



PPGCARP

Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal e Recursos Pesqueiros

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E RECURSOS PESQUEIROS

**USO DO EXTRATO LÍQUIDO DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) COM ADIÇÃO DE
LECTINA COMO MEIO DILUIDOR DE SÊMEN DE GALO**

MARCIA LORENA MONTEIRO DA SILVA

MANAUS- AMAZONAS

Julho, 2022

MARCIA LORENA MONTEIRO DA SILVA

**USO DO EXTRATO LÍQUIDO DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) COM ADIÇÃO DE
LECITINA COMO MEIO DILUIDOR DE SÊMEN DE GALO**

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Machado Andrade.

Coorientador (PPGCARP): Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Defesa de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros – PPGCARP da Universidade Federal do Amazonas-UFAM como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros.

MANAUS-AMAZONAS

Julho, 2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586u Silva, Marcia Lorena Monteiro da
Uso do extrato líquido do Camu-camu (*Myrciaria dubia*) com
adição de lecitina como meio diluidor de sêmen de galo / Marcia
Lorena Monteiro da Silva . 2022
43 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Paulo César Machado Andrade
Coorientador: Pedro de Queiroz Costa Neto
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos
Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Diluidores seminais;. 2. Aves domésticas. 3. Conservação
seminal. 4. Avicultura. I. Andrade, Paulo César Machado. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

MARCIA LORENA MONTEIRO DA SILVA

**USO DO EXTRATO LÍQUIDO DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dúbia*) COM
ADIÇÃO DE LECITINA COMO MEIOS DILUIDORES DE SÊMEN DE
GALO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovada em 30 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Paulo César Machado Andrade
Coordenador Projeto LAS/UFAM
CREAM/RR Nº 4723-0/92

Dr. Paulo César Machado Andrade - Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Roseane Pinto Martins de Oliveira - Membro
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Marco Antônio de Freitas Mendonça - Membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Sempre e primeiramente a Deus, pela minha vida, pelas oportunidades e pela força que Ele sempre mostrou que eu tinha, mesmo quando eu já não acreditava mais nisso.

Aos meus pais, mesmo que não concordemos em tudo, sempre se mostraram presentes e nunca me deixaram na mão, sempre dispostos a me apoiar e cuidar de mim.

Os meus amigos, que sempre me apoiaram com palavras de afeto e gratidão, sempre me passaram forças e alegria para continuar.

Ao programa PPGCARP, pois passar nesta seleção foi uma experiência incrível e me trouxe muita felicidade.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM), que foi uma casa e me colheu por todo esse tempo, fui muito feliz e pude crescer em vários sentidos da minha vida acadêmica e pessoal.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo auxílio concedido que ajudou para que a pesquisa pudesse acontecer.

Aos meus professores orientadores, que nunca desistiram de mim, me apoiaram e incentivaram sempre para que eu seguisse firme na área acadêmica.

A Professora Roseane Oliveira, principalmente, pois foi como uma mãe e me apoiou desde do começo no meio acadêmico.

Ao meu filho Bernardo que fez com que toda a minha vida ganhasse um novo sentido e pra quem eu espero poder dar sempre o meu melhor.

E a todos que contribuíram de alguma forma comigo nesta caminhada.

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”.

(Albert Einstein)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Motilidade espermática (%) do sêmen de galo estocado na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos	24
Tabela 2. Vigor dos espermatozoides de galo estocados na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos	25
Tabela 3. Patologias espermáticas totais (%) do sêmen de galo estocado na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos	26
Tabela 4. Defeitos morfológicos (%) dos espermatozoides de galo estocados na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos	27
Tabela 5. Defeitos morfológicos (%) na cabeça (isolada, reta) e na cauda (fortemente dobrada, dobrada e enrolada na porção terminal*) dos espermatozoides de galo estocados na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Demonstrativo gráfico da motilidade espermática (%) do sêmen de galo estocado em intervalos de até 60 min, condicionados a diluição 25
- Figura 2. Demonstrativo gráfico dos resultados obtidos em análises de vigor espermático nas amostras submetidas a diluição e estocadas em até 60 minutos 26
- Figura 3. Demonstrativo gráfico de patologias espermáticas totais (%) do sêmen de galo submetidos a diluição e estocados em até 60 minutos 27

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1. Ácaro encontrado em 2 amostras de ejaculado dos animais estudados 29

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. Introdução.....	11
2. Justificativa.....	13
3. Objetivos.....	15
3.1. Objetivos gerais.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. Revisão Bibliografia.....	16
4.1. Produção de sêmen de galos.....	16
4.2. Morfologia do espermatozoide de galos	16
4.3. Avaliação de qualidade do sêmen.....	17
4.4. Preservação de sêmen.....	18
4.5. Sêmen de galos <i>in natura</i>	18
4.6. Diluentes seminais.....	18
4.7. O Camu-camu.....	19
4.8. Lecitina de Soja.....	20
5. Materiais e Métodos.....	21
5.1. Local.....	21
5.2. Aves.....	21
5.3. Coleta de sêmen e análise	21
5.4. Avaliação da qualidade do sêmen.....	22
5.5. Defeitos maiores, menores e totais dos espermatozoides.....	22
5.6. Análise de dados.....	23
6. Resultados.....	24
7. Discussão.....	30
8. Conclusão.....	35
9. Referências Bibliográficas.....	36

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do extrato líquido do Camu-Camu (*Myrciaria dubia*), em junção com a Lecitina de soja como meio diluidor natural de sêmen de galos em temperatura ambiente, bem como, seu efeito conservante sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura em conjunto com o Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal da Universidade Federal do Amazonas. Foram utilizados 15 galos reprodutores (*Gallus gallus*) de linhagem híbrida, com 40 semanas de idade, alimentados com dieta calculada de acordo com as exigências nutricionais e previamente condicionados a liberação de sêmen por ação mecânica. O ejaculado foi diluído em Extrato Líquido de Camu-camu e lecitina de soja (ELCL) e em Beltsville Poultry Sêmen Extender-BPSE®, ambos seguindo a proporção 1:2 (sêmen: diluidor). O tempo de estocagem para análise do sêmen *in vitro* já homogeneizado com os diluentes foi dividido em 15 min, 30 min, 45 min e 60 min. O sêmen também foi analisado *in natura* como tratamento controle. Amostras de ejaculados de todos os itens foram analisadas pelos aspectos macro e microscópicos por meio de avaliações físicas (motilidade, vigor espermático, volume, pH, e concentração) e morfológicas (defeitos maiores, menores e totais dos espermatozoides). A motilidade espermática do sêmen mantido na presença do diluidor comercial não mudou ($p > 0,05$) ao longo do tempo. No sêmen *in natura*, a motilidade decresceu ($p \leq 0,05$) a partir de 45 min. No sêmen mantido com camu-camu+lecitina, a motilidade se manteve ($p > 0,05$) até 45 min. A motilidade progressiva retilínea não mudou ($p > 0,05$) ao longo do tempo de estocagem no sêmen contendo diluidor comercial. Utilizando ELCL, a motilidade progressiva se manteve ($p > 0,05$) até 30 min. Nos primeiros 15 minutos, a quantidade de patologias espermáticas totais foi semelhante ($p > 0,05$) entre os tratamentos. No entanto, no tempo 30, 45 e 60 min, a quantidade total de patologias foram maiores ($p < 0,05$) no sêmen contendo ELCL. O percentual de espermatozoides de galo com defeitos morfológicos totais foi menor ($p < 0,05$) no sêmen contendo diluidor comercial quando comparado ao sêmen *in natura* e diluidor contendo camu-camu + lecitina. Valores semelhantes foram observados nos defeitos morfológicos maiores. O percentual de cabeça isolada e reta não foram afetados pelos diluidores ($P > 0,05$). O percentual de espermatozoides com a cauda fortemente dobrada e cauda dobrada foi menor ($p < 0,05$) no sêmen contendo diluidor comercial quando em comparação com os outros tratamentos. Isto posto, o extrato líquido de camu-camu em junção com a lecitina de soja não obteve resultados satisfatórios como preservantes de sêmen em temperatura ambiente. Todavia, novas pesquisas com variantes que não foram estudadas podem dar uma nova narrativa a este processo, visto que as propriedades contidas nesta fruta e na lecitina são necessários ao processo de sobrevivência do espermatozóide.

Palavras-chave: Diluidores seminais, Aves domésticas, Conservação seminal, Avicultura.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the potential of the liquid extract of Camu-Camu (*Myrciaria dubia*), in conjunction with soy lecithin as a natural dilution medium for rooster semen at room temperature, as well as its preservative effect on membrane integrity plasma of sperm. The experiment was carried out in the Poultry Sector with the Laboratory of Animal Anatomy and Physiology of the Federal University of Amazonas. Fifteen breeding roosters (*Gallus gallus*) of the FC Cabocla 1 strain, at 40 weeks of age, were fed with a diet calculated according to nutritional requirements and previously conditioned to release semen by mechanical action. The ejaculate was diluted in Camu-camu Liquid Extract and Soy Lecithin (ELCL) and in Beltsville Poultry Sêmen Extender-BPSE®, both following a 1:2 ratio (semen: extender). The storage time for in vitro semen analysis, already homogenized with the extenders, was divided into 15 min, 30 min, 45 min and 60 min. Ejaculate samples of all items were analyzed for macro and microscopic aspects through physical (motility, sperm vigor, volume, pH, and concentration) and morphological (major, minor and total sperm defects) assessments. Sperm motility of semen maintained in the presence of the commercial extender did not change ($p > 0.05$) over time. In in natura semen, motility decreased ($p \leq 0.05$) after 45 min. In semen maintained with Camu-camu+lecithin, motility was maintained ($p > 0.05$) up to 45 min. Progressive rectilinear motility did not change ($p > 0.05$) over time of storage in semen containing commercial extender. Using ELCL, progressive motility was maintained ($p > 0.05$) up to 30 min. In the first 15 minutes, the amount of total sperm pathologies was similar ($p > 0.05$) between treatments. However, at 30, 45 and 60 min, the total amount of pathologies was higher ($p < 0.05$) in semen containing ELCL. The percentage of rooster spermatozoa with total morphological defects was lower ($p < 0.05$) in semen containing commercial extender when compared to in natura semen and extender containing Camu-camu + lecithin. Similar values were observed in the larger morphological defects. The percentage of isolated and straight heads were not affected by the extenders ($p > 0.05$). The percentage of spermatozoa with a strongly bent tail and a bent tail was lower ($p < 0.05$) in the semen containing commercial extender when compared to the other treatments. That said, the Camu-camu liquid extract in conjunction with soy lecithin did not obtain satisfactory results as semen preservatives at room temperature. However, further research with variants that have not been studied can give a new narrative to this process, since the properties contained in this fruit and in lecithin are necessary for the sperm survival process.

