

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

Farelo de glúten de milho: alternativa na alimentação de galos

Sérgio Leandro Costa de Ávila

Pelotas, 2016.

Sérgio Leandro Costa de Ávila

Farelo de glúten de milho: alternativa na alimentação de galos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração: Produção Animal - Reprodução de Aves

Orientadora: Denise Calisto Bongalhardo, Prof^a. DSc.

Co-orientador: Marcos Antonio Anciuti, Prof. DSc.

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111f Ávila, Sérgio Leandro Costa de

Farelo de glúten de milho: alternativa na alimentação de galos / Sérgio Leandro Costa de Ávila ; Denise Calisto Bongalhardo, orientadora ; Marcos Antonio Anciuti, coorientador. — Pelotas, 2016.

26 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Alimentos alternativos. 2. Características seminais. 3. Galos. I. Bongalhardo, Denise Calisto, orient. II. Anciuti, Marcos Antonio, coorient. III. Título.

CDD : 636.5

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca examinadora:

Carine Dahl Corcini, Prof^a. DSc.

Fernanda Medeiros Gonçalves, Prof^a. DSc.

Paulo Roberto Dallmann, Prof. DSc.

Agradecimentos

A minha família, em especial a minha esposa, Clara, e aos meus filhos, Henrique e Joaquim.

A minha orientadora, professora Denise Bongalhardo, por ter aceitado me orientar;

Ao meu co-orientador professor Marcos Anciuti, pelo apoio e incentivo a realização do curso;

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de estudo e crescimento;

A Verônica e a Cristiéle por me incentivarem a participar do programa de pós-graduação.

À toda equipe de trabalho, que contribuíram desde o manejo dos animais até as atividades de laboratório. Alex, Silvinha, Sara, Stela, Carol, Matheus, Mariana, Elvis, Tiago e Amauri.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia em especial ao seu “Juca” e ao André;

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

Obrigado.

Resumo

ÁVILA, Sérgio Leandro de Ávila. **Farelo de Glúten de Milho: alternativa na alimentação de galos.** 2016. 30p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A utilização de alimentos alternativos ao milho e soja em dietas de aves domésticas como por exemplo, subprodutos da agroindústria, possibilita a redução dos custos de produção, o farelo de glúten de milho (FGM-21) é um subproduto do processamento do milho, para obtenção do óleo e amido. Com o objetivo de verificar a possibilidade da utilização deste ingrediente na alimentação de galos e seus efeitos nas características seminais dos animais foram utilizados 40 galos semi-pesados, Embrapa 051, com idade inicial de 64 semanas distribuídos totalmente ao acaso em 40 boxes. Os tratamentos consistiram no controle, com ração de milho e farelo de soja, e no teste com adição de 10% do farelo de glúten de milho na dieta. O peso corporal e a coleta de amostra de sêmen foram realizadas semanalmente durante cinco semanas, para avaliação de volume, motilidade e concentração espermática, integridade de membrana, acrossoma e DNA, peso corporal. Os resultados obtidos indicaram que não houve diferenças significativa entre os tratamentos, possibilitando a adição de 10% de farelo de glúten de milho na alimentação de galos.

Palavras-chave: alimentos alternativos; características seminais; galos

Abstract

AVILA, Sergio Leandro Avila. **Bran Corn Gluten: alternative in feeding rooster**. 2016. 30p. Dissertation - Graduate Program in Animal Science. Federal University of Pelotas, Pelotas.

There are many options to decrease the huge costs of production. Using alternative aliments, in order to substitute soybean bran and corn bran, which in their majority are by-products of agribusiness, is one of them. Corn Gluten Meal (FGM-21) is a by-product of corn processing, used to obtain oil and starch. In order to check the possibility of using corn gluten meal in the feeding of roosters and their effects on semen characteristics of those animals, 40 semi-heavy roosters were used, with initial age of 68 weeks, distributed at random in 40 boxes. Two treatments were used: T1 (Control) - corn and soybean bran meal and T2 - with addition of 10% corn gluten meal. For the analysis, it was made a collection per week, during 5 consecutive weeks. The following variables were evaluated: volume, motility and sperm concentration, membrane integrity, acrosome and DNA, besides body weight and feed intake. The results showed that there are no significant differences between the two treatments for the variables evaluated, allowing the addition of 10% corn gluten meal in feeding roosters.

Keywords: alternative food; seminal characteristics; roosters.

