JORGE et al, 2008). Por isso, a adição de óleo de origem vegetal na alimentação animal vem se tornando um procedimento comum (MARCHELLO et al., 2000), podendo afetar positivamente os processos reprodutivos, como, por exemplo, maior secreção de esteroides e eicosanoides (NOGUEIRA, 2008).

Gorduras de origem animal e vegetal que contêm ácidos palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) são amplamente metabolizadas, sendo o ácido linoleico o mais abundante em vegetais e seus derivados. Os micro-organismos no rúmen metabolizam as gorduras, hidrolisando-as em seus componentes de ácidos graxos poli-insaturados e glicerol (WILLIAMS, 2001). Os AGI liberados têm algumas de suas ligações duplas reduzidas e seus isômeros modificados em um processo chamado bio-hidrogenação, que consiste em inserção de hidrogênios nas duplas ligações, transformando-as em ligações simples ou saturadas (PALMQUIST; MATTOS, 2006; ROBINSON et al., 2002).

Os lipídeos são componentes importantes na estrutura e função do espermatozoide, e sua composição pode sofrer uma série de modificações, devido a questões fisiológicas ou alimentares (MOURVAKI et al, 2009). Em várias espécies, os AGI, principalmente os ácidos docosapentaenoico (C22:5) e o docosahexaenoico (C22:6), correspondem à maior parte da composição lipídica espermática, o que permite uma maior fluidez da membrana plasmática, visto que em sua estrutura há maior presença de ligações duplas (MALDIJAN et al, 2005; SCHILLER et al, 2003, SCHILLER et al, 2000). Uma desvantagem potencial da alimentação rica em gordura para touros é, em casos extremos, o desenvolvimento da obesidade e da deposição de gordura excessiva no escroto, que pode interferir com a regulação da temperatura testicular normal, resultando em redução da qualidade do sêmen (COULTER, 2002), diminuição da proporção de espermatozoides com motilidade progressiva e com morfologia normal (KASTELIC et al., 1996).

3.3 METABOLISMO DIGESTIVO E INCORPORAÇÃO CELULAR DE LIPÍDEOS POR RUMINANTES

Quando os lipídeos chegam ao rúmen, ocorre hidrólise com consequente liberação de ácidos graxos livres (AGL). A hidrólise consiste em quebra da ligação éster dos triglicerídeos, fosfolipídeos e glicolipídeos (BAUMAN et al., 2003). Os AGL que possuem alta taxa de insaturação são convertidos em ácidos graxos saturados pelos micro-organismos presentes no rúmen, por bio-hidrogenação. A maior parte da bio-hidrogenação (cerca de 80%) ocorre em associação com as partículas finas de alimento e esta tem sido atribuída às enzimas extracelulares de bactérias, quer associadas com a alimentação ou livre em suspensão (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997). Na verdade, a bio-hidrogenação consiste em mecanismo de defesa dos micro-organismos, que desfazem as duplas ligações dos triglicerídeos insaturados e acrescentam um átomo de hidrogênio, formando uma ligação simples com o carbono (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

Sabe-se que o metabolismo lipídico no rúmen tem um grande impacto sobre o perfil de ácidos graxos disponíveis para absorção e utilização pelo tecido. Dois processos distintos ocorrem no rúmen, após a ingestão de lipídeos: a hidrólise dos lipídios em ligações éster e a bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997). Vários fatores que afetam a metabolização lipídica já foram identificados, tais como o aumento do nível dietético de gordura com consequente diminuição do pH ruminal (WEIMER et al., 2010) e a inibição da bio-hidrogenação em decorrência de alteração na ecologia microbiana após a adição de óleos de peixe nas rações (KIM et al, 2008).

Nos grãos, a maioria dos lipídeos encontra-se no germe, havendo, então, a necessidade da degradação da parede celular para que a hidrólise se inicie (PALMQUIST; MATTOS, 2006). A digestão dos lipídeos nos ruminantes ocorre no intestino delgado, entretanto, pela pouca solubilidade dos lipídeos em meio aquoso, agentes emulsificantes são necessários. Os lipídeos são emulsificados através da ação dos sais biliares, os quais, devido a sua natureza anfipática, fazem interação de sua porção polar com a água, enquanto o grupo apolar interage com a gordura; deste modo, os lipídeos ficam dispersos no meio aquoso formando as micelas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Após a emulsificação, ocorre a ação da lipase pancreática, que quebra os lipídeos em AGL e monoglicerídeos, e são absorvidos pelos enterócitos e carregados ao retículo endoplasmático liso (REL), e reconvertidos em triglicerídeos, colesterol esterificado e fosfolipídeos. Estes são agrupados às apolipoproteínas no

retículo endoplasmático liso, formando agregados lipoproteicos denominados de quilomicrons (LEHNINGER; NELSON; COX; 2007).

O REL engloba os quilomicrons e os transporta até o Complexo de Golgi, onde sofrem exocitose para o espaço intracelular. Os quilomicrons chegam à circulação linfática e desta para a corrente circulatória, por onde são transportados para os tecidos. No espaço intersticial, os quilomicrons reagem com outras apolipoproteínas, principalmente a lipoproteína de alta densidade (HDL), de quem recebem a apolipoproteína C-II (apoC-II) (PATSCHE,1998). A enzima lipoproteína-lipase converte os triglicerídeos dos quilomicrons em ácidos graxos e glicerol. Esses compostos são captados por vários tecidos, principalmente adiposo e muscular, e esta enzima é ativada por ligações à apoC-II. Os quilomicrons remanescentes são transportados até o fígado, onde são oxidados para fornecer energia, ou são convertidos em triglicerídeos e agrupados a uma apolipoproteína específica em lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Esta sai do fígado até o tecido adiposo, onde os triglicerídeos são armazenados como gotículas lipídicas no interior dos adipócitos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007; VOET; VOET; PRATT, 2000).

3.4 MEMBRANA ESPERMÁTICA E SUA RELAÇÃO COM COLESTEROL E LIPOPROTEÍNAS NA CAPACITAÇÃO

A membrana plasmática envolve externamente todo o espermatozoide (PESCH; BERGMANN, 2006). As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e à manutenção da motilidade espermática, capacitação, reação acrossomal, além das interações entre o espermatozoide e o epitélio do trato genital feminino e interação com o ovócito (PEÑA et al., 2005).

Os lipídios fazem parte dos componentes celulares de membranas biológicas. Apesar de haver diferenças entre espécies, as membranas dos espermatozoides são compostas genericamente por 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (MANN; LUTWAK-MANN, 1981; FLESCHE; GADELLA, 2000). Entretanto, em búfalos, a composição lipídica corresponde a 47,8% de fosfolipídeos. Em 1 bilhão de células espermáticas, há 1,147 mg de lipídeos totais, 0,286 mg de lipídeos neutros, 0,397 mg de glicolipídeos, 0,548 mg de fosfolipídeos e 0,015 mg de gangliosídeos (JAIN; ANAND, 1976a; JAIN; ANAND, 1976b).

A membrana espermática é originada na transição das espermatogônias em espermátócitos, nos túbulos seminíferos. Durante a maturação celular, ocorre uma

modificação considerável que se caracteriza pelo elevado número de ácidos graxos poli-insaturados, que conferem à membrana características físicas especiais e a compartimentalização dos componentes lipídicos e proteicos em domínios (JONES, 1998).

As membranas celulares são compostas por três classes de moléculas: lipídios, proteínas e carboidratos. Os lipídios estão presentes em maior quantidade, sendo responsáveis pela integridade estrutural, enquanto as proteínas são as principais responsáveis pela especificidade da membrana e pela dinâmica da célula. Os carboidratos interagem com as proteínas através de ligações covalentes, desempenhando papel importante entre as células, como o reconhecimento célula-célula, adesão e receptores de membrana (LADHA, 1998). A disposição lipídica espermática segue o mesmo modelo estrutural de uma bicamada lipídica, com duplos folhetos de fosfolipídios associados à proteína (WATSON, 1995). Nos espermatozoides, esse duplo folheto é uma estrutura altamente especializada, que tem um papel ativo na capacidade fertilizante, recebendo sinais e modificando-se ao longo da espermatogênese, trânsito e estocagem no epidídimo, depósito no trato genital feminino, capacitação e penetração no ovócito (CUNHA, 2002).

Os principais fatores que afetam a fluidez da membrana são a composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta (HAMMERSTEDT; NOLAN; GRAHAM, 1990). No estado líquido, há uma maior movimentação e interação dos componentes (FLESCH; GADELLA, 2000). Outro fator importante para a função da membrana celular espermática é a assimetria da camada lipídica, uma vez que esta seria responsável pelo aumento da fluidez da camada externa dos espermatozoides durante a capacitação (WATSON, 1995).

A estrutura espermática e o potencial de fertilização dependem da composição de lipídios de suas membranas e do plasma seminal, pois a fertilização do ovócito é precedida pelo processo de capacitação, que é acompanhado por modificações na composição lipídica da membrana de espermatozoides. Estas mudanças implicam na saída do colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides e sua ligação às proteínas no plasma seminal (THERIEN; MOREAU; MANJUNATH, 1998), denominadas de proteína PBS (MOREAU; MANJUNATH, 2000). Como os PUFAs de cadeia longa na membrana de espermatozoides derivam dos ácidos linoleico e linolênico oriundos da alimentação (COOK, 1996), a inclusão de óleos na ração pode modificar o perfil de ácidos graxos dos espermatozoides e, conseqüentemente, melhorar a qualidade espermática (ARLAS, 2008).

Além da função energética, os lipídios fazem parte dos componentes celulares de membranas biológicas (FLESCH; GADELLA, 2000), inclusive dos espermatozoides.

Imediatamente após a ejaculação, os espermatozoides de mamíferos não têm capacidade fecundante, a qual se desenvolve e ocorre no trato genital feminino (HAFEZ, 2004). Este processo, denominado "capacitação espermática", envolve mudanças bioquímicas e estruturais da membrana plasmática dos espermatozoides, afetando a permeabilidade da membrana, seu metabolismo e motilidade (MEHMOOD; ANWAR; SAQLAN NAQVI, 2007). Durante o processo de capacitação, ocorre perda de proteínas, incluindo fatores de estabilização acrossomal, e perda de colesterol da superfície da membrana, tornando-a mais fluida e facilitando a reação acrossomal (DEN DAAS, 1992).

O colesterol é precursor de hormônios esteroides, produzidos nos machos pelos testículos e glândulas adrenais. O colesterol desempenha funções primordiais nas células espermáticas, sendo o composto mais abundante das membranas espermáticas, nas mais variadas espécies (PARKS e LYNCH, 1992). Em equinos, por exemplo, o espermatozoide apresenta em sua membrana plasmática 37% de colesterol (FLESCH e GADELLA, 2000). As diferenças na quantidade de colesterol podem estar relacionadas com índices de capacitação, potencial fertilizante e criorresistência do ejaculado, quando submetido ao resfriamento e ao congelamento (YANAGIMACHI, 1994).

Juntamente com os fosfolipídios, o colesterol é necessário para a integridade física de células e garante, também, a fluidez da membrana celular. O colesterol desempenha um papel especial na membrana do espermatozoide devido a sua liberação nas etapas iniciais de capacitação e reação acrossômica, funções cruciais para a fertilização (WITTE, 2007).

Os fosfolipídeos também constituem a maior fração lipídica do plasma seminal do touro, varrão e garanhão (WITE, 1988). A fração de colesterol/fosfolipídeos no plasma seminal tem como função estabilizar a membrana espermática contra choques térmicos do meio ambiente (WEIN et al., 2006). O aumento da susceptibilidade do espermatozoide ao choque térmico está correlacionado ao baixo conteúdo de colesterol na membrana plasmática. Fatores que inibem o efluxo de colesterol do espermatozoide aumentam a resistência ao choque térmico.