Keywords: Seminal extenders, Poultry, Seminal conservation, Poultry.

1. Introdução

A conservação das características requeridas na produção animal, bem como a variabilidade genética, ainda é algo difícil na produção sustentável de recursos alimentares oriundos da pecuária e conservação de genes. Como meio de contornar a situação, temos a prática da Inseminação Artificial (IA). Em resposta a aplicação do método de massagem abdominal e pressão na região da cloaca para coletar sêmen de galos, proposta por Burrows e Quinn em 1937, houve uma flexibilidade no processo de coleta, manuseio e transporte desse ejaculado até as fêmeas, o que propiciou o desenvolvimento de estudos para a preservação de sêmen de aves.

Contudo, um grande obstáculo, de fato, para o avanço da inseminação artificial é a dificuldade na preservação de sêmen por períodos longos em temperatura ambiente ou resfriado, de forma eficaz e que mantenha os padrões de qualidade dos espermatozoides depois da ejaculação, resultando na diminuição de sua qualidade e taxa de fertilidade. Os primeiros estudos sobre a conservação do sêmen buscando amenizar danos e se manter a viabilidade das células espermáticas, foram realizados a partir da adição do ejaculado em um determinado meio que proporcionasse uma boa fonte energética, mantivesse-os fecundantes por um período de vários dias e eliminasse o uso diário do reprodutor. A fim de achar um meio para resolver este infortúnio, entraena o uso de diluentes para a preservação da qualidade do sêmen.

O uso da técnica de diluição de sêmen é uma atividade frequente no manejo reprodutivo animal que utiliza a biotecnologia de inseminação artificial, pois esta prática maximiza o uso do ejaculado e mantém os espermatozoides vivos e sem danos por mais tempo. Nos últimos anos, houve um aumento no interesse por diluidores naturais, como a água de coco, que vem sendo usado mantendo dentro dos padrões de qualidade as características de vigor e motilidade espermática dos espermatozoides de diversas espécies de animais.

Para manutenção do ejaculado diluído por um período maior, substratos energéticos como carboidratos e frutose, além de agentes tampões devem ser adicionados ao diluente. Outro fator de grande importante que deve ser analisado em um bom diluente é sua atividade antioxidante para bloqueio ou neutralização de efeitos danosos provocados pelos radicais livres encontrados no plasma seminal, que causam estresse oxidativo, defeitos na motilidade espermática e lesões no DNA espermático.

Sendo assim, as frutas apresentam potencial muito grande como diluidores de sêmen, pois seus níveis de frutose, carboidrato e substâncias antioxidantes garantem aos espermatozoides, energia para sua manutenção fora do órgão reprodutor do macho.

Dentre as frutas da região amazônica, o Camu-camu (*Myrciaria dubia*), membro da família Myrtaceae, tem sido foco de vários estudos pois apresenta grande potencial tecnológico em função

da produtividade, rendimento em polpa e valor nutritivo devido aos seus altos teores de vitamina C e também por ser fonte de zinco, potássio, cálcio, aminoácidos e flavonoides. De acordo com a literatura científica, o Camu-camu tem apresentado evidente potencialidade para utilização preventiva e terapêutica na síndrome metabólica graças à atividade bioativa dos seus compostos no combate e prevenção de radicais livres. Além da alta atividade antioxidante, esta fruta também apresenta teores proveitosos de proteínas e carboidratos para promoção de fatores energéticos.

Estudos relatam ainda, que a inclusão de proteolipossomas ricos em fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, que fazem parte naturalmente da membrana plasmática das células, apresentaram bons resultados na motilidade e viabilidade dos espermática, neste contexto, entra a adição de lecitina de soja. A lecitina é formada por uma mescla de fosfolipídios (50%), triglicerídeos (35%) e glicolipídios (10%), carboidratos, pigmentos, carotenóides e outros microcompostos. As propriedades tensoativas da lecitina são provenientes da estrutura molecular dos fosfolipídios, seus componentes ativos.

Diante destas informações, este trabalho almeja avaliar o potencial do extrato líquido do camu-camu (*Myrciaria dúbia*) em conjunto com a lecitina de soja como meios diluidores de sêmen de galos em temperatura ambiente.

2. Justificativa

O Brasil ocupa uma colocação de destaque na produção de carne de frango na avicultura industrial sendo o maior exportador e segundo maior produtor. Sendo assim esta atividade tem grande importância nos valores do Produto Interno Bruto (PIB) do país (ABPA, 2021), sobressaindo-se mesmo após dois anos de pandemia. De acordo com o relatório semestral divulgado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2021), o Brasil deve produzir 14,85 milhões de toneladas métricas de carne de frango em 2022, crescendo 2% devido à forte demanda externa. O órgão prevê que esses níveis de produção estão previstos para estabelecer recordes históricos. O crescimento da produção baseia-se na forte procura externa, apesar da diminuição do consumo interno. Deste modo, é necessária a eficiência nos processos da produção para manter-se a todo vigor no ramo (ABPA, 2021). Os investimentos em biotecnologias reprodutivas, agregadas aos manejos sanitários e nutricionais, contribuem benéficamente para com as estratégias produtivas, mostrando então resultados positivos na atividade (BONGALHADO, 2013; DUARTE *et al.*, 2015).

Um dos objetivos da indústria avícola é a produção de progênie de alta qualidade tanto no setor de corte quanto no de postura, cada pinto produzido possui alto valor agregado (SURAI *et al.*, 2021). O uso da inseminação artificial possibilita um melhor aproveitamento de sêmen, podendo aumentar em até 10 vezes o número de pintainhos produzidos em comparação à monta natural, segundo Amann, (1999). Entretanto, para que o uso dessas biotecnologias ocorra de forma a não danificar os espermatozoides, se faz necessário a utilização de substâncias com ação protetora sobre espermatozoides submetidos a diferentes métodos de conservação, seja em temperatura ambiente, resfriamento e/ou congelamento (FEYISA *et al.*, 2018)

A habilidade de preservar o sêmen de galos por períodos longos seria benéfica não somente por aumentar o potencial de uso da inseminação artificial, mas também pela perspectiva de comercializar o sêmen de animais com alto potencial genético e valor econômico (BAKST e CECIL, 1992). Ao longo dos anos, vários testes vêm sendo conduzidos na tentativa de encontrar um protocolo eficiente para preservação de sêmen de galos e, embora existam vários relatos de sucesso, nenhum deles é viável economicamente para a indústria de aves. (FULTON, 2006).

A procura por novos diluentes para sêmen que possam evitar os danos devido ao choque térmico e ao estresse oxidativo (RONDON *et al.*, 2008), que ocasionam danos irreversíveis no DNA do espermatozoide maduro, tem sido amplamente estudada em diferentes espécies de animais (DE AMBROGI *et al.*, 2006). Este processo levou pesquisadores a estudarem a água de coco como uma opção viável na substituição dos diluentes convencionais existentes no mercado (SALGUEIRO *et al.*, 2007) e que tem demonstrado exercer ação favorável sobre a viabilidade dos

espermatozoides de vários mamíferos, com isso podendo ser empregada em processos biotecnológicos, sobrepondo produtos importados, quimicamente constituídos e com custos elevados (MOREIRA-NETO *et al.*, 2009).

Lavor *et al.* (2017) relatou em suas pesquisas que o uso de água de coco em pó (ACP-108) adicionada ao sêmen de galo ainda fresco e após uma hora de resfriado mostrou bons índices de motilidade e motilidade progressiva. Entretanto, após 24 horas e até 96 horas com o sêmen resfriado a 5 °C os índices declinaram.

Então, na investigação por meios diluidores naturais e que possam apresentar bons resultados na preservação de sêmen, entra em cena o Camu-camu, fruto com grande potencial econômico, porém ainda não extensivamente explorado. Seus compostos bioativos não são apenas representados pelo ácido ascórbico, mas também compostos fenólicos e teores de β -caroteno (CHIRINOS *et al.*, 2010). Teores de polifenóis e vitamina C, além de quantidades consideráveis de frutose, glicose, antocioninas, potássio, cálcio, vitamina A, amido, pectina e fósforo que somadas, lhe conferem propriedades biológicas benéficas (AKACHI, 2010). Assim, o Extrato Líquido do Camu-camu seria uma fonte promotora de energia e antioxidantes para os espermatozoides.

Para incorporar as fosfatidilcolina ao diluidor (assim como é presente naturalmente na membrana plasmática das células), excluindo o uso da gema do ovo, muito usada, mas que apresenta alto risco de contaminação microbiana, será adicionado ao suco do Camu-camu a lecitina de soja, que tem apresentado bons resultados na criopreservação de sêmen. (NEHRING; ROTHE, 2003).

A lecitina de soja junto aos componentes do extrato líquido do Camu-camu pode, de modo potencial, atuar sinergicamente na manutenção estrutural e funcional da membrana plasmática do sêmen de galos.