Lista de Figuras

Figura 1	Fluxograma do processo para obtenção de subprodutos do milho.....	8
Figura 2	Setor de aves Biotério Central.....	10
Figura 3	Temperaturas registradas durante o período das coletas.....	11

Lista de Tabelas

Tabela 1	Níveis de garantia para a composição do FGM-21.....	8
Tabela 2	Composição percentual das dietas experimentais.....	13
Tabela 3	Resultados da análise da composição bromatológica dos tratamentos.....	14
Tabela 4	Peso corporal (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas.....	16
Tabela 5	Volume seminal (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas.....	17
Tabela 6	Concentração espermática (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas....	18
Tabela 7	Motilidade espermática (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas....	18
Tabela 8	Integridade de membrana (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas....	19
Tabela 9	Integridade de acrossoma (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas....	20
Tabela 10	Integridade de DNA (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas....	20

Sumário

1 Introdução.....	6
2 Material e Métodos.....	10
2.1 Local.....	10
2.2 Período Experimental.....	10
2.3 Animais e Instalações.....	11
2.4 Programa de Luz.....	11
2.5 Delineamento Experimental.....	12
2.6 Análise Estatística	12
2.7 Dietas Experimentais e Manejo Alimentar	12
2.8 Análise Bromatologica das Dietas.....	13
2.9 Avaliação da qualidade seminal <i>in vitro</i>	14
3 Resultados e Discussão.....	16
3.1 Peso	16
3.2 Volume seminal.....	16
3.3 Concentração espermática.....	17
3.4 Motilidade espermática.....	18
3.5 Integridade de membrana.....	19
3.6 Integridade de Acrossoma.....	19
3.7 Integridade de DNA.....	20
4 Considerações finais	21
5 Conclusão.....	21
5 Referências.....	22

1. Introdução

Conforme dados fornecidos pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016) o número total de aves alojadas (poedeiras, matrizes e frangos de corte) vem crescendo nos últimos anos e com isto cada vez aumenta mais a demanda de matéria prima para a fabricação de ração para suprir as necessidades dessas aves.

Com o aumento da produção do biodiesel e etanol, que podem ser produzidos a partir da soja e do milho respectivamente e além do uso na alimentação humana, diminui a disponibilidade desses grãos para as rações. O setor avícola vem buscando a utilização de produtos alternativos na alimentação animal, em substituição desses dois ingredientes. Estes fatos fazem com que eleve seus preços no mercado aliado ao período da entressafra e de clima desfavorável, e por consequência o custo de produção (FILARDI, et al., 2007).

O milho, principal fonte energética, e o farelo de soja, principal fonte proteica, são os principais responsáveis pelo alto custo das rações (SUCUPIRA et al., 2007), que pode atingir 75% do custo total produção (FREITAS et al., 2005). Para Casartelli et al., (2005) esta situação faz com que empresas, nutricionistas e pesquisadores procurem alimentos alternativos com o propósito da substituição parcial ou total destas matérias primas otimizando a utilização dos nutrientes da ração. No entanto a utilização de alimentos alternativos ou subprodutos da indústria em rações deve ser eficiente tanto na parte produtiva quanto na parte econômica e devem proporcionar desempenhos semelhantes aos fornecidos pelos alimentos que estão substituindo sem alteração negativa no desempenho dos animais (SOARES, 2007).

A crescente preocupação com o aspecto ambiental, disponibilidade e grandes variações nos preços de produtos agrícolas tradicionais (milho, soja, trigo) tem aumentado também o interesse na utilização de subprodutos agroindústrias na fabricação de rações (PEDROSO; CARVALHO, 2004). De a

acordo com Brum Júnior (2009), existem várias alternativas para a redução de custos, tais como: a utilização de enzimas; formulação de dietas baseada no conceito de proteína ideal; manejo dos animais; formulação de ração conforme idade e categoria animal e o uso de alimentos alternativos. Dentre os vários alimentos alternativos podemos utilizar o Farelo de Glúten de Milho (21%)*.

O milho é o cereal mais produzido no mundo e no Brasil devido à grande possibilidade de aplicações. Macedo et al., (2003), afirma que para cada 100 kg de milho em grãos são produzidos 4,5 kg de FGM. O farelo de glúten de milho é um subproduto do grão de milho usado na nutrição animal, sendo este composto da parte fibrosa do grão (parte externa), de parte do gérmen (após a extração do óleo) e de parte do glúten, juntamente com reduzidas quantidades de amido e frações protéicas solúveis, restantes do processamento por via úmida do milho, (Fig. 1). O FGM apresenta um bom valor proteico, possui cerca de 21% de PB e 1813 Kcal/ Kg de energia metabolizável (ROSTAGNO et al., 2011), mas um teor elevado de fibra bruta, cerca de 7,62%, o que acaba limitando seu uso na alimentação de aves (Tab.1). Estes valores tornam o FGM-21 uma boa alternativa na alimentação dos animais desde que não seja utilizado como a principal fonte proteica da ração dos monogástricos. Em pesquisa utilizando o FGM-21 na substituição parcial de milho e farelo de soja, Freitas et al., (2006) conclui que é possível utilizar até 15% de FGM-21 sem que haja diminuição do desempenho de frangos de corte.

Já o desempenho reprodutivo de fêmeas e machos é determinado pelo potencial genético, transmitido pelos pais e por fatores ambientais que afetam significativamente a capacidade das aves em atingir seu máximo potencial reprodutivo, Rutz et al., 2007.