Muitos estudos têm demonstrado que a lipoproteína de alta densidade (HDL) é um receptor de colesterol mais eficiente que a albumina, o que a faz desempenhar modificações espermáticas importantes durante o processo de capacitação (THÉRIEN, MOREAU, MANJUNATH, 1998). A HDL, isolada ou juntamente à proteína BSP, é responsável pelo efluxo de colesterol, o qual predispõe a célula a penetrar nos ovócitos com taxa superior de sucesso quando comparada a espermatozoides sem a redução de colesterol (EHRENWALD; PARKS; FOOTE, 1988). Contudo, há relatos que a exposição contínua do espermatozoide à

proteína BSP pode ocasionar danos à estrutura da célula espermática (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) promove a entrada de fosfolipídeos e colesterol nas células, além de formar um complexo com as proteínas BSP do plasma seminal, prevenindo a saída de fosfolipídios e colesterol da membrana espermática (MANJUNATH et al, 2002). Existem evidências da existência de um receptor de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDLr) no sêmen bovino, que se liga especificamente à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) *in vitro* através da apolipoproteína E e da lipoproteína lipase, que são constituintes de quilomicrons remanescentes (ARGOV et al., 2007).

4 EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO DE PALMA NA DIETA SOBRE A LIPIDEMIA E A QUALIDADE SEMINAL DE TOUROS BUBALINOS (*Bubalus bubalis*)

Artigo a ser submetido a periódico de Qualis mínimo B1.

RESUMO

O presente estudo visou investigar o efeito da suplementação dietética com óleo de palma (óleo de dendê) sobre o perfil sérico lipídico e as características seminais de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*), bem como as correlações existentes entre os parâmetros séricos e seminais avaliados. Doze touros búfalos adultos ($452,2 \pm 49,68$ kg; $3,47 \pm 0,92$ anos) foram alocados em dois grupos distintos: Grupo CONT (n=5) e Grupo ÓLEO (n=7). Ambos os grupos receberam alimentação isoproteica composta por forragem conservada (silagem de milho) e concentrado (milho triturado, farelo de trigo e ureia), em baias coletivas. A relação forragem/concentrado adotada foi de 50%. O acesso ao sal mineral e água ocorreu *ad libitum*. Diferencialmente, à dieta do Grupo ÓLEO foi adicionado óleo de palma ao concentrado (2% na matéria seca). O período experimental teve duração de 130 dias, incluindo a fase de adaptação (14 dias) e dois períodos experimentais (P1 e P2), de 58 dias cada. Os animais tiveram sêmen e o sangue colhidos quinzenalmente. Efeitos significativos ($P < 0,05$) foram observados para triglicerídeos, colesterol, HDL e lipídeos totais, enquanto o período influenciou nas taxas de colesterol, LDL, VLDL e lipídeos totais. Houve decréscimo no turbilhonamento ($P < 0,05$) e discreta redução na integridade de membranas ($P < 0,05$), sendo que a concentração seminal foi sofreu queda no período 2 ($P < 0,05$), nos animais do Grupo ÓLEO. Houve correlação significativa entre triglicerídeos e defeitos menores ($r = -0,412$; $P = 0,006$), LDL e defeitos totais ($r = -0,333$; $P = 0,030$), VLDL e viabilidade espermática ($r = 0,381$; $P = 0,012$), lipídeos totais e defeitos menores ($r = -0,366$; $P = 0,017$) e lipídeos totais e defeitos totais ($r = -0,309$; $P = 0,046$). Assim, o uso de óleo de palma a 2% na dieta não favoreceu efetivamente os parâmetros relacionados com elevação da qualidade seminal e potencial fertilidade dos touros.

PALAVRAS-CHAVE: búfalo, ácidos graxos, lipídeos, perfil sérico, sêmen, óleo de palma.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the effect of dietary supplementation with palm oil on serum and seminal characteristics and their relationship with sperm quality of buffaloes (*Bubalus bubalis*). Twelve breeding buffaloes (452.2 ± 49.68 kg; 3.47 ± 0.92 years) were divided into two distinct groups: Group CONT (n = 5) and Group OIL (n = 7). Animals in

both groups were fed with isoproteic diets composed of forage (corn silage) and concentrated (ground corn, wheat bran and urea), in collective pens. Animals had free access to mineral mix and drinking water. Group OIL was added 2% palm oil in the DM. The ratio forage/concentrate used was 50%. Semen and blood samples were collected every two weeks along all experiment (14 days of adaptation, and 2 experimental periods of 58 days each). Significant effects ($P < 0.05$) were observed for serum triglycerides, cholesterol, HDL and total lipids, while the time have influenced on cholesterol, LDL, VLDL and total lipids. Treatment decreased ($P < 0.05$) gross motility and slightly reduced sperm membrane integrity, and sperm concentration decreased in Period 2, in animals of Group OIL. There were significant correlations between triglycerides and minor defects ($r = -0.412$, $P = 0.006$), LDL and total defects ($r = -0.333$, $P = 0.030$), VLDL and viability ($r = 0.381$, $P = 0.012$), total lipids and minor defects ($r = -0.366$, $P = 0.017$) and total lipids and totals defects ($r = -0.309$, $P = 0.046$). Thus, the incorporation of palm oil at 2% in DM had no positive effect on seminal quality or potential bulls' fertility.

KEYWORDS: buffalo, fat acids, lipids, serum profile, semen, palm oil.

4.1 INTRODUÇÃO

Diferentes tipos de gorduras têm sido utilizados na dieta de ruminantes, na tentativa de melhorar sua função reprodutiva (GANDRA et al., 2011; SANTOS et al, 2011; BEGERON et al., 2007), com destaque para os ácidos graxos derivados de plantas e sementes oleaginosas (ADEEL et al., 2009). A suplementação alimentar com fontes lipídicas desencadeia eventos metabólicos importantes para a reprodução e podem interferir em eventos primordiais para o sucesso da fertilização, como a maturação e a capacitação espermática, nos quais ocorrem modificações lipídicas na membrana plasmática (MOREAU; MANJUNATH, 2000).

O óleo de palma (também conhecido como óleo de dendê) é um óleo retirado do mesocarpo do dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), rico em ácidos graxos insaturados (FURLAN JÚNIOR et al., 2006), e tem sido utilizado em diversas pesquisas no âmbito da produção animal (COSTA et al., 2009; SOARES et al, 2010; SANTOS et al, 2011). Em virtude da crescente produção mundial de óleo de palma (USDA, 2008), esse produto vem sendo empregado não somente na alimentação humana, mas também para animais (BAHIA, 2006; ABDALLA et al, 2008). De acordo com o IBGE (2010), o Pará é o principal produtor nacional de dendê, sendo responsável por 81,87% da produção. Assim, o aproveitamento de produtos gerados pelas agroindústrias regionais, no caso, estado do Pará, pode ser uma

alternativa para alimentação de ruminantes, pois o fruto é disponível e industrializado o ano todo.

Em ruminantes, o aumento dos níveis lipídicos na dieta ocasiona elevação nos parâmetros séricos de colesterol, triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipídeos totais (RANJAN et al., 2012). Os triglicerídeos são a principal forma de armazenamento de energia do animal. Após sofrerem ação dos sais biliares e do suco pancreático no intestino delgado, são absorvidos na forma de micelas pelos enterócitos. Nas células intestinais as micelas são englobadas pelo retículo endoplasmático, ocasionam a ressíntese dos triglicerídeos (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). O colesterol é secretado no plasma seminal pelas glândulas prostáticas e tem como função básica proteger as células espermáticas contra choques do meio (SOFIKITIS; MIYAGAWA, 1991). Sabe-se que o colesterol desempenha importante função no metabolismo, sendo precursor do éster de colesterol, ácido biliar e hormônios esteroides, como a testosterona (VANCE; VANCE, 2002).

A função do VLDL no metabolismo lipídico inclui o prolongamento da utilização de energia, pois o mesmo é responsável pelo transporte de triglicerídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos (TACKEN et al., 2001). Já o HDL está envolvido no efluxo de colesterol espermático durante o processo de fecundação, induzindo à reorganização da membrana plasmática e consequente diminuição na proporção fosfolipídeos/colesterol (MANJUNATH; THERIEN, 2002). Isso facilita a reação acrossomal, que ocorre durante a capacitação espermática no oviduto (TRAVIS; KOPF, 2002).

Quando os bubalinos são criados sob diferentes condições climáticas, ambientais e de manejo, variações podem ocorrer no sistema sanguíneo, tornando os parâmetros séricos relatados na literatura mundial inconsistentes para generalizações (NALAVADE et al., 2002; NIKAN et al, 2005; TAKIJ; NAZIF, 2011; RANJAN et al., 2012). Por isso, existe a necessidade de se investigar a ação da suplementação alimentar energética sobre o nível sérico de lipídeos e como as possíveis alterações desse perfil lipídico se relacionam a certos parâmetros reprodutivos masculinos. A partir disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação do óleo de palma na dieta sobre o perfil lipídico sérico de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e sua relação com as características físicas e morfológicas do sêmen *in natura*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Local, Período e Animais Experimentais

As atividades experimentais de campo foram realizadas na Unidade de Pesquisa Animal “Senador Álvaro Adolpho” da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pará (1°28’S, 48°27’W). A área apresentava incidência do tipo climático Afi (quente e úmido), com chuvas bem distribuídas ao longo do ano. As atividades laboratoriais de análise seminal foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Amazônia Oriental, enquanto a análise do perfil de ácido graxos das dietas foi feita no Laboratório de Medidas Físicas, da Universidade Federal do Pará, ambos em Belém, Pará.

Como doadores de sêmen, foram utilizados 12 touros bubalinos, com idade média de $3,47 \pm 0,92$ anos, peso médio inicial de $456,8 \pm 50,4$ kg, previamente selecionados dentre um lote de animais criados a pasto para posterior confinamento. Foram considerados como critério de seleção suas características físicas, clínicas, idade, peso e circunferência escrotal. Como critério balizador para ingresso no experimento, todos os animais apresentavam avaliação andrológica positiva antes do início do ensaio (CBRA, 1998).

Todos os procedimentos adotados respeitaram os princípios bioéticos preconizados em experimentação animal (PAIXÃO, 2005) e o protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE/UFGPA - Parecer BIO042-12), conforme Anexo 1. O período experimental ocorreu entre os meses de setembro de 2011 a janeiro de 2012, totalizando 130 dias, correspondente ao período de adaptação dos animais (14 dias) e dois períodos consecutivos (P1 e P2) de 58 dias. Os períodos foram definidos para possibilitar a constatação do efeito das dietas ao longo do tempo, em função da fisiologia reprodutiva do touro bubalino, pois cada período correspondeu ao tempo médio requerido para ocorrência de duas espermatogêneses completas, além do tempo necessário para trânsito seminal, armazenamento epididimário e ejaculação (SHARMA; GUPTA, 1980).

4.2.2 Manejo Alimentar

Os animais foram mantidos em regime de confinamento em dois lotes distintos, sendo relativos ao Grupo Controle (CONT; n=5) e ao Grupo Tratamento (ÓLEO; n=7). Os animais passaram por período de 14 dias para adaptação às instalações e ao manejo no confinamento. Os dois grupos receberam diariamente dieta em cocho coberto composta por forragem (silagem de milho) e concentrado (milho triturado, farelo de trigo e ureia). Como diferencial, os animais do Grupo ÓLEO receberam suplementação energética com óleo de palma,

referente a 2% da dieta, com base na matéria seca (Tabela 2), o qual foi adicionado à fração do concentrado.