3. Objetivos (geral e específicos)

Objetivo Geral

- Avaliar o uso de extrato líquido do Camu-camu (*Myrciaria dubia*) em junção com lecitina de soja na diluição de sêmen de galo

Objetivos específicos

- Investigar se há efeito conservante do meio diluidor sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.
- Avaliar por quanto tempo os diluentes analisados conseguem preservar a qualidade seminal
- Apresentar métodos mais acessíveis e de qualidade para diluição e preservação do sêmen.

4. Revisão bibliográfica

4.1. Produção de sêmen de galos

Os galos contam com uma ausência de glândulas acessórias, por este motivo, o ejaculado é composto por uma grande quantidade de células espermáticas suspensas em um pequeno volume de plasma seminal, diferenciando-se dos demais animais domésticos. Desse modo, a concentração do sêmen de galos pode variar de um a cinco bilhões de espermatozoides por mL de ejaculado, um nível muito maior se comparado também aos outros animais de produção (WHITTOW, 2000).

O volume de seminal produzido depende da linhagem do reprodutor, de um modo geral, galos de linhagens leves produzem maior volume do que galos de linhagens pesadas, podendo-se obter volumes de 0,1 a 1,0 mL. Dentro da mesma linhagem, os galos de maior tamanho tendem a produzir um maior volume de ejaculado, pois que o volume está relacionado ao do tamanho do testículo que, por sua vez, está correlacionado com o peso corporal. Além disso, o volume ejaculado pode ser afetado pela técnica de coleta utilizada, pela experiência do coletor e por variações intrínsecas como estresse promovido pelo manejo, temperatura do ambiente e alimento e água fornecidos dentre outros (ETCHE, 1996).

4.2. Morfologia do espermatozoide de galos

Foi descoberto por Gilbert (1982), que os espermatozóides das espécies aviárias diferem dos mamíferos domésticos por serem de menor tamanho, com cabeças longas e filamentosas e por não possuírem gota citoplasmática, ainda que possua acrossoma, cabeça, peça intermediária e a peça principal da cauda. No mesmo estudo foi relatado que a cabeça dos espermatozoides de galos é curva e mede 12 a 13 μm de comprimento, e é recoberta pelo capuchão do acrossoma (2 μm de comprimento). A peça intermediária da cauda mede cerca de 4 μm de comprimento, e o restante do comprimento do espermatozóide de 100 μm é composto da peça principal da cauda. Em sua parte mais larga, o espermatozóide pode medir cerca de 0,5 μm .

Em estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão, Soares e Beletti (2006) observaram que o acrossoma dos espermatozoides de galos é composto por material homogêneo ou levemente granular. No interior do núcleo, a cromatina geralmente apresenta-se densa e levemente granular. Entretanto, foram observados espermatozoides com cromatina apresentando vários tipos de granulação e tonalidades de cinza, ou seja, com várias intensidades de compactação.

As alterações morfológicas nos espermatozoides de galos dividem-se como em outras espécies, em defeitos de cabeça e de peça intermediária, sendo os mais frequentes descritos por Jaenish (1989): cabeça enrolada, cabeça grande, em anzol, tumefeita, zigue-zague, membrana irregular, acrossoma ausente e acrossoma dobrado. Os defeitos de cabeça espermática estão relacionados a transtornos na espermatogênese, decorrentes principalmente de processos degenerativos das gônadas. Os achados mais frequentes na peça intermediária espermática foram: peça intermediária dobrada e peça intermediária tumefeita. Já a detecção de anomalias na cromatina dos espermatozoides é frequentemente negligenciada, por falta de estudos (SOARES; BELETTI, 2006).

4.3. Avaliação de qualidade do sêmen

A avaliação do sêmen é realizada considerando-se os aspectos físicos como volume, e o volume, este pode variar entre 0,5 a 1,0 ml (JAENISCH, 1989), coloração, aspecto do sêmen, motilidade espermática, vigor, vigor progressiva retilínea e concentração espermáticas do ejaculado, e morfológicos como anormalidades espermáticas (CBRA, 2013).

Harris *et al.* (1984) evidenciaram em estudos a importância do peso corporal na seleção de reprodutores, depois de encontrarem uma correlação positiva entre peso corporal e volume de sêmen. Ansah *et al.* (1980) encontraram valores médios de motilidade entre 0,22 a 3,0, utilizando escore de zero a quatro. Relativo à concentração, Marini e Goodman (1969) descreveram grandes variações entre linhagens de alta e baixa taxa de crescimento, nas quais obtiveram, respectivamente, $2,3 \times 10^6$ e $4,9 \times 10^6$ espermatozoides/ml em suas amostras.

Nishikawa (1959), em análise seminal de jumentos e de garanhão, foi pioneiro na classificação das alterações morfológicas relacionando ao local onde se apresentavam: cabeça, peça intermediária e cauda. No Brasil, segue-se as normas do CBRA (2013), na avaliação andrológica de reprodutores de todas as espécies. A classificação das anormalidades espermáticas deve ser agrupada em defeitos maiores e defeitos menores, baseados na classificação de Blom (1973).

4.4. Preservação de sêmen

A diluição do sêmen é uma prática de rotina nos estabelecimentos que usam a inseminação artificial, tendo em vista que maximiza o uso do ejaculado e permitindo a preservação da qualidade do sêmen por longos períodos (DONOGHUE; WISHART, 2000). Para manutenção do sêmen diluído, substratos energéticos (o principal para sêmen de aves é a frutose) e agentes tamponantes devem ser incorporados ao diluidor (CHRISTENSEN, 1995). Desta forma, o sêmen pode ser utilizado no dia posterior à coleta, desde que mantido refrigerado (5°C).

Quando estocado *in vivo*, nas glândulas hospedeiras de espermatozoides no trato reprodutivo das fêmeas, a célula espermática é capaz de manter sua capacidade fertilizante por várias semanas (BAKST e CECIL, 1992). Mecanismos para estabilização das membranas e inibição da motilidade e da atividade enzimática provavelmente auxiliem na sobrevivência dos espermatozoides dentro dessas glândulas. A preservação dos gametas masculinos nas glândulas hospedeiras também podem ser dependente da modulação lipídica de sua membrana; é possível que vesículas membranosas, semelhantes a lipossomas, liberadas das microvilosidades das células epiteliais glandulares, contribuam para a manutenção da membrana plasmática do espermatozoide (BAKST, 1993). A diluição do sêmen em um meio que reproduza as condições encontradas nas glândulas hospedeiras, pelos espermatozoides, aumentará sua viabilidade da preservação *in vitro*.

4.5. Sêmen de galos *in natura*

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), as características desejáveis para espermatozoides de galos puros e em temperatura ambiente são: motilidade espermática > 80%; vigor > 3; espermatozoides normais numa faixa de maior que 90% e um volume de dose entre 0,020 – 0,050 ML.

4.6. Diluentes seminais

O diluidores seminais são definidos como um meio aquoso que permite um aumento no volume do ejaculado até uma quantidade necessária para a distribuição das doses inseminantes, enquanto preserva a viabilidade espermática e mantém as taxas de fertilidade satisfatória (GADEA, 2003).

O diluente utilizado nos ejaculados é um composto bioquímico que permite o equilíbrio biofísico, fisiológico e também bioquímico às células espermáticas e ao ambiente, assim ele é composto por uma ampla variedade de substâncias quimicamente diferentes entre si como

frutose, minerais, carboidratos e outros, que tem como finalidade aumentar o volume do sêmen, proteger o espermatozoide contra choque térmico, fornecer substratos necessários ao metabolismo espermático, manter o pH e inibir o crescimento bacteriano, mantendo assim a qualidade dos espermatozoides até o momento da inseminação artificial (CORRÊA *et al.*, 2001).

Um diluente de boa qualidade não deve apresentar toxicidade aos espermatozoides, devem ser apresentados como um meio isotônico, conter um poder nutritivo e tamponante, ação estabilizadora de membrana, pH similar ao meio espermático, fácil manejo e preparo e baixo valor econômico. A utilização de um diluidor com essas qualidades é fundamental para o sucesso da inseminação artificial (CARDOSO *et al.*, 2003).

4.7. O Camu-camu

Dentre as frutas tropicais que apresentam compostos bioativos já estudados, o Camu-camu (*Myrciria dubia*) se destaca por possuir além de compostos bioativos, componentes secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis. Estudos realizados por Rufino *et al.*, (2010) apontam que além dos compostos fenólicos, os carotenoides e ácido ascórbico (vitamina C) apresentam capacidade antioxidante, que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres.

O camu-camu é tido, até o momento, como o maior provedor natural de vitamina C, apresentando elevadas concentrações do nutriente que podem variar entre 2.000 a 6.500 mg em 100 g de fruto (RODRIGUES *et al.*, 2001) o que equivale a quase 40 vezes ao da polpa de laranja ou 60 vezes ao suco de limão, podendo chegar a 3,0 g por 100g de polpa integral (ANDRADE *et al.*, 1995). A concentração de ácido ascórbico do camu-camu é superior à da acerola (1,79 g em 100 g de polpa) até pouco considerada como a fruta mais rica neste composto, além disso, o tipo de vitamina C encontrado no camu-camu não é destruído por altas temperaturas (METZKER, 2001).

Segundo Aguiar e Souza (2015), os frutos do camu-camu são excelentes fontes de diferentes compostos bioativos, tais como fibras, e compostos fenólicos, possuindo elevada capacidade antioxidante em comparação com outras frutas e contém níveis significativos de potássio, cálcio, vitamina A, glicose, frutose, amido, pectina, fósforo, ozoto. Apresentando inclusive minerais como o ferro, fósforo e também aminoácidos, como a serina, a valina e a leucina (SILVA *et al.*, 2006; AKACHI *et al.*, 2010; RUFINO *et al.*, 2010).

Ainda não há estudos relatando a utilização do extrato líquido de Camu-camu na diluição e preservação de sêmen animal ou mesmo humano.