Vários são os fatores que afetam a fertilidade dos animais, dentre eles podemos citar a nutrição que pode afetar a aspectos fisiológicos do animal e seu desempenho reprodutivo (MAGGIONI et al., 2008) e por consequência acabam interferindo positivamente ou negativamente no retorno econômico de um matrizeiro tendo em vista que o produto final é o pinto produzido por ave.

* Nome comercial REFINAZIL ou PROMILL

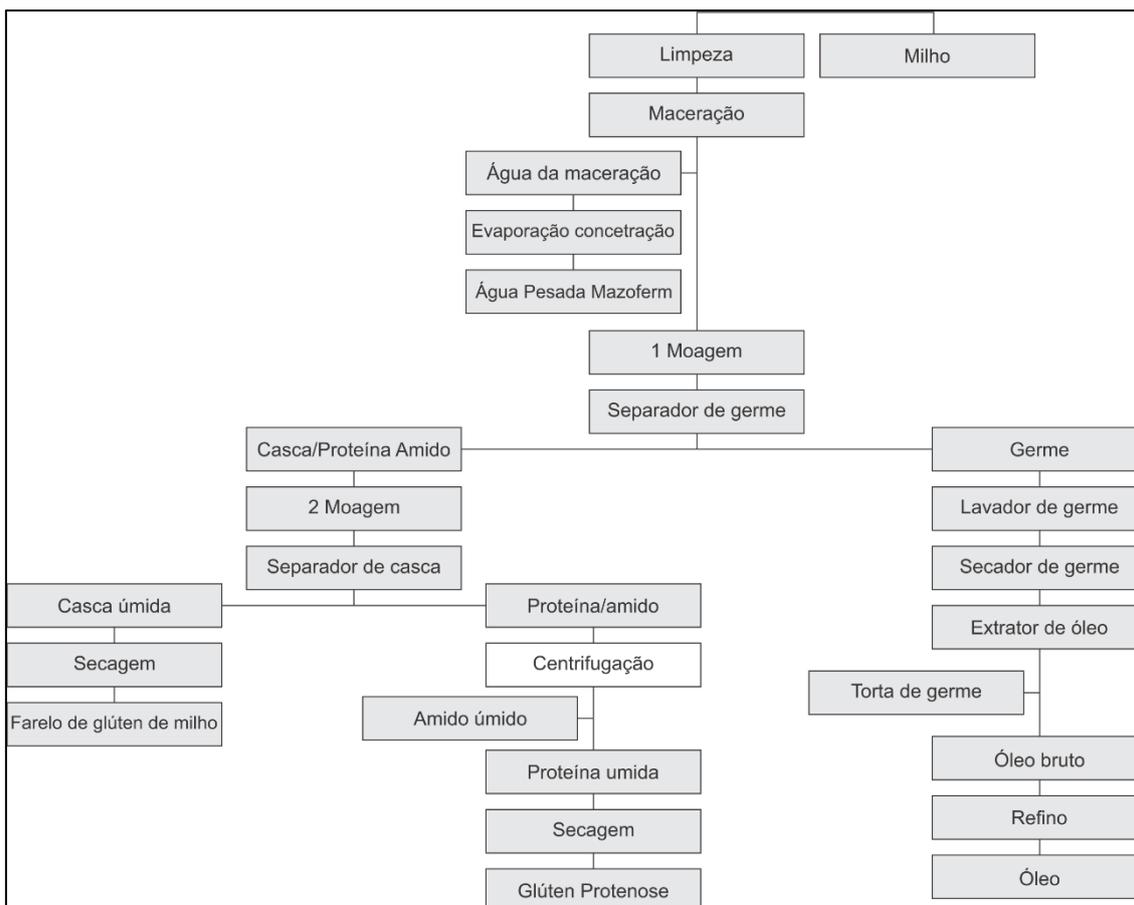


Figura 1. Fluxograma do processo para obtenção de subprodutos do milho (SANTOS 2004).

Tabela 1: Níveis de Garantia para a composição do FGM-21

Níveis de Garantia (% da matéria original)	Mínimo	Máximo
Umidade	-	12
Proteína	21	-
Extrato Etéreo	1	-
Matéria Mineral	-	8
Matéria Fibrosa	-	10

Fonte: *Corn Products Brasil*

Este retorno econômico pode ser através de uma maior quantidade e qualidade de pintos produzidos, práticas de manejos, uso de biotecnologia e também por uma diminuição no custo total da ração, utilizando-se de alimentos que possam substituir os tradicionais alimentos.