Tabela 2: Composição das dietas oferecidas aos touros bubalinos de acordo com o tratamento alimentar. Belém, Pará, 2012.

INGREDIENTES	GRUPOS	
	CONT	ÓLEO
Silagem de Milho (%)	50,00	50,00
Farelo de Trigo (%)	19,90	19,25
Milho triturado (%)	29,50	28,00
Ureia (%)	0,60	0,70
Óleo de Palma (%)	-	2,05
COMPOSIÇÃO*		
PB (%)	12,37	12,33
EE (%)	3,47	5,43
FDN (%)	32,12	31,51
FDA (%)	23,95	23,59
MS (%)	61,04	59,13

*PB: Proteína Bruta; NDT: Nutrientes Digestíveis Totais; EE: Extrato Etéreo; FDN: Fibra em Detergente Neutro; FDA: Fibra em Detergente Ácido; MS: Matéria Seca.

O milho, o farelo de trigo, a uréia e, para o Grupo ÓLEO, o óleo de palma foram misturados quinzenalmente na Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA e posteriormente misturados à silagem de milho, no momento do seu fornecimento. As rações foram formuladas de acordo com Paul e Lal (2010), sendo isoproteicas (~12% de proteína bruta) e foram administradas duas vezes ao dia, em cochos coletivos, de forma a promover consumo *ad libitum* aos animais. Diariamente, pela manhã, antes da primeira alimentação, foram removidas e pesadas as sobras do dia anterior, para ajustes da quantidade ofertada. Os animais foram individualmente pesados a cada 15 dias em balança eletrônica, após jejum alimentar de 12 horas. Os animais tiveram acesso irrestrito à água em bebedouro automático e a sal mineral em cocho coberto. O período de arraaçamento foi de 130 dias (considerando adaptação + Período 1 + Período 2). O consumo de alimentos foi monitorado diariamente, sendo calculado pela diferença entre o alimento oferecido e as eventuais sobras, que foram retiradas do cocho.

4.2.3 Perfil dos Ácidos Graxos da Dieta

A extração lipídica dos ingredientes da rações experimentais foi realizada no Laboratório de Medidas Físicas da Universidade Federal do Pará – LAMEF/UFPA, de acordo com metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959) e o perfil lipídico foi obtido por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). Os óleos foram convertidos para seu éster metílico correspondente. Os ésteres metílicos foram preparados através de saponificação e esterificação com hidróxido de potássio em metanol (0,1 mol/L) e ácido clorídrico em metanol (0,12 mol/L). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram extraídos com hexano e avaliados em cromatógrafo a gás (CP 3380 Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, EUA) equipado com coluna capilar de sílica fundida (CP-Sil 88 de 60 m x 0,25 mm) e detector de ionização de chama. O hélio foi utilizado como gás de transporte. O programa de temperatura usado foi: 3 min. a 130°C; aquecimento gradual até 220°C durante 9 min.; 35 min. a 220°C. A temperatura do detector foi de 280°C e a temperatura do injetor foi de 245°C. Os picos de ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção, sendo que a curva de calibração foi feita com uma mistura de FAMES padrão (Nucheck 74X). Cada amostra FAME foi analisada em triplicada (RODRIGUES; DARNET; SILVA, 2010). Os perfis lipídicos das dietas estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Perfil dos ácidos graxos das dietas experimentais. Belém, Pará, 2012.

ÁCIDOS GRAXOS	GRUPOS	
	CONT (%)	ÓLEO (%)
Saturado		
C8:0(Caprílico)	0,05	0,05
C10:0 (Cáprico)	0,05	0,05
C12:0 (Láurico)	0,17	0,17
C14:0 (Mirístico)	0,27	0,26
C16:0 (Palmítico)	16,25	16,93
C18:0 (Esteárico)	1,51	2,61
C20:0 (Araquídico)	1,37	1,36
Insaturado		
C16:1 (Palmitoleico)	0,22	0,22
C18:1n9 (Oleico)	36,18	36,38
C18:2n6 (Linoleico)	41,96	40,90
C18:3n3 (Linolênico)	0,39	0,38
Não detectados	0,58	0,69
Total	100,00	100,00

*CONT: concentrado controle; ÓLEO: concentrado enriquecido com óleo de palma (2%MS).

4.2.4 Método de Colheita do Sêmen

Os animais passaram por colheitas de sêmen quinzenais, as quais foram realizadas desde a entrada dos animais em confinamento, sendo realizadas, no mínimo, nove colheitas por animal, totalizando 117 ejaculados colhidos e analisados. Previamente à colheita seminal, os touros tiveram a região prepucial externa higienizada com água e sabão neutro, e a região prepucial interna foi higienizada com solução fisiológica aquecida a 37°C. Para a colheita seminal, a técnica adotada foi a vagina artificial, conforme Hafez (2004). O sêmen foi colhido em tubos pré-aquecidos a 36°C e revestidos por material isolante térmico opaco, para evitar variações de temperatura e incidência direta de luz solar (ADEEL et al, 2009).

4.2.5 Avaliação Seminal Imediata

Imediatamente após a colheita, foram avaliados volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor, pH, concentração e integridade da membrana plasmática. O volume do ejaculado foi determinado em instrumento volumétrico em mililitros (mL), enquanto cor e aspecto foram avaliados em escalas visuais (CHACUR; ARAÚJO; KRONKA, 2006). O turbilhonamento, ou movimento de massa, foi avaliado como o movimento em forma de ondas em uma gota de 20 µL de sêmen *in natura*, colocada sobre lâmina previamente aquecida a 37°C, observada em microscópio óptico, sob aumento de 40X (Eclipse 200[®], Nikon, Tóquio, Japão). A interpretação dada foi em escala de zero a cinco, onde zero é a ausência de turbilhão e cinco o valor máximo dado a um acentuado movimento de massa (VALE, 2002).

Para avaliar a motilidade progressiva, uma alíquota de 7µL do ejaculado foi depositada sobre lâmina de vidro para microscopia, previamente aquecida a 37°C em mesa aquecedora, coberta com lamínula também aquecida a 37°C e levada ao microscópio óptico binocular, sob aumento de 100X. O resultado da motilidade espermática foi dado em escala de 0 a 100%, considerando apenas as células com movimento progressivo. Foram avaliados, no mínimo, cinco campos visuais em cada amostra, sempre pelo mesmo avaliador, de modo a minimizar a influência da heterogeneidade de campos observados sobre o resultado. O vigor foi avaliado concomitantemente à motilidade, e o resultado foi dado de acordo com a força da movimentação progressiva individual em uma escala de 0 (ausência) a 5 (máxima). O pH foi avaliado em peagâmetro, com a retirada de uma alíquota suficiente para realização do teste, com resultado expresso em escala de 1 a 14 (VALE, 2002).

A concentração espermática foi mensurada em espectrofotômetro, sob diluição de 1:100 em solução de formalina tamponada, e a conversão para o número de células por mL de

sêmen foi realizada de acordo com as especificações do fabricante em absorvância de 530 nm (Accucell[®], IMV Technologie, França), sendo o resultado expresso em $\times 10^6$ spz/mL.

4.2.6 Teste Hiposmótico (HOS)

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada pelo teste hiposmótico (solução de 0,735g de citrato de sódio e 1,351g de frutose para 100 mL de água destilada; 190 mOsm/kg). As amostras para avaliação foram preparadas pela adição de 50 μ L de sêmen *in natura* a 500 μ L da solução hiposmótica e incubadas a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, 250 μ L de formalina tamponada foi adicionada à amostra para fixação das células para análise. Uma alíquota de 10 μ L foi examinada em microscópio de contraste de fase, sob aumento total de 1000X. Foram contados 200 espermatozoides por amostra e classificados como tendo membrana plasmática íntegra ou lesionada, sendo o resultado expresso em porcentagem (KHAN; IJAZ, 2008).

4.2.7 Viabilidade e Morfologia Espermática

A viabilidade espermática foi determinada com preparação de esfregaços corados com eosina-nigrosina (MOCÉ; GRAHAM, 2008), sendo as amostras analisadas sob microscopia óptica, com aumento de 1000X (GALLOWAY, 1974). Foram contadas e classificadas 200 células por amostra, e o resultado expresso em porcentagem. Para avaliar a morfologia espermática, alíquotas de 100 μ L de sêmen foram diluídas em 1000 μ L de formalina tamponada. A avaliação das anormalidades espermáticas foi realizada em microscopia de contraste de fase sob aumento de 1000X. Foram contadas 200 células por lâmina, as quais foram individualmente classificadas e agrupadas em defeitos maiores ou defeitos menores, sendo o resultado apresentado em porcentagem (BLOM, 1973).

4.2.8 Avaliação Lipídica no Soro Sanguíneo

O sangue foi coletado quinzenalmente por venopunção jugular sem adição de anticoagulantes, sendo posteriormente centrifugado para remoção do soro, o qual foi armazenado em microtubos. As coletas ocorreram pelo período da manhã, após jejum alimentar de 12 horas (n=114) para evitar interferência pós-prandial dos valores lipêmicos. As amostras foram imediatamente congeladas em freezer a -20°C, onde foram mantidas até o momento das análises do perfil lipídico. A metodologia utilizada para avaliação do colesterol foi enzimática, com qualidade analítica de erro total $\leq 9,0\%$, bias $\leq 3,0\%$ e CV $\leq 3,0\%$, conforme preconizado pelo *National Cholesterol Education Program* (NCEP, 1985), seguindo

técnica especificada (Colesterol Liquiform®, Colesterol HDL® e Triglicérides Liquiform®; Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa-MG, Brasil). O valor de LDL foi obtido com uso da equação de Friedewald, qual seja: Colesterol LDL = Colesterol Total - (HDL + VLDL). Já a fração VLDL foi obtida pela fórmula (Triglicérides (mg/dL)/5) enquanto os lipídeos totais representam a soma de triglicérides e colesterol total. As análises foram realizadas em analisador bioquímico semiautomático microprocessado (TP-Analyzer Basic®, Thermoplate, China).

4.2.9 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos, avaliados em dois períodos de 58 dias, em um arranjo fatorial 2x2. No primeiro momento, os dados foram testados quanto à normalidade da distribuição pelo comando PROC UNIVARIATE opção normal do *Statistical Analysis System* (SAS, 1993). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados empregando Log de 10. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a fim de testar o efeito de tratamento, período e a interação entre os dois fatores. A comparação de médias foi realizada através do teste de Tukey. Ainda, foi estabelecida a correlação de Pearson entre as variáveis do lipidograma e as variáveis de parâmetros seminais *in natura*. O nível de significância adotado nas análises foi de 5% ($P < 0,05$).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Consumo dos Alimentos

Os resultados dos consumos médios diários pelos búfalos que receberam as dietas controle ou com inclusão de óleo de palma são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Consumo de matéria seca (MS), matéria seca por peso vivo (MSPV), proteína, extrato etéreo (EE) e ácidos graxos (AG) por búfalos alimentados com dietas sem e com inclusão de óleo de palma. Belém, Pará, 2012.