4.8. Lecitina de soja

A lecitina é uma mistura de fosfolipídios (50%) sendo fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanol, triglicerídeos (35%) e glicolipídios (10%), carboidratos, pigmentos, carotenóides e outros microcompostos, presente em diversas fontes vegetais e animais, como soja e outros grãos, gérmen de trigo, peixe e fígado (GORMLEY, 1997).

Os fosfolipídios fazem parte da maior fração lipídica dos espermatozóides (SURAI, *et al.*, 2001) . Para Declair (1994), os fosfolipídios são componentes importantes das membranas celulares do organismo. Os lipídeos presentes na membrana dos espermatozóides estão presentes para o fornecimento de energia e influenciam na fertilidade

De todos os fosfolipídios que fazem parte da composição da lecitina, a fosfatidilcolina é sem dúvidas a mais importante. Sua molécula é composta por ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol-3fosfato e colina, que servem como fonte principal deste nutriente, usado na síntese dos componentes estruturais de todas as membranas celulares pelos estudos de Miller (2002).

A lecitina de soja também apresenta propriedades antioxidantes. De acordo com Aabdallah e Eid (2004) o efeito neuroprotetor da lecitina, da-se a esta ação, que protege tanto os ácidos graxos poliinsaturados, evitando sua oxidação e produção de radicais livres, como as células de todo o organismo

Diferente do Camu-camu, muito estudos anteriores já relataram o uso da lecitina de soja na preservação de sêmen, em substituição a gema de ovo, em variadas espécies.

5. Material e Métodos

5.1. Local

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética para o Uso de Animais (Protocolo de N. 011/2021) e conduzido no Setor de Avicultura em conjunto com o Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal da Universidade Federal do Amazonas.

5.2. Aves

foram utilizados 15 galos machos reprodutores (*Gallus gallus*) de linhagem híbrida, com 40 semanas de idade. Todos os galos foram alimentados com dieta calculada de acordo com as exigências nutricionais para reprodutores fornecidos por Rostagno *et al.* (2017).

Os galos receberam estímulo luminoso apenas da luz solar, que na região do experimento será equivalente a 12 horas diárias. Os animais eram manipulados semanalmente para que se familiarizassem com a presença dos coletores e com a ação da coleta, além de passarem pelo “toilet”, no caso, a retirada das pernas dos arredores da cloaca, para diminuição de áreas contaminantes que poderiam prejudicar a amostra

5.3. Coleta de sêmen

Levando-se em conta o clima da região no qual o experimento foi realizado, as coletas eram feitas nos horário de 8h-10h e de 15h-17h pois o ambiente encontrava-se mais ventilado e sem incidência solar muito forte.

Os machos foram previamente condicionados à produção (liberar ejaculado) de esperma por ação mecânica. A coleta experimental foi executada uma vez por semana. O galo era retirado do box, contido pelos pés e colocado com seu peito apoiado em uma plataforma acoplada a uma cadeira, onde ficava o operador sentado.

O animal então recebia a massagem na região dorsal e abdominal com movimentos crânio-caudais e em seguida era aplicada leve pressão com os dedos polegar e indicador da mão do operador, próximo à cloaca da ave, expondo-se o falo e o sêmen sobre este, de acordo com a metodologia proposta por Burrows e Quinn (1937). O sêmen era colhido mecanicamente pelo operador por aspiração. Para tal, foi usado um sistema de colheita de fechamento hermético a qual possui uma pipeta numa das extremidades direcionada para o falo do galo, a qual entrará em contato com o sêmen sobre o falo da ave que era sugada até o depósito de armazenamento.

Foram coletadas amostras seminais de 15 galos, cada um tido como uma unidade experimental, evitando-se assim o efeito macho.

Após a coleta, o sêmen de cada galo foi traspasado para 3 tubos graduados de 10 mL (para ser homogeneizado com os diluidores e analisado *in natura* . A média obtida foi de 0,8ml de sêmen, que eram divididos igualmente para cada tudo. Após a mistura, as amostras eram passadas para a lâmina e recoberta com lamínula afim de serem estudadas microscopicamente.

Todo material usado na colheita de sêmen foi mantido na temperatura de 37° C para evitar choque termica e possíveis alterações das características seminais.

5.4.Avaliação da qualidade do sêmen

O ejaculado foi diluído em Extrato Líquido de Camu-camu e lecitina de soja (ELC+L) e em Beltsville Thawing Solution® (BTS®), ambos seguiram a proporção 1:2 (sêmen: diluidor), seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Também foram analisadas amostras com sêmen *in natura*, usado como tratamento controle. Por conta do pH ácido do camu-camu, as amostras com este meio diluidor tiveram o mesmo devidamente ajustado com o uso de Fosfato de Sódio Dibásico, método também preconizado pelo CBRA (2013).

Tanto as amostras de sêmen diluídas quanto o *in natura* foram analisadas seguindo o protocolo padrão de tempo de estocagem previamente definidos, sendo a cada 15 min, 30 min, 45 min e 60 min em temperatura ambiente. As amostras de ejaculados de todos os itens foram analisadas pelos aspectos macro e microscópicos como volume, através de observação direta do tubo de colheita graduado; pH, através de medidor de pH portátil; concentração espermática, obtida a partir da contagem das lâminas com amostras de cada unidade experimental e cálculo da média, contados em câmara de Neubauer e numa diluição de 1:1000 em solução formol-salina-tamponada (HANCOCK, 1957), através de microscopia de luz (400x); a motilidade espermática, medida observando-se as amostras em microscópio óptico (400x); motilidade progressiva (0-5 sendo 0 para células totalmente imóveis e 5 para movimento em grupo) e morfologia espermática (teste supravital), obtida através de esfregaços em lâminas coradas com eosina. Foram confeccionadas 15 lâminas, e em cada lâmina foram contadas 200 células (5 x 6 x 100).

5.5.Defeitos maiores, menores e totais dos espermatozoides

Para a relação viva dos espermatozoides, o sêmen foi corado com solução de eosina 1:1 (sêmen:corante), seguida de exame microscópico (× 400). foram contados 200

espermatozoides, onde células com cabeça vermelha são consideradas células mortas e incolores como espermatozoides vivos. Células mortas serão classificadas de acordo com seus problemas morfológicos (cabeça rolada, cabeça dobrada, cabeça isolada, cauda isolada, cauda enrolada e presença de queda na cauda).

5.6. Análise estatística

Os dados percentuais foram transformados em arco seno raiz ($x/100$) antes das análises. A normalidade e homogeneidade das variâncias dos dados foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente.

A motilidade espermática, motilidade progressiva retilínea, patologias espermáticas e os defeitos menores totais foram analisadas por uma Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Tukey, para identificar diferenças estatísticas entre os tratamentos (sêmen in natura, camu-camu+lecitina e diluidor comercial) e tempo de estocagem (15, 30, 45 e 60 min).

O vigor espermático, os defeitos totais, defeitos maiores totais, cabeça isolada, cauda fortemente dobrada, cauda dobrada e cauda enrolada na porção terminal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Em todas as análises, um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Os dados são expressos pela média \pm desvio padrão (motilidade espermática, motilidade progressiva retilínea, patologias espermáticas totais, defeitos totais, defeitos maiores totais, defeitos menores totais, cabeça isolada, cauda fortemente dobrada, cauda dobrada e cauda enrolada na porção terminal), mediana, valor mínimo e máximo (vigor espermático).

6. Resultados

As primeiras amostras coletadas foram utilizadas para análises de parâmetros que o ejaculado puro precisa seguir, os resultados não dependem dos diluidores mas influenciam diretamente em nas suas respostas. A contagem da média da concentração espermática dos animais estudados, após diluição em solução formol-salina e contagem na câmara de Neubauer, resultou em $3,5 - 3,8 \times 10^6$ de espermatozoides por ml. Também foi realizado o teste hiposmótico, para avaliação da funcionalidade da membrana espermática. 200 espermatozoides foram contados como preconiza o CBRA (2013), e a média de células reativas foi de 97%, sendo possível visualizar vários espermatozoides com cauda enrolada e dobrada.

O movimento de massa foi presente em todas as amostras coletadas. Da mesma forma, em todas as amostras coletadas, o ejaculado apresentava a cor branca e de aspecto leitoso. O pH das amostras variou entre 6,9 e 7,3.

Voltando-se aos resultados obtidos em virtude do material usado para a diluição, em respeito a motilidade espermática do sêmen de galinha, no intervalo de 15 min na presença do diluidor comercial foi maior ($p < 0,05$) do que o camu-camu+lecitina. Por outro lado, a motilidade do sêmen contendo camu-camu+lecitina não diferiu ($p > 0,05$) quando comparado com o sêmen *in natura*, o qual também foi semelhante ($p > 0,05$) ao diluidor comercial.

No tempo de 30 min, a motilidade espermática do sêmen no diluidor comercial também foi maior ($p < 0,05$) do que o camu-camu+lecitina. Aos 45 min, a motilidade do sêmen na presença do diluidor comercial foi maior ($p < 0,05$) em relação ao sêmen *in natura* e camu-camu+lecitina, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$). No tempo 60 min, o diluidor comercial foi superior ($p < 0,05$) quando comparado ao sêmen *in natura* e camu-camu+lecitina. Por sua vez, a motilidade foi maior ($p < 0,05$) no sêmen *in natura* em relação ao camu-camu+lecitina (Tabela 1).