A seleção de reprodutores pelo setor avícola geralmente ocorre por características físicas dos animais tais como peso corporal, aspecto e comprimentos das patas, tamanho e coloração de crista e barbela (WILSON et

al., 1979) quando na verdade está seleção deveria ser feita considerando também algumas características reprodutivas (volume do ejaculado, motilidade e concentração espermática) que com o auxílio de alguns equipamentos não muito sofisticados, possibilitariam uma melhor seleção de animais. Nesta prática, da seleção por características físicas, apesar da facilidade com que pode ser realizado, muitas vezes o animal selecionado ou descartado do plantel possui características reprodutivas melhores, mas cabe salientar que as características físicas nem sempre possuem uma correlação positiva com a fertilidade dos reprodutores, (RUTZ et al., 2007).

Celeghini et al. (2001) observou, na 20^a semana de idade, que as características seminais de galos com crista desenvolvidas apresentaram melhores resultados quando comparado com galos de crista menor. Considerando que alguns manuais de manejo recomendam utilizar num matrizeiro a proporção, entre fêmeas e machos, de 10:1, nota-se a maior participação do macho neste processo por isto torna-se cada vez mais importantes estudos que correlacionam a alimentação, desempenho reprodutivo, fertilidade.

Problemas de fertilidade podem ser ocasionado tanto pelo macho quanto pela fêmea, mas a alterações nesta variável geralmente é relacionada aos machos (KHAN 2011), o macho é responsável pela maior parte do desempenho reprodutivo do lote e um bom manejo alimentar poderá influenciar diretamente no número de pintinhos nascidos. Neste contexto, acredita-se que qualquer alteração na qualidade do sêmen pode gerar prejuízos, tanto na produtividade quanto na qualidade dos pintos produzidos, sendo necessário testar e avaliar os vários tipos de alimentos fornecidos para os galos.

Diante das informações expostas, este experimento teve por objetivos avaliar os efeitos da adição do FGM-21 na dieta de galos sobre as características do sêmen (volume ejaculado, motilidade e concentração espermática, integridade de membrana, integridade de acrossoma, integridade de DNA da célula espermática) e sobre o peso corporal das aves; avaliar a possibilidade do uso na alimentação e validar a sua utilização como alimento alternativo na ração de galos.

2. Material e Métodos

2.1 Local

As aves foram alojadas no Setor de Aves do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (Fig. 2) *campus* Capão do Leão. As análises laboratoriais do sêmen foram realizadas no Laboratório de Biotecnias da Reprodução de Aves (LABRA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da UFPel e no Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPEL), da Faculdade de Veterinária da UFPel. A análise bromatológica da ração fornecida às aves foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal (LNA), do Departamento de Zootecnia.



Figura 2. Setor de Aves Biotério Central

2.2 Período Experimental

A suplementação do FGM iniciou em dezembro de 2015, e as coletas de sêmen ocorreram após um período de 30 dias sendo realizadas cinco coletas para as análises.

2.3 Animais e Instalações

Foram utilizados 40 galos, da linhagem Embrapa 051, semi-pesados, com 68 semanas de idade inicial e peso médio inicial de 2,826 Kg. As aves foram alojadas em boxes individuais, totalizando 40 unidades experimentais. Os boxes com dimensões de 75 x 75 x 75 cm (comprimento x largura x altura), totalizando 5625 cm², eram equipados com bebedouros tipo *nipple* e comedouros tipo calha. Todos os galos foram submetidos a uma *toilette*, sendo retiradas as penas da região pericloacal, com o objetivo de facilitar a visualização da cloaca no momento da coleta de sêmen e evitar a contaminação do sêmen coletado com fezes. Também foi realizado um treinamento para adaptação a rotina da coleta de sêmen, pelo método de massagem dorso-abdominal sugerida por Burrows e Quinn (1937) duas vezes na semana e coletadas em tubos Tipo Falcon. Durante o período experimental foram feitas duas coletas semanais, em dias seguidos, a primeira coleta servia para esgotar os animais e a sêmen da segunda coleta para análise de dados. A temperatura ambiente foi registrada diariamente (Fig. 3) como auxílio de um termômetro.

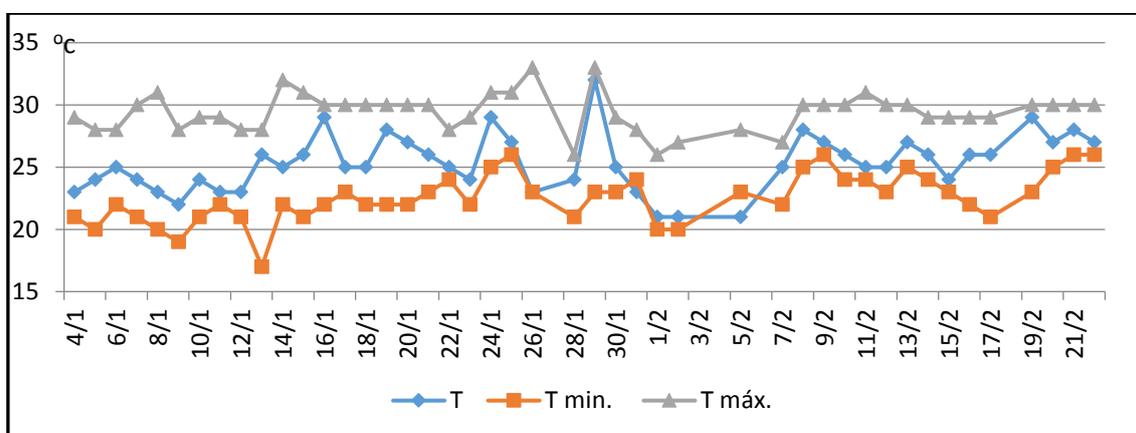


Figura 3. Temperaturas registradas durante o período de coletas.