Consumo Médio Diário	CONT	ÓLEO
MS (kg/animal)	11,30 ± 2,59	11,35 ± 2,91
MSPV (%)	2,0	2,03
Proteína (kg/animal)	1,36	1,37
EE (kg/animal)	0,39	0,62
AG (g/animal)		
Saturados		
C8:0(Caprílico)	0,20	0,31
C10:0 (Cáprico)	0,20	0,31
C12:0 (Láurico)	0,67	1,05
C14:0 (Mirístico)	1,06	1,60
C16:0 (Palmítico)	63,72	104,34
C18:0 (Esteárico)	5,92	16,08
C20:0 (Araquídico)	5,37	8,38
Total Saturados	77,13	132,07
Insaturados		
C16:1 (Palmitoleico)	0,83	1,35
C18:1n9 (Oleico)	141,86	224,21
C18:2n6 (Linoleico)	164,53	252,07
C18:3n3 (Linolênico)	1,53	2,34
Total Insaturados	308,79	479,97
Não detectados	6,19	4,25
Relação insaturados/saturados	4,00	3,63

*CONT: concentrado controle; ÓLEO: concentrado enriquecido com óleo de palma (2%MS).

Os consumos de matéria seca, matéria seca por peso vivo e proteína não variaram entre grupos. Contudo, foi observado que os animais do Grupo ÓLEO apresentaram maior consumo de extrato etéreo, com incremento de consumo de AGS em 71,23% e de AGI em 55,44%, em relação aos animais do Grupo CONT.

4.3.2 Níveis Séricos de Lipídeos

Os valores de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e lipídeos totais, em mg/dL, estão apresentados na Tabela 5. Observou-se que os níveis de colesterol total, HDL e lipídeos totais ($70,98 \pm 13,91$; $41,16 \pm 7,90$; $89,30 \pm 14,66$, respectivamente) dos animais do Grupo ÓLEO foram significativamente mais elevados quando comparados ao Grupo CONT ($61,44 \pm 16,00$; $33,91 \pm 6,81$; $80,65 \pm 17,22$, respectivamente) ($P < 0,05$).

Tabela 5: Níveis séricos de lipídeos (Média ± DP) de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma. Belém, Pará, 2012.

VARIÁVEIS (mg/dL)	GRUPO		CV (%)
	CONT	ÓLEO	
Triglicerídeos	19,21 ± 6,10 ^A	18,32 ± 4,75 ^A	28,74
Colesterol	61,44 ± 16,00 ^B	70,98 ± 13,91 ^A	21,41
HDL	33,91 ± 6,81 ^B	41,16 ± 7,90 ^A	19,47
LDL	23,25 ± 14,94 ^A	25,75 ± 12,70 ^A	52,37
VLDL	4,27 ± 1,37 ^A	4,07 ± 1,18 ^A	29,77
Lipídeos Totais	80,65 ± 17,22 ^B	89,30 ± 14,66 ^A	17,74

*Médias seguidas de letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Considerando os períodos, houve diferença significativa do primeiro para o segundo período para as variáveis lipídicas, com exceção de triglicerídeos e HDL (Tabela 6).

Tabela 6: Níveis séricos de lipídeos (Média ± DP) de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma, de acordo com os períodos experimentais (58 dias cada). Belém, Pará, 2012.

VARIÁVEIS (mg/dL)	PERÍODO		CV (%)
	P 1	P 2	
Triglicerídeos	18,22 ± 4,29 ^A	19,28 ± 6,43 ^A	28,74
Colesterol	63,58 ± 17,53 ^B	71,37 ± 11,17 ^A	21,41
HDL	38,06 ± 8,82 ^A	37,62 ± 7,54 ^A	19,47
LDL	20,58 ± 15,85 ^B	29,90 ± 7,74 ^A	52,37
VLDL	4,40 ± 1,19 ^A	3,86 ± 1,28 ^B	29,77
Lipídeos Totais	81,80 ± 18,00 ^B	90,65 ± 12,29 ^A	17,74

*Médias seguidas de letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.3.3 Características do Sêmen *in natura* e Correlações com Lipídeos Séricos

Observou-se que a dieta contendo óleo de palma não afetou de forma significativa volume, pH, motilidade, vigor, viabilidade espermática e defeitos espermáticos (P>0,05) do sêmen *in natura* (Tabela 7). Em contrapartida, touros do Grupo CONT apresentaram

turbilhonamento espermático e integridade de membrana plasmática significativamente superiores ao Grupo ÓLEO ($P < 0,05$).

Tabela 7: Avaliação dos parâmetros seminais *in natura* de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma. Belém, Pará, 2012.

VARIÁVEIS	GRUPO		CV(%)
	CONT	ÓLEO	
Volume (mL)	3,71 ± 1,23 ^A	3,61 ± 1,74 ^A	42,87
pH (1-14)	6,37 ± 0,41 ^A	6,26 ± 0,39 ^A	6,4
Turbilhonamento (0-5)	2,85 ± 0,82 ^A	2,38 ± 0,56 ^B	25,72
Motilidade progressiva (%)	54,78 ± 11,39 ^A	59,1 ± 16,06 ^A	23,88
Vigor (0-5)	3,06 ± 0,46 ^A	3,15 ± 0,38 ^A	13,18
Viabilidade Espermática (%)	68,18 ± 10,59 ^A	61,72 ± 16,70 ^A	22,19
Defeitos Totais (%)	20,43 ± 9,63 ^A	19,2 ± 7,45 ^A	41,92
Integridade de Membrana - HOS (%)	72,34 ± 8,64 ^A	63,26 ± 12,05 ^B	15,73

*Médias seguidas de letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Foi observada interação entre o efeito da dieta e período experimental sobre os resultados de concentração espermática (Tabela 8). Enquanto no Grupo CONT os animais não apresentaram diferenças significativas nos valores de concentração espermática do primeiro para o segundo período, os animais do Grupo ÓLEO tiveram redução nesse parâmetro, da ordem de 25%. Contudo, não houve diferença ($P > 0,05$) nos valores apresentados pelos animais de CONT e ÓLEO dentro de cada período.

Tabela 8: Comparação da concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL) de touros bubalinos alimentados com ração convencional ou enriquecida com óleo de palma, conforme dieta e período. Belém, Pará, 2012.

PERÍODO	GRUPO	
	CONT	ÓLEO
1	1.472,60 ^{Aa}	1.841,17 ^{Aa}
2	1.641,45 ^{Aa}	1.377,92 ^{Ab}

CV(%) = 28,14 Médias seguidas de letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste “t” ($P < 0,05$). Médias seguidas de letras minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste “t” ($P < 0,05$).

As correlações significativas entre bioquímica sérica e qualidade seminal dos ejaculados *in natura* são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9: Correlação de Pearson entre as variáveis triglicerídeos e defeitos menores, LDL e defeitos totais, VLDL e viabilidade espermática, e lipídeos totais e defeitos totais. Belém, Pará, 2012.

	Viabilidade Espermática	Defeitos Menores	Defeitos Totais
Triglicerídeos	r = 0,267 P = 0,088	r = -0,412 P = 0,006*	r = -0,281 P = 0,071
LDL	r = -0,099 P = 0,530	r = -0,293 P = 0,060	r = -0,333 P = 0,030*
VLDL	r = 0,381 P = 0,012*	r = -0,193 P = 0,222	r = -0,077 P = 0,628
Lipídeos Totais	r = -0,015 P = 0,926	r = -0,366 P = 0,017*	r = -0,309 P = 0,046*

*(P<0,05).

Foi observada correlação negativa de média intensidade e significativa para triglicerídeos e defeitos menores (r=-0,412; P=0,006), LDL e defeitos totais (r=-0,333; P=0,030), lipídeos totais e defeitos menores (r=-0,366; P= 0,017), e lipídeos totais e defeitos totais (r=-0,309; P= 0,046). Já a correlação entre VLDL e viabilidade espermática (r=0,381; P=0,012) foi positiva e significativa, de média intensidade.

4.4 DISCUSSÃO

Não houve diferença entre grupos no consumo médio diário das rações, o que era esperado, pois a quantidade de extrato etéreo nas rações formuladas, supostamente, não teria efeito inibidor no consumo, mesmo na ração em que o óleo de palma foi adicionado. Contudo, ainda que com um consumo médio diário igual entre os grupos, a ingestão de ácidos graxos pelos animais do Grupo ÓLEO foi superior a dos animais do Grupo CONT, em função da composição bromatológica das dietas, cujo nível de extrato etéreo era mais elevado no grupo que recebeu adição de óleo de palma. Por isso, em termos absolutos, houve maior consumo de ácidos graxos insaturados (479,97 g/animal/dia) para o Grupo ÓLEO em relação aos animais do Grupo CONT (308,79 g/animal/dia).

Além dos efeitos nutricionais, os lipídios desempenham funções estruturais e de regulação celular, tendo importante influência na funções fisiológicas, de modo que não podem ser considerados apenas como uma fonte de energia. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), principalmente os pertencentes ao grupos ômega-3 (ω 3) e ômega-6 (ω 6), são considerados potentes mediadores intracelulares e intercelulares, sendo precursores para a síntese dos eicosanoides, e moduladores da rede de sinalização celular e da fluidez da membrana celular (POMPEIA et al., 2000).

A integridade e a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides são determinadas pelo perfil de ácidos graxos, o que torna a composição dos ácidos graxos de vital importância para a fertilidade do macho (ZERON et al, 2002). Os fosfolipídeos das membranas espermáticas de mamíferos contêm caracteristicamente proporções elevadas de ácidos graxos poli-insaturado de cadeia longa (C:22), particularmente série ω -3 (DOLATPANAH et al., 2008). Uma vez que a quantidade de PUFAs consumida determina diferentes proporções dos mesmos na composição da membrana espermática (MALDJIAN et al., 2005) e que os ácidos graxos ω 3 e ω 6 são os principais PUFAs encontradas nos espermatozoides de búfalos, representando mais de 70% do total dos ácidos insaturados (JAIN, 1976), o maior consumo de ω 3 e ω 6 em bubalinos pode ser benéfico à qualidade seminal. A julgar pelo consumo mais elevados de ω 3 e ω 6 no Grupo ÓLEO, impactos sobre o perfil lipídico e na qualidade seminal eram esperados.

Desconsiderando os períodos estudados, a dieta enriquecida com óleo de palma causou elevação nas taxas séricas de lipídeos totais, colesterol e HDL, sem, contudo, influenciar os níveis de triglicerídeos, LDL e VLDL. Os níveis de colesterol sérico observados, tanto para o Grupo CONT ($61,44 \pm 16,00$ mg/dL) quanto para o Grupo ÓLEO ($70,98 \pm 13,91$ mg/dL) são superiores aos encontrados em touros bubalinos por Nalavade et al. (2002), de $49,08 \pm 2,01$ mg/dL. Contudo, foram inferiores ao encontrado em novilhas bubalinas ($102,3$ mg/dL) por Gandra et al. (2011). O colesterol é o principal composto esterol da membrana plasmática de espermatozoides e sabe-se que o teor de colesterol da membrana é modulado desde o testículo até o trato reprodutivo feminino, estando em maior concentração no trajeto epididimário e desprendendo-se da membrana espermática quando da passagem do espermatozoide pelo trato reprodutivo da fêmea (NOLAN; HAMMERSTEDT, 1997).

Uma vez que os níveis de lipídeos, entre eles o colesterol, detectados no sangue e no plasma seminal têm relação direta com a fertilidade de touros (BEER LJUBIC et al., 2009), diferenças nos parâmetros seminais e incremento na qualidade seminal dos touros bubalinos alimentados com dieta na qual foi adicionado o óleo de palma era esperada. As maiores taxas

séricas de colesterol têm consequência sobre seus níveis no plasma seminal, e reduzem o processo de capacitação espermática precoce, por inibir os rearranjos de fosfolipídeos e colesterol e, conseqüentemente, a reação acrossômica (TRAVIS; KOPF, 2002).