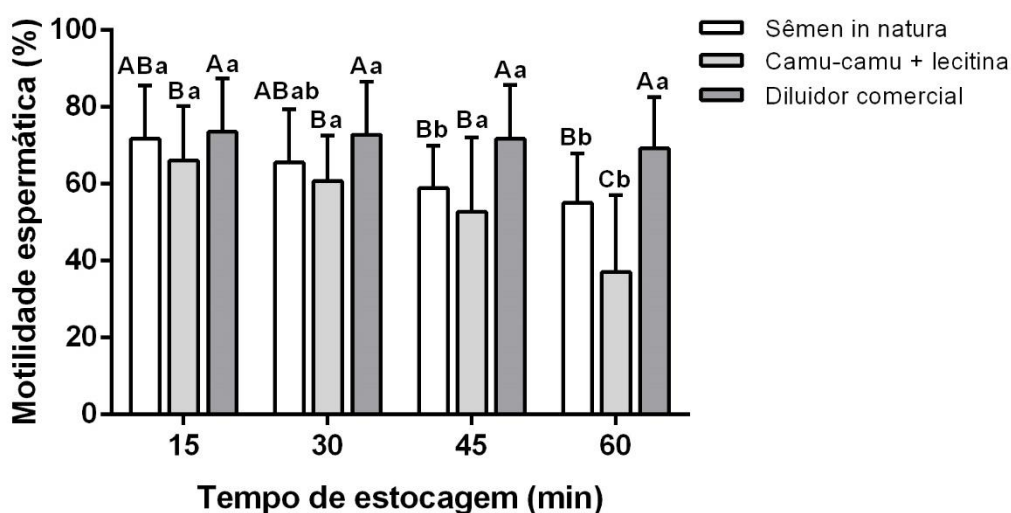
Tabela 1. Motilidade espermática (%) do sêmen de galinha estocado na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos

Diluidor	Tempo de estocagem (min)			
	15	30	45	60
Sêmen <i>in natura</i>	75,30 ± 8,15 ^{ABa}	68,58 ± 10,54 ^{ABab}	61,59 ± 6,18 ^{Bb}	57,75 ± 9,46 ^{Bb}
Camu-camu + lecitina	66,50 ± 8,10 ^{Ba}	60,64 ± 7,28 ^{Ba}	56,30 ± 15,50 ^{Ba}	32,65 ± 14,32 ^{Cb}
Diluidor comercial	77,25 ± 7,50 ^{Aa}	76,30 ± 7,69 ^{Aa}	75,20 ± 8,52 ^{Aa}	70,3 ± 5,56 ^{Aa}
Efeitos (Valor de P)				
Diluidor	<0,001			
Tempo	<0,001			

Letras maiúsculas distintas no mesmo tempo e letras minúsculas entre os tempos de estocagem indicam diferença estatística significativa pela ANOVA de duas vias e teste de Tukey ($p < 0,05$).

A motilidade espermática do sêmen mantido na presença do diluidor comercial não mudou ($p > 0,05$) ao longo do tempo. No sêmen *in natura*, a motilidade decresceu ($p \leq 0,05$) a partir de 45 min em relação a 15 min. No sêmen mantido com camu-camu+lecitina, a motilidade se manteve ($p > 0,05$) até 45 min, porém diminuiu ($p < 0,05$) em 60 min (Figura 1).

Figura 1. Demonstrativo gráfico da motilidade espermática (%) do sêmen de galinha estocado em intervalos de até 60 min, condicionados a diluição



O vigor dos espermatozoides foi semelhante ($p > 0,05$) entre os tratamentos nos intervalos de 15 e 30 min de estocagem. Por outro lado, no tempo 45 e 60 min, o vigor das células no diluidor comercial foi maior ($p < 0,05$) em comparação ao diluidor contendo camu-camu+lecitina, o qual não diferiu ($p > 0,05$) do sêmen *in natura* (Tabela 2).

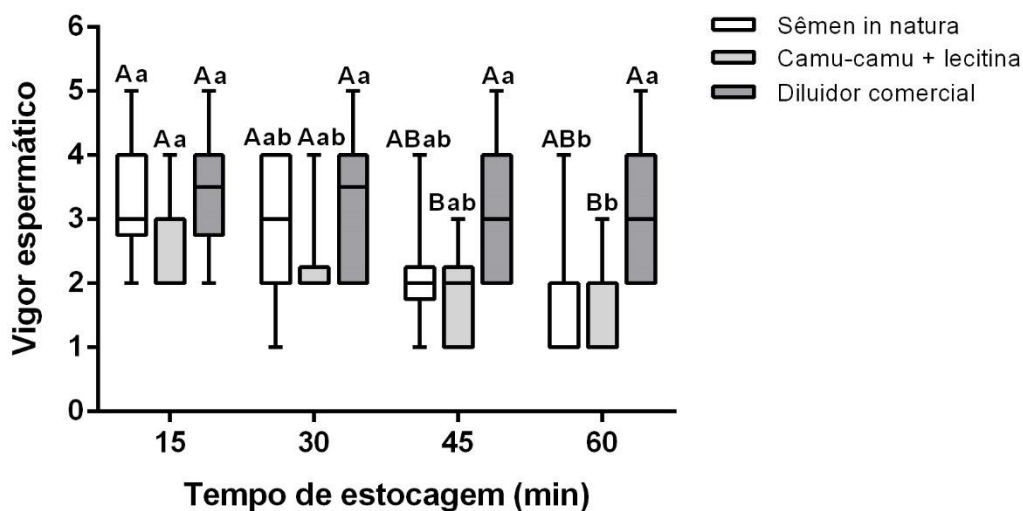
Tabela 2. Vigor dos espermatozoides de galinha estocados na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos

Diluidor	Tempo de estocagem (min)			
	15	30	45	60
Sêmen <i>in natura</i>	3 (2 e 5) ^{Aa}	3 (1 e 4) ^{Aab}	2 (1 e 4) ^{ABab}	2 (1 e 4) ^{ABb}
Camu-camu + lecitina	3 (2 e 4) ^{Aa}	2 (2 e 4) ^{Aab}	2 (1 e 3) ^{Bab}	1 (1 e 3) ^{Bb}
Diluidor comercial	3,5 (2 e 5) ^{Aa}	3,5 (2 e 5) ^{Aa}	3 (2 e 5) ^{Aa}	3 (2 e 5) ^{Aa}

Os dados são expressos como mediana (mínimo e máximo). Letras maiúsculas distintas no mesmo tempo e letras minúsculas entre os tempos de estocagem indicam diferença estatística significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$).

Durante todo tempo de estocagem, somente o sêmen mantido no diluidor comercial permaneceu com o vigor espermático inalterado estatisticamente. Porém, no sêmen *in natura* e no diluidor com camu-camu+lecitina, o vigor decresceu ($p < 0,05$) no tempo 60 min em comparação ao tempo de 15 min de estocagem (Figura 2).

Figura 2. Demonstrativo gráfico dos resultados obtidos em análises de vigor espermático nas amostras submetidas a diluição e estocadas em até 60 min



Com relação aos estudos das patologias encontradas, nos primeiros 15 minutos, a quantidade de patologias espermáticas totais foi semelhante ($p > 0,05$) entre os tratamentos. No entanto, no tempo 30, 45 e 60 min, a quantidade total de patologias foi maior ($p < 0,05$) no sêmen contendo camu-camu+lecitina em relação ao diluidor comercial e o sêmen *in natura*, os quais foram semelhantes entre si ($p > 0,05$) (Tabela 3).

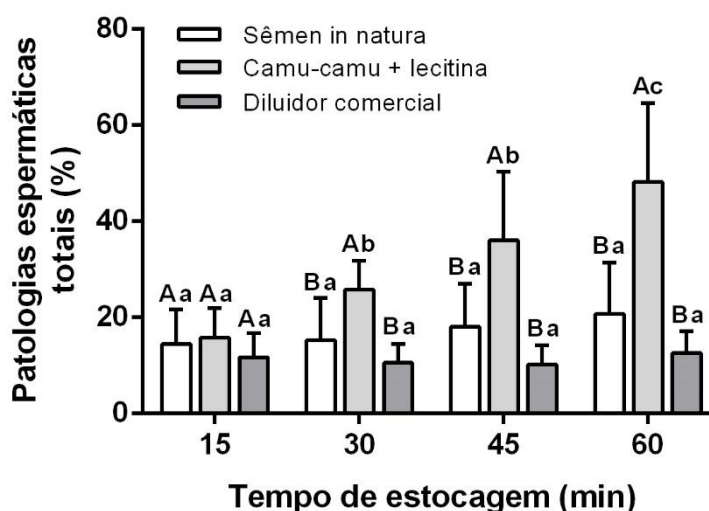
A quantidade total de patologias espermáticas não diferiu ($p > 0,05$) durante o tempo de estocagem no sêmen *in natura* e diluidor comercial. Porém, no sêmen contendo camu-camu+lecitina, a quantidade de espermatozoides com patologias aumentou significativamente nos tempos 30, 45 e 60 min em relação ao tempo inicial de 15 min (Tabela e Figura 3).

Tabela 3. Patologias espermáticas totais (%) do sêmen de galo estocado na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos

Diluidor	Tempo de estocagem (min)			
	15	30	45	60
Sêmen <i>in natura</i>	12,78 ± 4,44 ^{Aa}	13,11 ± 4,73 ^{Ba}	16,22 ± 6,36 ^{Ba}	19,06 ± 8,17 ^{Ba}
Camu-camu + lecitina	14,20 ± 3,15 ^{Aa}	24,72 ± 5,01 ^{Ab}	32,89 ± 11,01 ^{Ab}	42,89 ± 9,40 ^{Ac}
Diluidor comercial	10,63 ± 3,88 ^{Aa}	10,61 ± 3,94 ^{Ba}	10,47 ± 3,78 ^{Ba}	13,59 ± 3,76 ^{Ba}
Efeitos (Valor de P)				
Diluidor	<0,001			
Tempo	<0,001			
Diluidor x Tempo	<0,001			

Letras maiúsculas distintas no mesmo tempo e letras minúsculas entre os tempos de estocagem indicam diferença estatística significativa pela ANOVA de duas vias e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3. Demonstrativo gráfico de patologias espermáticas totais (%) do sêmen de galo submetidos a diluição e estocados em até 60 minutos



O percentual de espermatozoides de galo com defeitos morfológicos totais foi menor ($p < 0,05$) no sêmen contendo diluidor comercial quando comparado ao sêmen *in natura* e diluidor contendo camu-camu + lecitina. Valores semelhantes foram observados nos defeitos morfológicos maiores, onde o percentual de espermatozoides com essas características também foi menor ($p < 0,05$) em relação ao sêmen *in natura* e diluidor contendo camu-camu + lecitina. No que se refere aos defeitos morfológicos menores, os valores diferiram ($p < 0,05$) entre os tratamentos, com valores de 3%, 5% e 7% para o diluidor comercial, sêmen *in natura* e diluidor contendo camu-camu + lecitina (Tabela 4).