2.4 Programa de Luz

A luminosidade fornecida foi artificial com o auxílio de lâmpadas fluorescentes distribuídas no galpão e com acendimento controlado por um relógio automático. Foram fornecidas 16 horas diárias com intensidade luminosa de 60 lux, monitoradas com o auxílio de um luxímetro digital.

2.5 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em 40 boxes, com 20 animais por tratamento sendo que cada galo representa uma unidade experimental em um delineamento experimental totalmente ao acaso. Os tratamentos consistiram em duas dietas experimentais: T1 = ração balanceada sem farelo de glúten de milho FGM-21 e T2 = ração balanceada com a adição de 10% de FGM-21.

2.6 Análise Estatística

Os tratamentos foram comparados dentro de cada idade por ANOVA de uma via, sendo que dados que não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk foram analisados usando teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Comparações entre médias foram feitas pelo teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. Para fins de interpretação, todos os dados são apresentados em sua escala original.

Para as variáveis estudadas o modelo matemático estatístico utilizado foi: $Y_{ij} = m + a_{ij} + e_{ij}$, onde Y_{ij} = a observação do i -ésimo tratamento ($i = 1, 2$) na j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3, \dots, 20$); m = representa a média geral do experimento, a_{ij} = representa o efeito do i -ésimo tratamento na j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3, \dots, 20$); e_{ij} = representa o erro aleatório alocado correspondendo a observação média no i -ésimo tratamento na j -ésima repetição.

2.7 Dietas Experimentais e Manejo Alimentar

As dietas experimentais foram formuladas para atender as exigências nutricionais dos galos, segundo recomendações de Rostagno et al. (2011), através do uso do programa de formulação de rações Super Crac®, com suas composições percentuais demonstradas na Tab. 2. As dietas foram à base de milho e farelo de soja suplementadas com vitaminas e minerais, sendo isoproteicas e isoenergéticas. O fornecimento de água e ração foi individual, sendo que água foi fornecida *ad libitum* e a ração controlada em 160 g por animal ao dia, sempre fornecida pela manhã. Durante o período das coletas de sêmen

os galos e as sobras de rações foram pesados para verificar o ganho e/ou perda de peso.

Tabela 2: Composição percentual das dietas experimentais.

Ingredientes %	Controle	FGM-21
Milho	59,87	50,26
Farelo de Soja	23,60	20,91
Farelo de Glúten de Milho	0,00	10,00
Calcário	9,27	9,27
Fosfato bicálcico	1,50	1,44
Premix mineral e vitamínico ¹	4,00	4,00
Óleo de soja	1,13	3,50
Sal	0,50	0,50
Metionina	0,13	0,13
Total	100,00	100,00
Níveis Nutricionais Calculados		
Energia Bruta Kcal/Kg	2700	2700
Proteína Bruta (%)	15,88	15,95
Fibra Bruta (%)	2,42	2,87
Cálcio (%)	3,94	3,93
Fósforo disponível	0,37	0,36
Met +cist, (%)	0,65	0,66
Lisina total (%)	0,81	0,75
Ácido linoleico (%)	2,78	3,86

¹Níveis de garantia por quilograma do produto: Vitamina A 2.500.000 UI, Vitamina D3 500.000 UI, Vitamina 1.750mg, Vitamina K3 375 mg, Vitamina B1 400mg, Vitamina B2 1.100mg, Vitamina B6 750mg, Vitamina B12 3.000mcg, Niacina 6.500mg, Ácido Fólico 175mg, Ácido pantotênico 2.500mg, Metionina 300g, Colina 90g, Manganês 17.500mg, Zinco 12.500 mg, Ferro 15.000mg, Cobre 2.500mg, Iodo 90mg, Selênio 76mg; Met+cist= metionina+cistina

2.8 Análise Bromatológica das Dietas

As amostras dos dois tratamentos foram colocadas para secar durante 16 horas em estufa a 105°C para a determinação da matéria seca. Para a determinação da matéria mineral a secagem foi na mufla a 550°C, durante cinco horas. Através do método de micro-Kjedahl determinou-se o nitrogênio, utilizando o fator 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína bruta. Para o extrato etéreo utilizou-se o extrator Soxhlet com éter de petróleo, segundo a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C. 2000).