Sabe-se que, durante a capacitação espermática, o colesterol é um importante marcador da qualidade seminal, devido a seu efluxo, sendo que o influxo de colesterol inibe a reação acrossômica e, conseqüentemente, a fecundação (THERIEN; MOREAU; MANJUNATH, 1998). De acordo com Travis e Kopf (2002), a remoção de colesterol ocorre devido à translocação de fosfolipídeos mediante mudanças na dinâmica da membrana espermática, e, por isso, os rearranjos de fosfolipídeos e colesterol promovem maior fluidez e flexibilidade à membrana espermática, o que facilita a reação acrossomal.

Os valores de HDL observados no Grupo CONT ($33,91 \pm 6,81$ mg/dL) corroboram os achados de Gandra et al. (2011), que observaram 33,70 mg/dL em bubalinos alimentados com silagem de milho. Os valores encontrados no Grupo ÓLEO ($41,16 \pm 7,90$ mg/dL) indicam que o enriquecimento da dieta com óleo de palma, além de oferecer maior densidade energética, é capaz de elevar em aproximadamente 21% os níveis de HDL sérico nos touros bubalinos que a consumiram. Trabalho de Nikan et al. (2005) indica que touros bubalinos das raças Surti e Murrah alimentados sob um plano convencional para animais em regime de coleta de sêmen (forragem + concentrado diário) apresentaram níveis de HDL no plasma seminal de $12,95 \pm 1,95$ e $16,04 \pm 0,76$ mg/dL, respectivamente. A capacitação espermática, além de estar diretamente relacionada aos níveis de colesterol, está intimamente vinculada aos níveis de HDL, o qual, de forma isolada ou conjuntamente às proteínas BSP, desempenha a retirada do colesterol/fosfolipídeos da membrana. Assim, quanto maior o nível de colesterol, maior a alteração na organização dos domínios lipídicos, o que favorece a diminuição da fluidez da membrana (THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH, 1998). O efluxo de colesterol é tempo-dependente da concentração, ou seja, se as células espermáticas ficam expostas a grande volume de plasma seminal por um longo período, conseqüentemente haverá efluxo lipídico contínuo, devido à maior exposição ao HDL, o que pode ser prejudicial à célula, ocasionando a capacitação espermática (BERGERON et al, 2004), evento desejável que ocorra apenas quando o espermatozóide se encontre no trato reprodutivo feminino.

As variáveis bioquímica LDL e VLDL não apresentaram diferença estatística significativa entre grupos. O perfil bioquímico sérico de LDL dos animais dos Grupos CONT e ÓLEO ($23,25 \pm 14,94$ mg/dL e $25,75 \pm 12,70$ mg/dL, respectivamente) divergiu do trabalho de Gandra et al. (2011), que observaram 60,04 mg/dL em búfalas Mediterrâneas alimentadas com silagem de milho e suplementação com misturas minerais, demonstrando o impacto das

diferenças alimentares e metabólicas sobre os níveis de LDL no sangue. Em termos reprodutivos, estudos prévios comprovaram que o LDL promove a incorporação e impede a saída de fosfolipídios e colesterol da membrana espermática, pela formação de um complexo com as proteínas BSP do plasma seminal. Dessa forma, maiores níveis de LDL séricos poderiam elevar a concentração dos metabólitos no plasma seminal e, por sua ação, conferir às células maior resistência ao choque térmico, impedindo que as proteínas do plasma seminal fiquem disponíveis para atuar na membrana espermática, evitando o efluxo de fosfolipídios e colesterol (BERGERON; MANJUNATH, 2006). Contudo, a ausência de diferença significativa do LDL nos Grupos CONT e ÓLEO faz-nos pressupor que a incorporação de óleo na dieta não modificaria o nível de proteção lipídica das células à criopreservação, por ação direta dos níveis de LDL no plasma seminal, o que necessita ser efetivamente investigado.

Já os valores de VLDL sérico ($4,27 \pm 1,37$ mg/dL e $4,07 \pm 1,18$ mg/dL) para os animais dos Grupos CONT e ÓLEO, respectivamente, estão abaixo dos parâmetros encontrados por Gandra et al. (2011) (6,56 mg/dL) e dos dados descritos por Ranjar et al. 2012 (16,27 mg/dL), ao fornecerem gordura protegida para fêmeas bubalinas em lactação. Ao confrontar os resultados obtidos com os dados da literatura mundial, observa-se que a categoria animal, o sexo, a condição nutricional, a alimentação e a lactação determinam grande variação nos parâmetros fisiológicos de lipídeos sanguíneos. A presença de receptores para VLDL em espermatozoides bovinos sugere que estes utilizam lipídeos extracelulares, estando o papel desses receptores associado ao prolongamento da utilização de energia e ao provimento para o espermatozóide de metabólitos essenciais, tais como triglicérides, fosfolípidos e ácidos graxos (ARGOV et al., 2007). Portanto, sugere-se que o papel do VLDL no metabolismo lipídico esteja relacionado à maior eficiência na utilização de energia celular (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Por isso, os espermatozoides podem ser capazes de realizar maior incorporação de triglicérides e de ácidos graxos, eventos essenciais para a substituição dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos insaturados, e para a produção de uma membrana plasmática mais maleável, característica interessante para elevar a eficiência dos processos de criopreservação celular, processo no qual há expressivas passagens de fluidos pela membrana plasmática e incremento no volume total da célula. De fato, os dados obtidos na correlação entre VLDL e viabilidade espermática ($r=0,381$; $P=0,012$) corroboram esta teoria, confirmando que quanto maior a quantidade sérica de VLDL, maior a viabilidade seminal, avaliada pelo teste de eosina-nigrosina.

Os níveis séricos de lipídeos totais no Grupo ÓLEO ($89,30 \pm 14,66$ mg/dL) foram superiores ao encontrado no Grupo CONT ($80,65 \pm 17,22$ mg/dL), fato que pode ser atribuído essencialmente à alimentação. Entretanto, os dados observados foram inferiores aos apresentados previamente para touros bubalinos, de $213,26$ mg/dL e $324,74 \pm 3,81$ mg/dL (RANJAN et al., 2012; NALAVADE et al., 2002). Sob este prisma, incrementos nos lipídeos séricos totais, caso associados a um aumento paralelo nos níveis de lipídeos totais no plasma seminal, como ocorre em bovinos (BEER-LJUBIC et al., 2009), poderiam representar uma ameaça à integridade de membrana espermática. Paradoxalmente, se por um lado a adição de óleo à dieta é benéfica às células espermáticas devido aos efeitos diretos do colesterol e do VLDL nos processos de capacitação espermática e na fluidez das membranas celulares, respectivamente, o possível incremento dos lipídeos totais no plasma seminal poderia elevar as taxas de peroxidação lipídica no sêmen por ação das espécies reativas de oxigênio (ROS), comprometendo a estrutura e a funcionalidade espermática. Os valores encontrados para integridade de membrana plasmática aferida pelo teste hiposmótico no Grupo ÓLEO ($63,26 \pm 12,05\%$) em relação ao Grupo CONT ($72,34 \pm 8,64\%$) confirmam uma redução na integridade de membrana do sêmen *in natura* em animais alimentados com dieta enriquecida com óleo de palma. Vale ressaltar que os PUFAs são vulneráveis aos ataques das ROS, sendo a peroxidação lipídica um dos efeitos patológicos associado à membrana espermática, que pode ser definida como deterioração oxidativa dos PUFAs (AGARWAL; SALEH, 2002) e consequente modificação na estrutura e fluidez da membrana plasmática do espermatozoide, com perda da capacidade para a fusão aos ovócitos e fertilização (DOLATPANAH et al., 2008; MAMMOTO et al., 1996).

Curiosamente, ao observar a correlação entre lipídeos totais e defeitos totais ($r=-0,309$; $P= 0,046$), lipídeos totais e defeitos menores ($r=-0,366$; $P= 0,017$), triglicerídeos e defeitos menores ($r=-0,412$; $P=0,006$) e LDL e defeitos totais ($r=-0,333$; $P=0,030$), as associações foram significativas, negativas e de média intensidade. É possível que, mesmo se a elevação dos lipídeos totais fosse prejudicial à qualidade seminal em bubalinos, esse efeito não tenha sido detectado na morfologia seminal e as injúrias tenham ficado restritas à ultraestrutura das membranas, cujo diagnóstico não é possível pela técnica de microscopia com contraste de fase, adotada para as análises. Por outro lado, a incorporação de óleo de palma à dieta não alterou significativamente os níveis de defeitos morfológicos totais nos ejaculados entre grupos, mas as correlações negativas entre lipídeos séricos e defeitos espermáticos sugerem efeitos benéficos à morfologia seminal, porque a elevação da concentração lipídica favorece as espermatogônias durante a fase inicial de gametogênese, sendo necessária nos processos de

meiose e diferenciação dos espermátocitos (SCHENK; HOEGGER, 2010), o que demonstra que quanto maior a elevação lipídica nesta fase, menores impactos negativos sobre a diferenciação espermatogênica.

Sabe-se que os ácidos graxos insaturados são necessários para a integridade de membrana e motilidade espermática. Entretanto, sabe-se, também, que esses ácidos graxos apresentam maior predisposição à peroxidação lipídica, reduzindo a proporção AGI/AGS. Foi observado que no Grupo ÓLEO essa relação foi menor (3,63 versus 4,0). Reduções na relação AGI/AGS podem estar relacionadas a danos morfológicos, como já observado em amostras seminais de homens astenozoospermicos (TAVILANI et al., 2006), o que iniciou recentes discussões sobre o papel desta relação como base comum para a ocorrência de patologias espermáticas. Recentemente, foi também descoberto em humanos que o consumo de ácidos graxos saturados é negativamente relacionado à concentração espermática (ATTAMAN et al., 2012). É possível que esta situação também ocorra em machos bubalinos, uma vez que foi observada redução da concentração espermática média ao longo do tempo nos animais alimentados com ração enriquecida com óleo de palma, os quais apresentaram maior ingestão diária de AGS (132,07 g/dia *versus* 77,13 g/dia), um aumento de 71,23% em relação à dieta controle. Contudo, nos bubalinos, diferentemente dos humanos, a redução na concentração foi discreta e a mesma não ficou aquém dos parâmetros fisiológicos para reprodutores bubalinos adultos (VALE, 2002).

Em relação ao efeito do tempo no perfil lipídico sérico, sabe-se que a taxa de deposição lipídica no organismo é crescente ao longo do tempo, com reflexos nos níveis de lipídeos totais e colesterol, os quais aumentaram no segundo período do trabalho, compreendido pelo 59^o ao 116^o dia de arrazoamento. Entretanto, o aumento de VLDL no primeiro período reflete o aumento da metabolização lipídica para as células-alvo, devido à oferta superior de ácidos graxos que aquela imediatamente necessária para consumo energético, fazendo com que no segundo período ocorresse maior deposição de lipídeos nos órgãos de reserva. Esse fato pode ser confirmado, pois com o aumento da metabolização lipídica, o nível de LDL foi elevado significativamente no segundo período, aumentando a oferta de colesterol para os tecidos, o que, em termos reprodutivos, acarreta maior disponibilização de colesterol (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Para as variáveis seminais, não foram constatadas diferenças estatísticas significativas entre os Grupos CONT e ÓLEO, salvo no turbilhamento ($2,85 \pm 0,82$ e $2,38 \pm 0,56$; $P < 0,05$) e na integridade de membrana ($72,34 \pm 8,64$ e $63,26 \pm 12,05$; $P < 0,05$), respectivamente. A motilidade espermática observada entre os grupos experimentais não

apresentou diferença estatística. Provavelmente, a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados 22:6n-3, importante componente dos fosfolipídeos e que possui relação com a motilidade (DOLATPANA et al., 2008), seja equivalente nos Grupos CONT e ÓLEO, após as sucessivas reações de dessaturação e alongamento das cadeias.