Tabela 4. Defeitos morfológicos (%) dos espermatozoides de galo estocados na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos.

Diluidor	Defeitos totais	Defeitos maiores	Defeitos menores
Sêmen <i>in natura</i>	11 ± 4 ^A	5 ± 1 ^A	5 ± 1 ^B
Camu-camu + lecitina	14 ± 6 ^A	7 ± 3 ^A	7 ± 2 ^A
Diluidor comercial	5 ± 3 ^B	3 ± 1 ^B	3 ± 1 ^C

Letras maiúsculas distintas entre os diluidores indicam diferença estatística significativa pela ANOVA de uma via e teste de Tukey (defeitos totais e maiores), e pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (defeitos menores) ($p < 0,05$).

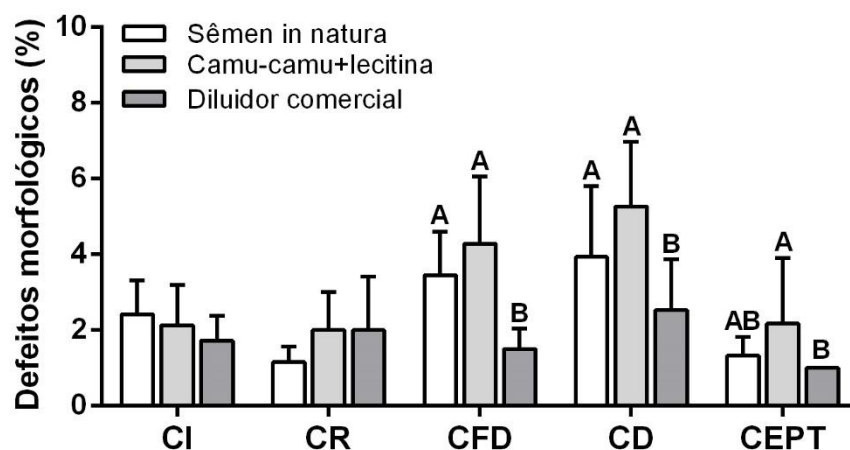
O percentual de cabeça isolada e reta não foi afetados pelos produtos usados para diluição ($P > 0,05$). Por outro lado, a cauda fortemente dobrada, cauda dobrada e cauda enrolada na porção terminal foram significativamente afetadas pelos diluidores. O percentual de espermatozoides com a cauda fortemente dobrada e cauda dobrada foi menor ($p < 0,05$) no sêmen contendo diluidor comercial quando comparado com o sêmen *in natura* e diluidor contendo camu-camu + lecitina, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$). Além disso, a quantidade de espermatozoides com a cauda enrolada na porção terminal não diferiu ($p > 0,05$) entre o diluidor comercial e sêmen *in natura*. Por outro lado, esse resultado foi um ponto percentual menor ($p < 0,05$) no diluidor comercial em comparação ao diluidor contendo camu-camu + lecitina (Tabela e Figura 5).

Tabela 5. Defeitos morfológicos (%) na cabeça (isolada, reta) e na cauda (fortemente dobrada, dobrada e enrolada na porção terminal*) dos espermatozoides de galo estocados na presença e ausência de diluidor durante 60 minutos

Diluidor	Cabeça			Cauda	
	Isolada	Reta	Fortemente Dobrada	Dobrada	Enrolada*
Sêmen <i>in natura</i>	2 ± 1	1 ± 0,6	3 ± 1A	4 ± 2A	1 ± 1AB
Camu-camu + lecitina	2 ± 1	2 ± 1	4 ± 2A	5 ± 2A	2 ± 2A
Diluidor comercial	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1B	3 ± 2B	1 ± 0B

Letras maiúsculas distintas entre os diluidores indicam diferença estatística significativa pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn ($p < 0,05$).

Figura 5. Gráfico demonstrativo dos defeitos morfológicos (%) na cabeça (isolada, reta) e na cauda (fortemente dobrada, dobrada e enrolada na porção terminal*) dos espermatozoides de galo submetidos a diluição e estocados até 60 minutos.



Aparte dos parâmetros buscados e analisados no trabalho, nas amostras dos ejaculados de dois animais estudados, também foi possível encontrar a presença de um tipo de ácaro (Imagem 1) ainda não identificado por meio dos estudos.

Todas as amostras seguiram o mesmo protocolo de higienização do material usado para evitar intercorrências como esta, logo, foi constatado que os ácaros realmente estavam presentes nos ejaculados dos animais. Estes mesmos, passaram por um rigoroso processo de escolha, onde apenas foram selecionados ao que apresentavam as melhores características reprodutivas e sem aspectos patológicos.



Imagem 1. Ácaro encontrado em 2 amostras de ejaculado dos animais estudados.

Fonte: Foto do acervo pessoal do próprio autor.

7. Discussão

O resultado obtido na média de volume de sêmen obtido dos animais estudados foi condizente com o que preconiza o CBRA (2013) e os resultados adquiridos por Jaenish (1989), mostrando uma variação entre 0,5 e 1,0 ml. Resende *et al.* (1983) em estudos sobre avaliação do ejaculado de galos, também encontraram variações nas médias de volume logrados por diferentes autores, como podemos perceber, esta observação se estende até os dias atuais. Deste modo, estes autores declararam que as variações de volume de sêmen ocorrem devido a linhagem, fatores climáticos, idade do reprodutor, ao peso, regime alimentar, frequência e tecnologia usadas para coletas.

Levando em conta os bons valores obtidos nos resultados dos ejaculados dos animais trabalhados, pode-se então afirmar que o condicionamento dos galos foi realizado de forma correta e, também, que a partir das primeiras coletas, esses animais tendem a manter e padronizar a produção do sêmen.

Quanto a concentração alcançada, vemos que esta abaixo da descrita pelo CBRA (2013), contudo, esta dentro dos parâmetros se comparado a outros estudos já realizados. Marini e Goodman (1969) já haviam relatado grande variação de concentração entre linhagens leves e pesadas, que resultaram em alterações entre $2,3 \times 10^6$ e $4,9 \times 10^6$ células/ml. A média encontrada também se mostra superior aos resultados mostrados por Andrade *et al.* (1989), onde temos $1,99 \times 10^6$ e também está dentro das variações encontradas por Graft *et al.* (1926) que nos deu valores entre 2×10^6 e 4×10^6 de espermatozoides/mm³ para a espécie estudada.

Na variação de resultado da concentração, também pode ser correlacionado os fatores supracitados para volume. O bom valor obtido nos estudos, pode se dar, inclusive, a idade dos animais analisados, já que é de conhecimento que a produção de espermatozoides no galo atinge seu máximo entre 24 e 30 semanas de idade, mantêm-se elevada até 40-45 semanas de idade e depois ocorre diminuição do mesmo (BRILLARD; MCDANIEL, 1985; ROSENTRAUCH *et al.*, 1994).

O valor do pH seminal dos animais estudados foi de extrema importância neste estudo. Por estarmos trabalhando com um composto ácido como o Camu-camu, logo, era sabido que precisaríamos deste resultado para equalizar, de forma precisa, os dados, ou este já seria um fator de corte para a utilização do diluidor a base dessa fruta com o propósito a ele destinado, dado ao fato de que o pH seminal apresentar um valor

básico.

De acordo com Wheeler e Andrews (1943), a média do pH do sêmen do galo é 7,04, já para Perez (1966) há variação de 6,3 a 6,6 e em seus estudos, Carvalho relata (1976) média de 6,91 com galos da linhagem White Legorn. O pH obtido neste estudo (entre 6,9 e 7,3) apresentou-se inferior ao citado por Wheeler e Andrews (1943), todavia, mostrou-se maior quando comparado aos valores determinados por Perez (1966) e Carvalho (1976). Esta variação pode ter correlação com as linhagem estudadas, alimentação e fatores climáticos principalmente, dentre outras possíveis causas.

A motilidade é um dos parâmetros principais para a demonstração da fertilidade de amostras de sêmen estudadas para uma posterior IA. Durante todo o tempo de estocagem, foi perceptível a resposta superior do diluidor comercial ao diluidor proposto no estudo. O sêmen quando analisado *in natura* já se mostrava um pouco abaixo dos parâmetros estabelecido pelo CBRA (2013), que preconiza o valor de 80% de motilidade dos espermatozoide, ainda sim, o diluidor comercial conseguiu manter essa porcentagem encontrada., enquanto o diluidor de ELC+L não conseguiu manter a qualidade e fez com que a porcentagem decaísse, equiparando-se ao espermatozoide não diluído.

Em resultados relatados por Froman *et al.* (2003) foi descrito que a motilidade espermática é um processo altamente ligado à síntese de ATP no ejaculado de galos, onde encontra-se uma correlação grande entre a motilidade e o nível de ATP na mitocôndria presente no sêmen destes animais. É possível que o diluidor comercial usado ofereça ao espermatozoide um acesso mais fácil aos seus açúcares, fontes de energia, e ainda que as fontes de energia do Camu-camu possam ser mais difíceis de serem degradadas por estas células, logo, por estes motivos, o diluidor comercial tenha dado melhores resultados.