Tabela 3: Resultados da análise da composição bromatológica dos tratamentos

Níveis Nutricionais	Controle	FGM-21
Proteína Bruta (%)	17,65	16,68
Fibra Bruta (%)	3,08	4,26
Extrato Etéreo (%)	3,55	3,97
Matéria Seca (%)	89,14	88,90
Cinzas (%)	14,00	14,62

2.9 Avaliação da qualidade seminal *in vitro*

Os parâmetros seminais avaliados foram - volume do ejaculado, concentração e motilidade espermática, integridade de membrana, DNA e acrossoma da célula espermática. As amostras de sêmen foram coletadas em intervalos de sete dias onde o volume produzido foi verificado diretamente do tubo coletor, com graduação de 0,1ml.

A concentração espermática foi realizada por de espectrofotometria de transmitância, através de um espectrofotômetro previamente calibrado, diluindo-se 3 µL de sêmen em 3 ml de citrato de sódio a 2,9% com 0,4% de glutaraldeído. Os valores observados foram convertidos para bilhões de espermatozoides por mililitro.

Para a avaliação da motilidade espermática utilizou-se 5µL de sêmen homogeneizado, diluído com 5µL com cloreto de sódio (NaCl) à 0,9%, sobre uma lâmina de vidro e com o auxílio de microscópio ótico e objetivas de 40x de aumento. A avaliação da motilidade espermática é subjetiva e é expressa em %, atribuindo valores em uma escala de 0 – 100%, onde 0% todos imóveis e 100% todos móveis. Esta avaliação é sempre feita em duplicata e o valor final é a média aritmética das duas observações, sendo que neste trabalho esta avaliação sempre foi realizada pelo mesmo técnico (BAKST e LONG, 2010).

A integridade de membrana foi avaliada através do corante SYBR-14 + PI (Live/Dead Sperm Viability), corante marcador de ácido nucleico que permeia qualquer membrana e cora o DNA das células íntegras, enquanto que o iodeto de propídio (PI) irá corar somente as células com lesão de membrana (CHALAH; BRILLARD, 1998). Antes de cada avaliação as amostras foram ajustadas, adicionando 5µl de sêmen puro de cada galo em tubos plásticos contendo 500µl de diluente BPSE, previamente identificados. Imediatamente, adicionou-se o 3µL SYBR-14 e 1µL PI, nestas amostras. A mistura foi incubada no escuro, à

temperatura ambiente, por no mínimo 15 e no máximo 180 minutos, após este tempo são contados 100 espermatozoides. Esta avaliação foi realizada em microscópio de epifluorescência com aumento de 400x. As células que apresentaram fluorescência verde (corados com SYBR-14) foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha ou verde/vermelha (corados com PI) foram consideradas lesadas.

Para a Integridade de acrossoma espermático foi verificada segundo o protocolo de Kawamoto et al., 1999, 20µL do ejaculado foram centrifugadas a 300 G por 10min, sendo o sobrenadante retirado e desprezado. A partir dessas amostras foram confeccionados esfregaços em lâminas onde depois de secas, foram submersas em álcool etílico absoluto, por 5 minutos, para que houvesse a fixação das células na lâmina, posteriormente eram lavadas em PBS. Em uma sala escura, foi adicionado às amostras, 20µL de *Lectin from arachishypogaea FITC Conjugate* (20 mg/mL), que permaneceu por 10 minutos sobre as lâminas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e drenadas. As lâminas foram avaliadas sob um aumento de 1000x em microscópio de epifluorescência. As células com acrossoma que não apresentavam rugosidades, vacúolos e emitiam fluorescência verde foram consideradas íntegras. As células distintas desses padrões, foram classificadas como células com acrossoma danificado.

A integridade de DNA espermático foi avaliado pela técnica descrita por Evenson et al. (1999). Em uma alíquota de 2µL de sêmen foi adicionado 10µL de TNE, após 30 segundos adicionou-se 100µL de Triton 1x e após 30 segundos, adicionou-se 50µL de Acridine Orange (2 mg/mL em H₂O deionizada). Após cinco minutos de incubação, o material foi avaliado em microscópio de epifluorescência sob aumento de 1000x. Foram consideradas células com DNA normal (bicatenário) aquelas que apresentavam fluorescência verde e quando a célula apresentava coloração vermelha ou amarelada foi considerado DNA desnaturado (monocatenário). As lâminas foram avaliadas sob um aumento de 400x em microscópio de epifluorescência.

3. Resultados e Discussão

3.1 Peso

O peso médio dos galos no final do período, do controle foi de 2,890 kg, com variação entre 2,500 Kg e 3,410 Kg enquanto que no tratamento 2 foi de 2,870 Kg com variação entre 2,470 Kg e 3,240 Kg conforme dados apresentados na Tab.4, apesar do tratamento 2 possuir um maior teor de fibras, 4,26% conforme análise bromatológica (Tab. 3), os animais não perderam peso. Freitas et al., (2006) trabalhando com níveis crescentes (0, 5, 10 e 15%) de inclusão de refinazil também não observou nenhuma diferença significativa no peso vivo médio e no ganho de peso em frangos de corte.