O turbilhonamento consiste no movimento de massa dos espermatozoides, e é relacionado com a concentração do ejaculado e a motilidade espermática (HAFFEZ, 2004). No presente estudo, os animais do Grupo CONT apresentaram valores de turbilhonamento superiores aos do Grupo ÓLEO, devido à redução da concentração espermática, no período 2, possivelmente ocasionada pelo elevado teor de ácidos graxos saturados presentes no óleo de palma. Segundo Young; Zirkin; Nelson (2001), elevadas concentrações de ácidos graxos saturados afetam a espermatogênese, pois alteram os níveis de hormônios esteroides, provocando perdas de células germinativas. Uma consideração importante é a interação entre os ácidos graxos poli-insaturados e seus derivados eicosanoides com o eixo hipotalâmico-hipofisário no controle hormonal da espermatogênese, necessitando, deste modo, de maiores estudos envolvendo a relação da suplementação dietética com a secreção de GnRH, LH, FSH (SURAI et al., 2000). Ao analisar os demais dados seminais dos touros bubalinos, como o volume espermático, pH seminal, motilidade progressiva, vigor, viabilidade espermática e defeitos totais, observa-se que estão de acordo com os dados fisiológicos publicados por Vale (2002), sendo constatado que não houve efeito da suplementação com óleo de palma sobre esses parâmetros seminais.

4.5 CONCLUSÃO

A introdução de 2% de óleo de palma na MS da dieta oferecida a touros bubalinos em confinamento alterou o perfil lipídico sérico e não reduziu a qualidade do sêmen *in natura* de touros bubalinos a níveis abaixo dos considerados como fisiológicos. A elevação dos lipídeos séricos, independentemente da fonte, favoreceu a normalidade da morfologia espermática, além de ter sido constatada associação positiva entre o VLDL e a viabilidade espermática. Entretanto, o uso de óleo de palma na dieta *per se* não favoreceu parâmetros que pudessem estar relacionados com elevação da qualidade seminal e potencial fertilidade dos touros.

4.6 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.260-258, 2008.
- ADEEL, M. et al.. 2009. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, v.71 p.1220-1225, 2009.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinical of North America**, v.29 p.1-12, 2002.
- ARGOV, N. et al. Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. **Theriogenology**, v.67, p.878-885, 2007.
- ATTAMAN, J.A. et al. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Human Reproduction**, v.27, p.1466-1474, 2012.
- BAHIA - Companhia Nacional de Abastecimento. **Dendeicultura da Bahia**. 2006. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/BA/dendeicultura_na_bahia.pdf Acesso em: 17 Mai 2012.
- BEER-LJUBIC, B. et al. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation I. **Theriogenology**, v.72, p.1132-1140. 2009.
- BERGERON, A. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004.
- BERGERON, A. et al, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**. v. 77, p. 120–126, 2007.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification on the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25: 383-391, 1973.
- CHACUR, M.G.M.; ARAÚJO, M.C.; KRONKA, S. Características seminais, corpóreas e anatômicas do aparelho reprodutor de reprodutores da raça Canchim aos 14 e 48 meses de idade. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecnia**, v.9, n.1, p.21-27, 2006.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

COSTA, D.A. et al. Avaliação nutricional da torta de dendê para suplementação de ruminantes na Amazônia Oriental. Amazônia: **Ciência & Desenvolvimento**, v.4, p.83-101, 2009.

DOLATPANAH, M.B. et al. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.21, n.1, p.29-34, 2008.

GALLOWAY, D.B. Introductory review, factors affecting fertility. In: _____. **Bulls Course held**. The University of Queensland Veterinary School, 1974, p.2-23.

GANDRA, J.R. et al. Productive performance, nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle and Mediterranean Buffaloes (*Bubalus bubalis*) fed with corn-silage based diets. **Livestock Science**, v.140, p.283-291, 2011.

GARCIA, A.R. **Efeito do estresse térmico e testicular e o uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóide de touro Simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004. 258f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo. 2004.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2004. p. 107 e 369-394.

JAIN, Y.C; ANAND, S.R. Fatty acids and fatty aldehydes of buffalo seminal plasma and sperm lipid. **The Journal of Society for Reproduction and Fertility**, v.47, p.261-267, 1976b.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 ed. 2008. http://www.certified-easy.com/aa.php?isbn=ISBN:012370491X&name=Clinical_biochemistry_of_domestic_animals Acesso em: 7 mai 2012.

KHAN M.I.R.; IJAZ A. Effect of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. **Animal**, v.2, p.548-53, 2008.

MALDJIAN, A. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, v.15, n.63, p. 411-21, 2005.

MAMMOTO, A. et al. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. **Biology of Reproduction**., v.55, p.1063-68, 1996.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**. v.53, p.109-119, 2002.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.104-118, 2008.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1487, p.24-32, 2000.

NALAVADE, S.B. et al. Comparative study of blood serum lipid profile in buffalo and cow bulls. **Journal of Bombay Veterinary College**, v.10, n.1-2, p.15-18, 2002.

NALAVADE, S.B. et al. Comparative study of blood serum lipid profile in buffalo and cow bulls. **Journal of Bombay Veterinary College**, v.10, n.1-2, p.15-18, 2002.

NIKAN, S.R. et al. Comparative appraisal of seminal plasma lipid profile in buffalo and cow bulls. **Journal of Bombay Veterinary College**, v.13, p.46-49, 2005.

NOLAN, J.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm, **The FASEB Journal**, v.11, p.670-682, 1997.

PAIXÃO, R.L. É possível garantir bem-estar aos animais de criação? **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.11, p.66-73, 2005.

PAUL, S. S.; LAL, D. **Nutrient requirements of buffaloes**. India: SSPH, 2010.137p.

POMPEIA, C. et al. R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1255-1268, 2000.

RANJAN. A. et al. Effect of bypass fat supplementation on productive performance and blood biochemical profile in lactating Murrah (*Bubalus bubalis*) buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, n.7, p.1615-1621, 2012.

RODRIGUES, A.M.C.; DARNET, S.; SILVA, L.H.M. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.21, n.10, p.2000-2004, 2010.

SANTOS, A.X. et al. Avaliação do consumo de macromelementos em dietas experimentais para búfalos suplementados com rações à base de farelo de coco ou torta de amêndoa de dendê. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2011, 48. Belém. **Anais...** Belém, 2011. p. 1-3.

SAS INSTITUTE. 1993. **SAS/STAT User's guide: statistics**. 4 ed. 943p. Version 6, Cary, NC: v.2.

SCHENK, S.; HOEGER, U. Lipid accumulation and metabolism in polychaete spermatogenesis: Role of the large discoidal lipoprotein. **Molecular Reproduction and Development**, v.77, n.8, p.710-719, 2010.

SHARMA, A.K; GUPTA, R.C. Duration of seminiferous epithelial cycle in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.3, p.217-224, 1980.

SOARES, B.C. et al. Parâmetros ruminais de ovinos (*Ovis aries*) alimentados com resíduo de biodiesel oriundo do dendê (*Elaeis guineensis*). In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2010, 4. Estância de São Pedro. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010. v.1. p.281-282.

SOFIKITIS, N.; MIYAGAWA, I. Secretory dysfunction of the male accessory genital glands due to prostatic infections and fertility: a selected review of literature. **Japanese Journal of Fertility and Sterility** v36, p.690-699, 1991.

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

TACKEN, P.J. et al. Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v.12, p.275-279, 2001.

TAJIK, J.; NAZIFI, S. Serum concentrations of lipids and lipoproteins and their correlations with thyroid hormones in iranian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Asian Journal of Animal Sciences**, p.1-6, 2011.

THÉRIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.59, p.768-776, 1998.

TRAVIS, A.J.; KOPF, G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.731-736, 2002.

USDA - **United States Department of Agriculture /Foreign Agricultural Service Office of Global Analysis**. oilseed: world market and trade Circular Series FOP 3-08 March 2008. <http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/2008/March/oilseedsfull0308.pdf> Acesso em: 08 mai 2012.

VALE, W.G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 2002, 1. Belém, **Proceedings...** Belém: APCB. 2002 pp. 156-171.

VANCE, J.E.; VANCE, D. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**, 4th Edition Elsevier Science. 2002.

YAMAZAKI, T. et al. Increased VLDL increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.22, p.21506-1514, 2005.

YOUNG, K.A.; ZIRKIN, B.R.; NELSON, R.J. Testicular Apoptosis Is Down-Regulated during Spontaneous Recrudescence in White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*) **Journal of Biological Rhythms**. v. 16, n. 5, p. 479-488, 2001.

ZERON, Y. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, n.45, p.143-152, 2002.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil de ácidos graxos sérico é primordial para a fertilidade do macho bubalino, pois reflete a condição nutricional do indivíduo. Baseado no fato de que há estreita relação entre o perfil lipídico sérico e o perfil lipídico do plasma seminal, e na hipótese de que maiores concentrações de lipídeos séricos pudessem alterar a composição das membranas plasmáticas dos espermatozoides, o presente trabalho foi delineado.

A necessidade de se obter alimentos que possam ser usados para ruminantes em épocas de restrição de forragens, aliado ao fato da necessidade de verticalização da produção pecuária na Amazônia justificam os trabalhos científicos com nutrição, reprodução e outras vertentes de produção animal na região. A expansão da produção industrial na Amazônia, em especial da indústria de biocombustíveis, a qual é baseada no plantio e processamento do dendê em larga escala, torna seus coprodutos disponíveis para uso e investigação científica, justificando sua escolha como matéria-prima para este trabalho. Da mesma forma, o crescente mercado por genética bubalina e a posição do estado do Pará como detentor do mais numeroso rebanho brasileiro concretizam a demanda nacional e internacional por touros de qualidade, que possuam alta capacidade de reprodução, quer seja para monta natural, quer seja para reprodução assistida. Por isso, obter uma tecnologia que alie o uso de coprodutos industriais (potencialmente contaminantes do ambiente) a um melhor desempenho zootécnico e maior capacidade reprodutiva é imprescindível para a solução integrada de problemas de cadeias produtivas que, aparentemente, são paralelas.

Em termos celulares, a incorporação do óleo de palma na dieta dos touros bubalinos, a esperada elevação dos teores absolutos de ácidos graxos insaturados na dieta e a alteração na relação de AGI/AGS da dieta serviram como base para a possível incorporação de ácidos graxos insaturados às membranas celulares espermáticas, de modo a torná-las mais maleáveis e resistentes. Paralelamente, a elevação do VLDL poderia mudar o aproveitamento energético por parte dos espermatozoides, com reflexos imediatos na motilidade espermática. Elevar a motilidade e a integridade das membranas plasmáticas parecem ser a chave para se obter ejaculados potencialmente mais férteis ou, no mínimo, com maior rendimento em caso de processamento industrial.