Neste estudo, a avaliação da motilidade foi feita por análise visual do examinador, o que sabemos que traz um certo grau de subjetividade. Hoje em dia, já se pode contar com programas computacionais tanto para averigar a motilidade, quanto a morfologia, diminuindo-se assim o grau de tendenciosidade e falhas do examinador (BELETTI *et al.*, 2005), inclusive, a motilidade foi um dos primeiros parâmetros seminais a ser examinado por um programa computacional exclusivo para esta tarefa (DOTT, 1975). O sistema CASA (computer assisted sperm analysis) seria o mais indicado para este estudo, porém a região onde foi feita a pesquisa não conta com os equipamentos necessários para o uso deste software, e como o experimento foi realizado na época da pandemia da COVID -19, não foi possível contato com outros laboratórios em outros estados para a conclusão mais elaborada desta análise.

Se na análise da motilidade temos o número de espermatozoides móveis, ao estudarmos o vigor espermático, estamos atrás da intensidade do movimento que estas células estão fazendo (CBRA, 2013). Em suas pesquisas, Celeghini *et al.* (2000), descreveu correlação entre as medidas de motilidade e vigor espermáticos em amostras de ejaculados de galos da linhagem AgRoss, o que podemos ver também em outras linhagens estudadas por outros autores. No primeiro momento de estocagem, o sêmen tratado com ambos os diluentes e *in natura* obtiveram os mesmos resultados e nos momentos finais de estocagem, o diluidor comercial se sobressaiu novamente, enquanto os outros tratamentos tiveram redução dos resultados positivos.

Como na questão da motilidade, deve-se levar em conta que o diluidor comercial já veio criado com o propósito de conservação, logo, é possível que pela sua composição, suas fontes de energia sejam melhores absorvidas pelos espermatozoides, mesmo que o diluidor a base de Camu-camu tenha um bom teor de carboidratos, chegando em 4.5g/100g da fruta fresca Akter *et al.* (2011) e ofereça glicose e frutose como fonte de açúcar (Zapata & Dufour, 1993), além de que em conjunto com a Lecitina, apresente glicolipídios e mais uma parcela de carboidratos (GORMLEY, 1997). Este argumento vai de encontro com o fato de que os resultados do diluente a base de camu camu e lecitina, não diferiram dos resultados encontrados no sêmen *in natura*.

O vigor encontrado nas amostras de sêmen analisadas antes das diluições e estocagem, resultava na classificação mínima para o método de coleta por massagem dorsoabdominal preconizado pelo CBRA (2013), por este motivo, nenhuma amostra chegou a classificação máxima de vigor progressivo retilíneo, apenas tivemos resultados intermediários e o diluidor comercial manteve o mesmo. Mesmo que os galos da linhagem FC Cabocla 1, sejam usados regularmente como reprodutores e que estivessem no pico de produção, além de condicionados a coleta, mesmo com a alimentação voltada exatamente para as exigências nutricionais de galos reprodutores, os resultados não chegaram às melhores respostas mesmo antes do trabalho, porém como eram os únicos animais disponíveis para estudo no período, por motivos de maior, os mesmos foram utilizados.

Muitos autores correlacionam a queda das características de fertilidade do sêmen com a idade dos animais (LAKE, 1989; SEXTON *et al.*, 1990; HOCKING, 1989; ROSENSTRAUCH *et al.*, 1994), porém Rocha Junior e Baião (2001) não encontraram diferenças significativas nas características utilizadas como parâmetros em amostras de ejaculados. No presente trabalho, como já mencionado, os galos foram escolhidos com idade homogênea e relacionada ao pico de produção, por este motivo, esta variável não foi estudada.

O Camu-camu foi pensado como base para diluidor e preservante de sêmen pela quantidade de compostos antioxidantes que possui com a possibilidade de resguardar o espermatozoide dos efeitos da peroxidação lipídica, fator determinante sobre a motilidade e viabilidade espermática (RODENAS, 2005), este acontecimento fisiológico, por mais que seja natural, ocasiona danos às células espermáticas, aumentando o número de espermatozoides com defeito. Em suas pesquisas, Moss et al. Relatou que, independentemente de espécie ou animal, toda amostra de sêmen tem sua porcentagem de células anormais e Lukaszewics (2008) afirmou que essa em média não deve ultrapassar de 20% a 30%, para Surai e Wishart (1996), uma porcentagem maior que 20% já influencia num decréscimo da fertilidade.

Os defeitos ligados a cabeça do espermatozoide geralmente ocorrem ainda na espermatogênese, por intercorrências nesse processo. É possível observar no trabalho, que a maioria das anormalidades espermáticas ocorreram na cauda, seguida pela cabeça, este resultado vai de encontro com os relatos de Feyisa *et al.* (2018) avaliando quatro diferentes linhagens de galos nativos na Coreia. Para estes autores, outra conclusão obtida é que a parte relacionada a cauda da célula espermática é bem mais vulneráveis aos fatores ambientais em que estão presentes.

Uma das propostas de análise que seria executada neste trabalho consistia na medição da pressão osmótica do diluidor a base de ELC+L, um fator de extrema importância quando se trata de meios para a preservação do sêmen, infelizmente, esta avaliação foi descartada pois não havia equipamentos necessários para análise no local da pesquisa e por interferência da pandemia da COVID-19, as amostras que seriam levadas a um laboratório de outro estado, o qual teríamos parceria, não puderam ser transportadas.

A análise da pressão osmótica poderia explicar os resultados inferiores do diluidor a base de Camu-camu e lecitina em comparação aos outros meios e ao sêmen *in natura*. Como o diluidor comercial é conhecido, o próprio fornecedor nos deu o valor da pressão osmótica do mesmo, no valor de 355 mosmol/kg H₂O com pH, 7,5.

Como as amostras tiveram uma reatividade muito alta no teste hiposmótico, sendo assim, logo apresentando dobramento ou enrolamento da cauda, era esperado que a qualquer mudança no equilíbrio osmótico seria bastante visível.

Van WAMBEKE (1977) elencou que não houve agravos críticos na fertilidade quando a pressão osmótica do diluente variava de 340 a 460 mosmol/kg H₂O, mas antes disso, outros autores já haviam exposto a influência que o pH (BOGDONOFF e SHAFFNER, 1954; HOBBS e HARRIS, 1963) e a osmolaridade (HOBBS e HARRIS, 1963) exercem na fertilidade. No

mesmo estudo, estes autores mostraram que a fertilidade mais alta foi obtida com 425 mosmol/kg H₂O, mas que a capacidade de fertilização dos espermatozoides de galo pode ser maior ou menor em meios que variavam amplamente em pH e osmolaridade.

É necessário que haja mais trabalhos sobre a linhagem híbrida selecionada e suas características reprodutivas seminais. Por mais que sua entrada no período sexual seja precoce e seu volume de ejaculado seja muito bom para a espécie, suas propriedades seminais não apresentaram os melhores resultados *in natura*, o que interferiu na análise dos diluidores.

Novas pesquisas com variantes que não foram estudadas podem dar uma nova narrativa ao uso de Camu-camu neste processo, visto que as propriedades contidas nesta fruta e na lecitina são necessários ao processo de sobrevivência do espermatozoide.

É de grande importância que achemos um produto regional para substituir os diluidores comerciais conhecidos, pois no estado do Amazonas não há venda desse produto e caso seja preciso, é necessário que seja pedido pela internet e nem todos os produtores têm acesso à internet ou sabem como fazer o pedido. Além do mais, o valor do produto e mais o frete para nossa região, faz com que o diluidor não saia por menos de R\$ 300,00.

Um artigo oriundo deste trabalho foi submetido à revista *Animal Biotechnology*.

8. Conclusão

Mesmo com todos os biocompostos contidos no Camu-camu e em conjuntos com os trazidos pela Lecitina de soja, o diluidor tendo ambos como base não foi bem recebido pelas células espermáticas.

Quando se trata de meios diluidores, a análise da pressão osmótica e a medição do pH se apresentam como fatores de corte para o uso de qualquer novo produto usado.

9. Referências bibliográfica

- AABDALLAH, D. M.; EID, N. I. Possible neuroprotective effects of lecithin and alpha-tocopherol alone or in combination against ischemia/reperfusion insult in rat brain. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 18, p. 273-278, 2004.
- ABPA. Associação Brasileira Proteína Animal. **Mercado Mundial**. Disponível em: <<http://abpabr.com.br/storage/files/relatorio-anual-2022.pdf>> Acesso em 22 de agosto. de 2022.
- AGUIAR, J.P.L.; SOUZA, F.C.A. Antioxidants Chemical Composition and minerals in freeze-dried camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K) Mc Vaugh) pulp. **Food and nutrition Science**. 2015.
- AKTER, S., OH, S., EUN, J. B., AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: a review. **Food Research International**, 44, 1728–1732. 2011.
- AKACHI, T. *et al.* 1-methyl malate from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) suppressed D-galactosamine-induced liver injury in rats. **Biosci Biotechnol Biochem**, p.573-578. 2010.
- ANDRADE, J. S. *et al.* Changes in the concentration of total vitamin C during maturation and ripening of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruits cultivated in the upland of Brazilian Central Amazon. **Acta Horticulturae**, v. 370, p.177-180, 1995.
- ANDRADE, M.A.A.; LIMA, C.T.F.; FILHO, E.F.; WISCHRAL, A. Estudo das características físicas e pH do sêmen de galos Hubbard White Mountain (*Gallus gallus domesticus*, L.) criados no Estado de Pernambuco. **Caderno Ômega da Universidade Federal de Pernambuco**, Série Veterinária, Recife, n.3, p.51-58, 1989.
- ANSAH, G.A.; CROBER, D.C.; BUCKLAND, R.B.; SEXTON, A.E.; KENNEDY, B.W. Artificial insemination of individually caged broiler breeders. Reproductive performance of males in relation to age and strain of females. **Poultry Science**, Savoy, v.59, n.2, p.428-437, 1980.
- AMBROGI, M. *et al.* Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, 29, p.543–552, 2006.
- AMANN, R. P. Symposium: Managing poultry reproduction to satisfy market demands. **Poultry Science**, v.78, p.412-413, 1999.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

BAKST, M.; CECIL, H. Effect of modifications of semen diluent with cell culture serum replacements on fresh and stored turkey semen quality and hen fertility. **Poultry Science**, v.71, p.754-764, 1992.