Tabela 4. Peso corporal (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas

Trat	Peso (Kg)				
	Semanas				
	68	69	70	71	72
Controle	2,83 \pm 0,04	2,85 \pm 0,04	2,88 \pm 0,03	3,00 \pm 0,05	2,97 \pm 0,05
FGM-21	2,82 \pm 0,05	2,84 \pm 0,05	2,85 \pm 0,04	2,96 \pm 0,05	2,94 \pm 0,05
Valor de P*	0,9631	0,9050	0,6117	0,5417	0,7331

*não houve diferença significativa pelo teste de Tukey para $p > 0,05$

3.2 Volume seminal

O volume seminal médio produzido pelos galos do controle, foi 0,39 ml, com variação entre 0,1 e 1,0 ml, enquanto que no tratamento 2 foi de 0,47 ml, com variação entre 0,1 e 1,0 ml, mas não houve diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$), entre as médias dos dois tratamentos, conforme valores demonstrados na Tab. 5. O volume seminal varia de linhagem para linhagem e também com o tamanho dos galos, animais maiores tendem a produzir mais, mas os valores estão dentro dos padrões para galos semi-pesados, (ETCHES, 1994; SURAI & WISHART, 1996). Etches, 1996, relata que o volume não afeta a qualidade do sêmen produzido, e que galos de linhagem pesadas possuem testículos maiores e produzem mais sêmen quando comparados aos galos linhagem mais leve, mas dificulta sua utilização no processo da inseminação artificial. Pedrosa, 2006 avaliando a inclusão do farelo de glúten de milho em três níveis (0, 10 e 20% da matéria seca total) na alimentação de 30 vacas leiteiras

em confinamento não observou diferença significativa na produção de leite e composição do leite.

Após 40 semanas de idade, ocorre um declínio da fertilidade como consequência da diminuição da produção espermática do galo reprodutor, considerando-se normal uma queda do volume e concentração com o avanço da idade (Rutz et al., 2007).

Tabela 5. Volume seminal (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas

Trat	Volume (mL)				
	Semanas				
	68	69	70	71	72
Controle	0,33 \pm 0,06	0,24 \pm 0,05	0,38 \pm 0,06	0,48 \pm 0,05	0,43 \pm 0,05
FGM-21	0,35 \pm 0,07	0,38 \pm 0,05	0,38 \pm 0,07	0,56 \pm 0,08	0,58 \pm 0,06
Valor de P*	0,8841	0,0812	0,7395	0,5919	0,0661

*não houve diferença significativa pelo teste de Tukey para $p>0,05$

3.3 Concentração espermática

A concentração espermática média do sêmen coletado do controle, foi $2,37 \times 10^9$ de espermatozoides, com variação entre 0,61 e $5,52 \times 10^9$ espermatozoides, enquanto que no tratamento 2 foi de $2,70 \times 10^9$ espermatozoides, com variação entre 0,65 e $6,72 \times 10^9$ espermatozoides, mas não houve diferenças estatísticas significativas ($P>0,05$) entre as médias dos dois tratamentos, conforme valores demonstrado na Tab. 6. Esta condição se deve ao fato que a concentração está relacionada ao volume seminal, em pesquisas feitas com galos da linhagem Ross, Surai et al., (2000), observou que o volume seminal e concentração possuem relação direta, Andreazzi et al. (1997) também não observou diferenças significativas na concentração espermática quando trabalhou com níveis semelhantes de metionina na composição da ração de galos. Na prática da inseminação artificial volume seminal e a concentração espermática são importantes pois determinam o número de doses que poderão serem feitas (BASKT & LONG, 2010).

Tabela 6. Concentração espermática (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas

Trat	Concentração espermática ($\times 10^9$)				
	Semanas				
	68	69	70	71	72
Controle	1,55 \pm 0,18	1,43 \pm 0,42	2,41 \pm 0,22	2,98 \pm 0,27	2,70 \pm 0,41
FGM-21	1,35 \pm 0,19	2,17 \pm 0,22	2,53 \pm 0,32	3,73 \pm 0,45	3,08 \pm 0,22
Valor de P*	0,3507	0,1118	0,8404	0,1575	0,1567

*não houve diferença significativa pelo teste de Tukey para $p > 0,05$

3.4 Motilidade espermática

A motilidade espermática média observada para o controle foi de 71,2%, com variação entre 30% e 100%, enquanto que no tratamento 2 foi de 69,5% com variação entre 15% e 100% e não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$). Os valores encontrados (Tab.7) estão pouco abaixo do que preconiza, Bakst e Long, (2010) que indicam valores acima dos 80% para uma boa motilidade. Estes valores abaixo do esperado podem ser explicados pelas altas temperaturas no período, com temperaturas médias em torno dos 26°C, com variações entre 17°C e 33°C causando estresse calórico. Tonini, 2016 trabalhando com os mesmos galos mas com idades diferentes, entre 41 e 46 semanas, também observou que a motilidade não foi superior aos 80%. Acredita-se que estes baixos valores observados na motilidade possam ter sido influenciados pelas altas temperaturas no período do experimento, Martins et al., 2011 trabalhando com sêmen de suínos relatou que houve diferenças significativas na motilidade espermática quando os animais foram submetidos ao estresse calórico.