Na prática, foi constatado que, se por um lado o óleo de palma não impactou negativamente na maioria dos parâmetros espermáticos relevantes na investigação andrológica, sua adição em 2% na dieta interferiu em um item sensível do espermiograma, o nível de integridade de membranas plasmáticas do sêmen *in natura*. É possível que efeitos

positivos da adição de óleo na dieta possam ser observados quando as células forem submetidas à criopreservação, o que não foi testado no presente trabalho. É possível, também, que as alterações de qualidade seminal observadas, como a diminuição da concentração espermática ao longo do tempo e o menor nível de integridade de membranas, estejam relacionadas à maior susceptibilidade das células quando se intensifica a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), fato ocorrente quando os níveis de lipídeos são mais elevados. Por isso, novas investigações sobre o efeito da adição de lipídeos na dieta e seus efeitos na composição das membranas espermáticas e na qualidade de sêmen criopreservado são extremamente interessantes e podem somar informações àquelas obtidas até o momento.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.260-258, 2008.
- ADEEL, M. et al.. 2009. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, v.71 p.1220-1225, 2009.
- AGARWAL, A. AND SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinical of North America**, v.29 p.1-12, 2002
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. **Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999**, Anvisa, Brasil, 1999.
- AITKEN, R.J. et al. Cisunsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, p.4154-4163, 2006.
- AMANN, R.P. Fertility of cryopreserved sperm. **Contraception Fertility Sexuality**, v.19, p.946- 954, 1991.
- APPER-BOSSARD, E. et al. Changing dietary cation-anion difference for dairy cows fed with two contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of Dairy Science**. v.89, p.749-760, 2006.
- ARAÚJO, F.A. et al. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v.117, p.61-71, 1995.
- ARGOV, N. et al. Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. **Theriogenology**, v.67, p.878-885, 2007.
- ARLAS, T. R. **Efeito da suplementação alimentar de garanhões com óleo de arroz contendo gamma-oryzanol na qualidade espermática**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.
- ATTAMAN, J.A. et al. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Human Reproduction**, v.27, p.1466-1474, 2012.
- BAUMAN, D.E. et al. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants CORNELL NUTRITION CONFERENCE. 2003, New York. **Proceedings...** Cornell University, 2003. p175-189.
- BEER-LJUBIC, B. et al. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation I. **Theriogenology**, v.72, p.1132-1140. 2009.
- BERGERON, A. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004.

- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification on the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25: 383-391, 1973.
- CARTER, J.F. Potential of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. **Cereal Foods World**, v.38, p.753-759, 1993.
- CEROLINI, S. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.99-111, 2000.
- CHACUR, M.G.M.; ARAÚJO, M.C.; KRONKA, S. Características seminais, corpóreas e anatômicas do aparelho reprodutor de reprodutores da raça Canchim aos 14 e 48 meses de idade. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.9, n.1, p.21-27, 2006.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- BAHIA. Companhia Nacional de Abastecimento. **Dendeicultura da Bahia**. 2006. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/BA/dendeicultura_na_bahia.pdf Acesso em: 17 Mai 2012.
- COOK, H.W.; MCMASTER, C.R. Fatty acid denaturation and chain elongation in eukaryotes. In: VANCE, DE.; VANCE, J. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Biomembranes**. Elsevier; 1996. p. 181-204. Disponível em: http://books.google.com/books?id=0ewssmEE_CUC&pg=PA237&dq=Biochemistry+of+Lipids,+Lipoproteins+and+Biomembranes&hl=pt-BR&ei=-89STb3qLc7UgAfwo8zfCA&sa=X&oi=book_result&ct=book-thumbnail&resnum=1&ved=0CC8Q6wEwAA#v=onepage&q&f=false . Acesso em: jan 2011.
- COSTA, D.A. et al. Avaliação nutricional da torta de dendê para suplementação de ruminantes na Amazônia Oriental. Amazônia: **Ciência & Desenvolvimento**, v.4, p.83-101, 2009.
- COULTER, H. G. **Beef herd management. Binder and study guide**. Ontario, Canada: University of Guelph; 2002. p. 422-444.
- CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. 149f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- CURI, R.; POMPÉIA, C.; MYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo:Manole, 2002, 598p.
- DEGARIS, P.J.; LEAN, I.J.; RABIEE, A.R.; HEUER, C. Effects of increasing days of exposure to prepartum transition diets on milk production and milk composition in dairy cows. **Australian Veterinary Journal**, v.86, p.341-351, 2008.
- DEN DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v.28. p.87-94. 1992.

NUNES, S.P. Produção e consumo dos óleos vegetais no Brasil. **Boletim eletrônico** n. 159, 2007.

<http://www.deser.org.br/documentos/doc/Produ%20e%20consumo%20de%20F3leos%20vegetais.pdf> Acesso em 8 mai 2007.

DOLATPANAH, M.B. et al. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.21, n.1, p.29-34, 2008.

EDDY, E.M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D.A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**. v.61, p.103-115. 2003

EHRENWAL, D.E.; PARKS, J.E.; FOOTE, R.H. Cholesterol efflux from bovine sperm: I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. **Gamete Research**, v.20, p.145-157, 1988.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <http://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/dende/dendeprincipaisusos.html> Acesso em: 27 Fev 2011.

FATMA, B.A. et al. Sperm quality improvement after date seed oil in vitro supplementation in spontaneous and induced oxidative stress. **Asian Journal of Andrology**, v.11, p393-398. 2009.

FERNANDES, J.J.R. et al. Teores de caroço de algodão em dietas contendo silagem de milho para vacas em lactação. **Acta Scientiae**, v.24, p.1071-1077, 2002.

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

FURLAN JÚNIOR, J. et al. **Biodiesel: Porque tem que ser dendê**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, Palmas, 205p. 2006.

FUSTON, R. N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 154-161. 2004.

GALLOWAY, D.B. Introductory review, factors affecting fertility. In: _____. **Bulls Course held**. The University of Queensland Veterinary School, 1974, p.2-23.

GANDRA, J.R. et al. Productive performance, nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle and Mediterranean Buffaloes (*Bubalus bubalis*) fed with corn-silage based diets. **Livestock Science**, v.140, p.283-291, 2011.

GARCIA, A.R. **Efeito do estresse térmico e testicular e o uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóide de touro Simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004. 258f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo. 2004.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004, p.97-110.

GLIOZZI, T.M. et al. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. **Theriogenology**, v.71, p.910-919, 2009.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2004. p. 107 e 369-394.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAN, J.K.; NOLA, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask then to survive. **Journal of Andrology**, v.88, p.343-352. 1990.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid Metabolism in the Rumen. In: Hobson, P.N.; Stewart, C.S. **The rumen microbial ecosystem**,. Chapman and Hall, p. 382-426, 1997.

HORN, M.M.; MORAES J.C.F.; EDELWEISS M.I.A. Quantificação dos estádios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com e sem alteração na qualidade seminal **Ciência Rural**, v.33, n.6, p.1111-1115, 2003.

IBGE. **Lavoura Permanente 2010**.
<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pa&tema=lavourapermanente2010> Acesso em 04 mai 2012.

JAIN, Y.C.; ANAND, S.R. The lipids of buffalo spermatozoa and seminal plasma. **The Journal of Society for Reproduction and Fertility**, v.47, p.255-260, 1976a.

JAIN, Y.C; ANAND, S.R. Fatty acids and fatty aldehydes of buffalo seminal plasma and sperm lipid. **The Journal of Society for Reproduction and Fertility**, v.47,p.261-267, 1976b.

JOHNSON, W. H. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, n. 2, p. 255-270.1997.

JONES R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement. 1998; v.53, p.73-84.

JORGE, J. R.V. et al. Lipídios em dietas para novilhos holandeses: digestibilidade aparente. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.4, p.743-753, 2008.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 ed. 2008. http://www.certified-easy.com/aa.php?isbn=ISBN:012370491X&name=Clinical_biochemistry_of_domestic_animals Acesso em: 7 mai 2012.

KASTELIC, J.P. et al. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v.45, p.935-942. 1996.

KHALILI, M.A.; ZARE-ZADEH, N.; HASHEMI, H. Correlation between serum lipids profile with sperm parameters of infertile men with abnormal semen analysis. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.7, n.3, p.123-127, 2009.

KHAN M.I.R.; IJAZ A. Effect of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. **Animal**, v.2, p.548-53, 2008.

KIM, E.J. et al. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.889-896, 2008.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v.165, p.1-10, 1998.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica** Ed. Sarvier. 2007, p.1232.

LISTA, F.N. et al. Estimação do valor energético da pastagem e simulação de parâmetros do desempenho produtivo de novilhas em pasto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.130-138, 2008.

LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Inducing the human acrosome reaction with a calcium ionophore A 23 187decreases sperm-zona pellucida binding with oocytes that failed to fertilize in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.127-134, 1990.

MALDJIAN, A.; PENNY, P.C.; NOBLE, R.C. Docosohexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. In: De VRIESE, S.R.; CHRISTOPHE, A.B. (Eds.) **Male fertility and lipid metabolism**. Champaign: AOCS Press; 2003;60-72, 277p.

MALDJIAN, A. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, v.15, n.63, p. 411-21, 2005.

MAMMOTO, A. et al. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1063-68, 1996.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**. v.53, p.109-119, 2002.

MANN, T; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. New York, Springer-verlag, 1981. p.495.

MARCHELLO, E.V. et al. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n.7, p.453-458, 2000.

MEDEIROS, S. R. **Uso de lipídeos em dietas de ruminantes**. Informe Técnico - Macal Nutrição Animal. Disponível em: <http://people.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/lipidios.pdf> Acesso em: 02 Mar 2011.

MEHMOOD, A.; ANWAR, M.; SAQLAN NAQVI, S.M. Capacitation of frozen thawed buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa with higher heparin concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.4, p.376-379, 2007.

MIRANDA, I.P.A. et al. **Frutos das palmeiras da Amazônia**. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação – MCTI / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Manaus. 2001,120p.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.104-118, 2008.

MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1487, p.24-32, 2000.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda., 1998

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

MOURVAKI, E. et al. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, v.73, p.629-637, 2010.

NALAVADE, S.B. et al. Comparative study of blood serum lipid profile in buffalo and cow bulls. **Journal of Bombay Veterinary College**, v.10, n.1-2, p.15-18, 2002.

NIKAN, S.R. et al. Comparative appraisal of seminal plasma lipid profile in buffalo and cow bulls. **Journal of Bombay Veterinary College**, v.13, p.46-49, 2005.

NOGUEIRA, E. **Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção *in vitro* de embriões em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. Jaboticabal – 2008. 87f, Tese (Doutorado – Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

NOLAN, J.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm, **The FASEB Journal**, v.11, p.670-682, 1997.

OHARA, Y.; PETERSON, T.E.; HARRISON, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **The Journal of Clinical Investigation**, v.91, p.2546-2551, 1993.

OLIVEIRA, S.L. et al. Efeito da inclusão de diferentes tipos de óleo na dieta de varrões sobre a qualidade do sêmen "in natura". **Ciência e Agrotecnologia**, v.30. n.6, 2006.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v.122, p.105-151, 1990.

PAIXÃO, R.L. É possível garantir bem-estar aos animais de criação? **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.11, p.66-73, 2005.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Funep, 2006. 583p.

PARKS, J. E.; LYNCH. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, stallion and rooster sperm membrane. **Cryobiology**, v. 29, n.2, p.255-266, 1992.

PATSCH, J.R. et al. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.12, p.1336-45. 1992.

PAUL, S. S.; LAL, D. **Nutrient requirements of buffaloes**. India: SSPH, 2010.137p.

PEÑA, F.J. et al. new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.28, p.107-114, 2005.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, n.7, p.597-612. 2006.

POMPEIA, C. et al. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1255-1268, 2000.

RANJAN, A. et al. Effect of bypass fat supplementation on productive performance and blood biochemical profile in lactating Murrah (*Bubalus bubalis*) buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, n.7, p.1615-1621, 2012.