BAKST, M. R. Oviducal sperm storage in poultry: a review. **Reproduction Fertil Dev.** v.5, p.595-599, 1993.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. Guardieiro MM. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz J Morphol Sci**, v.22, p.85-90, 2005.

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

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

BLOM, E. Interpretation of spermatocytology in bulls. **J Fertil Steril**, v.1, p.223-228, 1950.

BONGALHARDO D.C. Produção e preservação do sêmen de galos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.37, n2, p.131-135, abri/jun. 2013.

BURROWS, W. H.; QUINN. J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**. p.19-24, 1937.

BOGDONOFF, P.D., SHAFFNER, C.S. The effect of pH on the in vitro survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen. **Poult. Sci**, 33(3):665-669. 1954.

CARDOSO, R. C. S. *et al.* Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology Stoneham**, v.59, n. 3-4, p. 743-751, 2003.

CARVALHO, M. R. Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de galos White Legorn em confronto com a fertilidade. Belo Horizonte. 31 p. Dissertação (Mestrado) - **Escola de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa Gerais**. 1976.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL: **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte, p. 20-22, 2013.

CELEGHINI, E. C. C. *et al.* Correlações entre as características seminais, parâmetros testiculares (peso e histologia) e peso corporal em galos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, n. 2, p. 57, 2000.

CRAFT, W.A.; McELORY, V.H.; PENQUITE, R. The influence of certain feeds upon the production of spermatozoa by the domestic chicken. **Poultry Science**, Texas, v.5, n.3, p.187-189, 1926.

CHIRINOS, R. *et al.* Antioxidant compounds and antioxidant capacity of peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, p.1019–102. 2010.

CHRISTENSEN, V. L. Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. In: **International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry**, 1, Savoy, IL. Proceedings... Savoy, IL: Poultry Science Association, p.90-106. 1995.

CORRÊA, M. N. *et al.*: **Inseminação artificial em suínos**. Copyright. Pelotas, Brasil, p. 194, 2001.

DECLAIR, V. Uso de triglicérides de cadeia média na prevenção de úlceras de decúbito. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Rio de Janeiro, v.47, n. 2, p. 127-130, 1994.

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

DOTT, H. M. The estimation of the proportion of motile bull spermatozoa in various diluents and a comparison with the proportion eosinophilic. **Reproduction**, v. 45, n. 1, p. 47-55, 1975.

DUARTE, V. *et al.* Inclusion of canthaxanthin and 25hydroxycholecalciferol in the diet of broiler breeders on performance and incubation parameters. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.11, p.2050-2055, 2015.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. USDA.gov - **United States Department of Agriculture**. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf . Acesso em: 25 maio. 2022.

ETCHER, R. J. Reproduction in poultry. Cambridge, UK: **CAB International**, 1996.

FEYISA, S.G.; PARK, Y.H.; KIM, Y.M.; LEE, B.R.; JUNG, K.M.; CHOI, S.B.; CHO, C.Y.; HAN, JY. Morphological defects of sperm and their association with motility, fertility, and hatchability in four Korean native chicken breeds. **Asian Journal of Animal Science**, v.31, n.8, p.1160-1168, 2018.

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

FULTON, J. E. Avian Genetic Stock Preservation: An Industry Perspective. **Poultry Science**, v.85, p.227-231, 2006.

GADEA, J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish J. Agr. Res.**, v.1, p.17-27, 2003.

GILBERT, A. B. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E.S.Z.

Reprodução animal. São Paulo: Manole. p.488-515.1982.

GORMLEY, J. J. Brewer's yeast and lecithin: two underrated health promoters. **Better Nutrition**, El Segundo, v.59, n. 2, p. 32, 1997.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v.76, p.84-97, 1957.

HARRIS, G.C.; BENSON, J.A.; SELLERS, R.S. The influence of daylength, body weight and age on the reproductive ability of broiler breeder cockerels. **Poultry Science**, Savoy, v.63, n.8, p.1705-1710, 1984.

HOBBS, T.D., HARRIS, G.C. Effect of freezing point depression and pH on motility and fertility of chicken spermatozoa stored in sodium citrate extenders. **Poult. Sci**, 42(2):254-259. 1963.

HOCKING, P.M. Effect of dietary crude protein concentration on semen yield and quality in male broiler breeder fowls. Br. **Poult. Sci.**, v.30, p.935-945, 1989.

JAENISCH, F.R.F. Estudo anatomopatológico dos testículos e epidídimos e características físicas e morfológicas do sêmen de Gallus domesticus com diferentes pesos corporais. Belo Horizonte: **Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária**. 69p. (Dissertação de Mestrado). 1989.

LAVOR, C. T. B. *et al.* Qualidade e conservação de sêmen de galos (Gallu gallu) com uso de água de coco em pó (ACP-108). In: **III Encontro Internacional de Jovens Investigadores**. 3 ed. Editora Realize. p. 152-161, 2017. Disponível em:<https://www.editorarealize.com.br/revistas/joinbr/trabalhos/TRABALHO_EV081_MD1_SA129_ID2282_15092017234155.pdf>. Acesso em 22 de nov. de 2019.

LAKE, P. E. Recent progress in poultry reproduction. **World's Poult. Sci. J.**, v.45, p.53-59, 1989.

LUKASZEWICZ, E. *et al.* Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different straining methods. **Research in Veterinary Science**. 85: p.583-588, 2008.

MARINI, P. J.; GOODMAN, B. L. Semen characteristics as influenced by selection for divergent growth rate in Chickens. **Poultry Sci**. N 3. Vol. 48, pag 859-865. 1969.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L., Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

- METZKER, M. Pela soberania científica da Amazônia. In: **Revista SEBRAE**, n.2, dez/jan. p. 47-51. 2001.
- MILLER, D. L. Health benefits of lecithin and choline. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 47, n. 5, p. 178-184, 2002.
- MOREIRA-NETO, J. J. S. *et al.* Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **International Endodontic Journal**. v. 42, n. 9, p. 827-830, 2009.
- MOSS, Shaun M. *et al.* The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 110, n. 2, p.247-250, jun. 2012.
- NEHRING, H.; ROTHER, L. Insemination of cryopreserved bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders. In: **Proceedings of the 15th European A.I. Vets Meeting, Budapest, Hungary**. Budapest: EAIVM. p. 14-23., 2003.
- NISHIKAWA, Y. Studies on reproduction in horses. Tokyo: **Japan Racing Association**, p. 340, 1959.
- PEREZ. F. P. Reproduccion y inseminacion artificial ganadera. Zaragoza : **CientRico-Médica**, cap. 26, p. 521-543 : Inçemination artificial en la gallina, povo y pintada. 1966.
- RESENDE, O.A.; MONTEIRO, J.M.L.; SANTOS, M.W., DIAS, P.G.O.; SOUZA, S.O. Inseminação artificial em galinhas. **Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Boletim técnico**, n.6, Niterói, maio, 1983.
- RODENAS, Carolina Elizabeth Orihuela *et al.* Características seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 160-167, 2005.
- RODRIGUES, R. B. *et al.* An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Fruits**, Cambridge,56 (5), p.345-54. 2001.
- ROCHA JÚNIOR, J. M.; BAIÃO, N. C. Características físicas do sêmen de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 683-685, 2001.
- RONDON, R. M. M. *et al.* Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluidor de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). **Rev Bras Saúde Prod Anim**, v.9, p.848-854, 2008.
- ROSENSTRAUCH, A., EGEN, A.A., FRIEDLÄNDER, M. Spermatozoa retention by Sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. **Biol. Reprod.**, v.50, p.129-136, 1994.

ROSTAGNO, H. S. *et al.* **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4a Ed, 2017.

RUFINO, M. S. M. *et al.* **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 8 nontraditional tropical fruits from Brasil**. Food chemistry. 2010.

SALGUEIRO, C.C.M. *et al.* Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) ou TRIS, resfriado e mantido a 4°C por 24 horas. In: **Congresso brasileiro de reprodução animal**, 17. Curitiba. Anais ... Curitiba. p.149. 2007.

SEXTON, K.J., RENDEN, J.A., MARPLE, D.N. *et al.* Effect of dietary energy on semen production, fertility, plasma testosterone, and carcass composition of broiler breeder males in cages. **Poult. Sci.**, v.68, p.1688-1694, 1989.

SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; FONSECA, F. A. Transporte e inseminação artificial com sêmen resfriado equino. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 11, p. 3- 112, 1994.

SILVA, M. A.; SOBRAL, P. J. A.; KIECKBUSCH, T. G. State diagrams of freeze-dried camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh) pulp with and without maltodextrin. **J Food Eng.** p. 77, 2006.

SOARES, J. M. ; BELETTI, M. E. . Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, p. 543-553, 2006.

SURAI, P.F.; SPEAKE B.K.; SPARKS, N.H.C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. **The Journal of Poultry Science**, v. 38, n. 2, p. 117-145, 2001.

SURAI, P. F.; WISHART, G. J. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. **World's Poultry Science Journal**, v. 52, n. 1, p. 27-43, 1996.

Van WAMBEKE, F. The effect of tonicity of storage media for fowl semen on the occurrence of neck-bending spermatozoa, fertility and hatchability. **Br. Poult. Sci.**, 18(2):163-168. 1977.

WHEELER, N. C., ANDREWS, F. N. The influence of season on the semen production in the domestic fowl. **Poultry Science**, Texas, v. 22, n. 5, p. 361-367, 1943] WHITTOW, G. C. **Sturkie's avian physiology**. 5.ed. San Diego, CA: Academic Press, 2000.

ZAPATA, S.M., DUFOUR, J. P. Camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh) chemical composition of fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 61, 349–351.1993.