ROBINSON, R.S. et al. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.124, p.119-131, 2002.

RODRIGUES, A.M.C.; DARNET, S.; SILVA, L.H.M. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.21, n.10, p.2000-2004, 2010.

ROUX, C. et al. Qualité nucléaire du spermatozoïde humains (protéines nucléaires). **Gynécologie Obstétrique e Fertilité**, v.32, p.792-798, 2004.

SALLA L.E. et al. Comportamento ingestivo de vacas Jersey alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de gordura nos primeiros 100 dias de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.683-689, 2003.

SANCHEZ, E.E.T. et al. The effect of oxidative stress on human sperm morphology. **Fertility and Sterility**, v.86, p.444, 2006.

SANTOS, A.X. et al. Avaliação do consumo de macronutrientes em dietas experimentais para búfalos suplementados com rações à base de farelo de coco ou torta de amêndoa de dendê. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2011, 48. Belém. **Anais...** Belém, 2011. p. 1-3.

SAS INSTITUTE. 1993. **SAS/STAT User's guide: statistics**. 4 ed. 943p. Version 6, Cary, NC: v.2.

SCHENK, S.; HOEGER, U. Lipid accumulation and metabolism in polychaete spermatogenesis: Role of the large discoidal lipoprotein. **Molecular Reproduction and Development**, v.77, n.8, p.710-719, 2010.

SCHILLER, J. et al. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry - a cautionary note. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.126, p.85-94, 2003.

SCHILLER, J. et al. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy - effects of freezing and thawing. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.106, p.145-156, 2000.

SOARES, B.C. et al. Parâmetros ruminais de ovinos (*Ovis aries*) alimentados com resíduo de biodiesel oriundo do dendê (*Elaeis guineensis*). In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 4. 2010, Estância de São Pedro. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010. v.1. p.281-282.

SOFIKITIS, N.; MIYAGAWA, I. Secretory dysfunction of the male accessory genital glands due to prostatic infections and fertility: a selected review of literature. **Japanese Journal of Fertility and Sterility** v36, p.690-699, 1991.

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

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental. In: DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. L. R. **The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration**. 2006, p.1-30

TACKEN, P.J.; HOFKER, M.H.; HAVEKES, L.M.; VAN, D.I.J.K.K.W. Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v.12, p.275-279, 2001.

TAJIK, J.; NAZIFI, S. Serum concentrations of lipids and lipoproteins and their correlations with thyroid hormones in iranian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Asian Journal of Animal Sciences**, p.1-6, 2011.

TAVILANI, H. et al. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. **Journal Compilation**, v.38, p.173-178, 2006.

THÉRIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.59, p.768-776, 1998.

TRAVIS, A.J.; KOPF, G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.731-736, 2002.

USDA - **United States Department of Agriculture /Foreign Agricultural Service Office of Global Analysis**. oilseed: world market and trade Circular Series FOP 3-08 March 2008. <http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/2008/March/oilseedsfull0308.pdf> Acesso em: 08 mai 2012.

VALE, W.G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 2002, 1. Belém, **Proceedings...** Belém: APCB. 2002 pp. 156-171.

VALE, W. G. 1997. Sperm cryopreservation. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy. In: *Bubalus bubalis* - **Journal Buffalo Science and Technique**, suppl. 4:129-140.

VALE, W.G. 1994. Collection processing and deep freezing of buffalo semen. **Buffalo Journal**. p. 65-81.

VANCE, J.E.; VANCE, D. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**, 4th Edition Elsevier Science. 2002.

VOET, D.; VOET, J.G. PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000, 931p.

WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.

WEIMER, P. J. et al. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5902–5912, 2010 .

WEIN, A.J. et al. **Campbell-Walsh Urology**. Saunders, 2006. 4592p.

WILLIAMS, G.L. Suplementação de gordura na dieta como estratégia para aumento da eficiência reprodutiva em bovinos. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 5., 2001, Uberlândia, MG. **Anais...**Uberlândia: Conapec Jr; Botucatu: UNESP, 2001. p.95-101.

WITE, R.G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1988, p.212-28.

WITTE, T.S.; SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.181-193. 2007.

YAMAZAKI, T. et al. Increased VLDL increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.22, p.21506-1514, 2005.

YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill J.D. **The Physiology of Reproduction**. 2nd Edition, Raven Press; 1994. p. 189-317.

YOUNG, K.A.; ZIRKIN, B.R.; NELSON, R.J. Testicular Apoptosis Is Down-Regulated during Spontaneous Recrudescence in White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*) **Journal of Biological Rhythms**. v. 16, n. 5, p. 479-488, 2001.

ZERON, Y. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, n.45, p.143-152, 2002.

ZHU, Z.P. et al. The effects of diabetic hyperlipidemia on the development of testes and penis in mole New Zealand rabbits. **Zhonghua Nan Ke Xue**, v.11, p.904-907, 2005.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer técnico do Comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação, 2012.



PARECER BIO042-12

Projeto: Efeito da utilização de óleo do dendê na dieta sobre a qualidade do sêmen *in natura* de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados em Belém, Pará”

Coordenador: Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia

Área Temática: Biologia

Vigência: 05/2012 a 05/2014

Nº no CEPAE-UFPA: BIO042-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 03 de maio de 2012

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente CEPAE-UFPA

ANEXO B – Tabelas referentes ao trabalho experimental.

Tabela 10: Perfil dos ácidos graxos dos alimentos utilizados na formulação das rações experimentais. Belém, Pará. 2012.

	Perfil dos Ácidos Graxos			
	Silagem de Milho (%/100g)	Milho (%/100g)	Farelo de Trigo (%/100g)	Óleo de Palma (% /100g)
C8:0	0,10%	-	-	-
C10:0	0,10%	-	-	-
C12:0	0,22%	-	0,32%	-
C14:0	0,39%	-	0,28%	0,58%
C15:0	-	-	-	0,01%
C16:0	17,24%	14,18%	17,33%	47,53%
C16:1	0,44%	-	-	0,01%
C18:0	4,30%	-	1,82%	5,07%
C18:1	40,87%	39,24%	20,97%	43,53%
C18:2	33,92%	46,58%	56,59%	-
C18:3	0,75%	-	-	-
C20:0	1,68%	-	2,68%	-
Área Total	100,00%	100,00%	100,00%	96,72%

Tabela 11: Características seminais de touros bubalinos nos dois períodos experimentais. Belém, Pará. 2012.

VARIÁVEIS	CONT		ÓLEO	
	P 1	P 2	P 1	P 2
Volume (mL)	3,65 ± 1,28	3,77 ± 1,34	3,43 ± 1,94	3,77 ± 1,39
pH (1-14)	6,19 ± 0,38	6,33 ± 0,42	6,35 ± 0,39	6,39 ± 0,76
Turbilhonamento (0-5)	2,94 ± 0,55	2,77 ± 0,56	2,77 ± 0,72	2,01 ± 0,76
Concentração espermática (x10 ⁶)	1.472,60 ± 348,58	1.641,45 ± 317,95	1.841,17 ± 590,41	1.377,92 ± 433,21
Motilidade progressiva (%)	58,98 ± 10,97	59,21 ± 11,69	61,74 ± 10,94	48,40 ± 14,66
Vigor (0-5)	3,24 ± 0,42	3,05 ± 0,49	3,21 ± 0,39	2,91 ± 0,42
Viabilidade Espermática (%)	66,42 ± 9,03	69,76 ± 11,45	65,40 ± 11,09	58,34 ± 15,43
Defeitos Maiores (%)	12,88 ± 6,36	9,3 ± 5,11	8,64 ± 2,87	5,90 ± 5,47
Defeitos Menores (%)	12,63 ± 3,32	15,19 ± 4,82	10,58 ± 4,01	17,69 ± 5,30
Defeitos Totais (%)	25,51 ± 8,98	24,54 ± 6,87	19,22 ± 5,22	23,59 ± 6,93
Integridade de Membrana - HOS (%)	68,57 ± 5,54	75,73 ± 21,07	64,47 ± 9,44	62,14 ± 15,58

*CONT: concentrado controle; ÓLEO: concentrado enriquecido com óleo de palma (2%MS).

P1: Período 1; P2: Período 2

Tabela 12: Parâmetros seminais fisiológicos de touros bubalinos.

Características seminais	Padrão de normalidade
Cor	Branco, branco leitoso, com estrias escuras azul
Volume (mL)	3 (2 a 8)
Turbilhonamento	>3
Motilidade (%)	>70
Vigor	>3
Concentração (sptz/mL)	0,6 a 1,2 x 10 ⁶
Viabilidade (%)	>70
Patologia espermática (%)	<30
pH (%)	6,7 a 7,5

(Fonte: VALE, 1994; 1997)

Tabela 13: Correlação de Pearson entre as variáveis seminais e variáveis lipídicas séricas. Belém, Pará, 2012.

	Triglicerídeos	Colesterol	HDL	LDL	VLDL	Lípídeos Totais
Volume	r=0,046	r=-0,143	r=0,115	r=-0,257	r=0,045	r=-0,111
	P=0,773	P=0,366	P=0,465	P=0,100	P=0,775	P=0,483
pH	r=0,123	r=-0,026	r=0,028	r=-0,069	r=0,172	r=0,021
	P=0,439	P=0,868	P=0,858	P=0,663	P=0,276	P=0,895
Turbilhonamento	r=-0,020	r=-0,082	r=-0,082	r=-0,046	r=0,102	r=-0,081
	P=0,899	P=0,604	P=0,606	P=0,773	P=0,523	P=0,610
Concentração	r=-0,221	r=0,214	r=0,237	r=0,098	r=-0,219	r=0,111
	P=0,159	P=0,173	P=0,131	P=0,541	P=0,162	P=0,485
Motilidade	r=0,129	r=-0,086	r=-0,114	r=-0,034	r=0,175	r=-0,030
	P=0,416	P=0,590	P=0,472	P=0,833	P=0,267	P=0,851
Vigor	r=-0,270	r=0,009	r=0,219	r=-0,124	r=-0,257	r=-0,090
	P=0,084	P=0,953	P=0,163	P=0,432	P=0,100	P=0,572
Viabilidade	r=0,267	r=-0,125	r=-0,115	r=-0,099	r=0,381	r=-0,014
	P=0,088	P=0,430	P=0,466	P=0,530	P=0,012*	P=0,926
Defeitos Maiores	r=-0,008	r=-0,103	r=0,102	r=-0,202	r=0,076	r=-0,094
	P=0,962	P=0,519	P=0,521	P=0,200	P=0,632	P=0,553
Defeitos Menores	r=-0,412	r=-0,242	r=0,042	r=-0,293	r=-0,193	r=-0,366
	P=0,006*	P=0,122	P=0,796	P=0,060	P=0,222	P=0,017*
Defeitos Totais	r=-0,282	r=-0,233	r=0,097	r=-0,334	r=-0,077	r=-0,310
	P=0,071	P=0,139	P=0,541	P=0,031*	P=0,628	P=0,046*
Integridade de Membrana - HOS	r=0,139	r=-0,257	r=-0,193	r=-0,170	r=0,128	r=-0,180
	P=0,379	P=0,1000	P=0,221	P=0,281	P=0,420	P=0,256

(P<0,05)

Tabela 14: Variação do peso corporal, escore corporal e perímetro escrotal dos búfalos durante o período experimental. Belém, Pará, 2012.

Peso Corporal		Escore Corporal		Perímetro Escrotal	
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
456,8 ± 50,4	588,6 ± 134,4	2,6 ± 0,39	3,9 ± 0,39	29,60 ± 1,19	32,00 ± 2,19