Tabela 7. Motilidade espermática (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas

Trat	Motilidade espermática (células móveis %)				
	Semanas				
	68	69	70	71	72
Controle	61,0 \pm 7,3	47,9 \pm 8,5	76,7 \pm 3,2	80,5 \pm 3,4	72,9 \pm 4,0
FGM-21	59,2 \pm 9,8	54,5 \pm 4,6	82,9 \pm 3,3	72,9 \pm 6,5	69,4 \pm 3,0
Valor de P*	0,9810	0,4630	0,1070	0,9667	0,8145

*não houve diferença significativa pelo teste de Tukey para $p > 0,05$

3.5 Integridade de membrana espermática

A integridade de membrana espermática média dos resultados observados para o controle foi de 84,3%, com variação entre 65% e 98%, enquanto que no tratamento 2 foi de 86,1%, com variação entre 70% e 90% conforme Tab.8. Observa-se uma média superior no tratamento 2, sendo que na 70ª semana houve uma diferença significativa, esta diferença pressupõe-se que possa ser em virtude de uma maior quantidade de ácido linoleico na composição da dieta, 3,86%. Segundo Surai et al, (2003) adição de nutrientes com propriedades antioxidantes ajudam o sistema de defesa no controle dos danos causados pelos radicais livres nas células. Bongalhardo (2009), em experimento com galos leves observou que modificações nas dietas fornecidas alteraram o perfil lipídico do sêmen.

Tabela 8. Integridade de membrana (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas

Trat	Integridade de membrana (% de células com membranas íntegras)			
	Semanas			
	69	70	71	72
Controle	76,4 \pm 3,8	78,8 \pm 1,7	85,0 \pm 1,1	91,5 \pm 1,2
FGM-21	83,6 \pm 2,3	85,5 \pm 1,3	84,2 \pm 1,2	90,5 \pm 1,7
Valor de P*	0,1032	0,0032	0,5987	0,8397

*não houve diferença significativa pelo teste de Tukey para $p > 0,05$

3.6 Integridade de acrossoma

A integridade de acrossoma média dos resultados observados para o controle foi de 84,7%, com variação entre 65% e 97%, enquanto que no tratamento 2 foi de 85,1%, com variação 68% e 93% não sendo estatisticamente significativas estas diferenças ($P > 0,05$). Nos resultados apresentados na Tab.9 demonstram a mesma expressão durante as quatro semanas estudadas. Partyka et al., 2010, observou uma média de 93,1% para este parâmetro quando trabalhou com galos e comparou sêmen fresco e congelado.

O início da reação físico-químico do processo de fertilização é inicializado pelo acrossoma o que torna importante a sua integridade (BARTH & OKO, 1989), sendo assim quando a quantificação de acrossomas intactos e capazes de

realizar esta reação reflete uma propriedade importante a ser analisada, Correa et al. (1989) analisando sêmen bovino relatou uma correlação positiva entre a fertilidade e integridade dos acrossomas.

Tabela 9. Integridade de acrosoma (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas

Trat	Integridade de acrosoma (% de células com acrossomas íntegros)			
	Semanas			
	69	70	71	72
Controle	88,3 \pm 3,1	81,1 \pm 1,8	86,9 \pm 1,0	84,5 \pm 1,5
FGM-21	87,8 \pm 1,5	83,2 \pm 1,3	87,1 \pm 1,3	83,1 \pm 1,7
Valor de P*	0,8562	0,3525	0,6580	0,5337

*não houve diferença significativa pelo teste de Tukey para $p > 0,05$

3.7 Integridade de DNA

Foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos apenas na primeira semana do período experimental, onde a adição do FGM-21 promoveu maior proteção ao DNA acrossomal (Tab.10), houve uma diferença estatisticamente significativa ($P=0,0229$), mas os dois valores são próximos de 100%, indicando um sêmen de excelente qualidade com referência a esta característica. Valores semelhantes aos de Partyka et al., 2010, quando avaliou sêmen de galos por citometria de fluxo.

Para Shibahara (2003) a integridade de DNA de espermatozoides é de grande importância uma vez que o DNA é o responsável por toda carga genética paterna transmitida aos seus descendentes.

Tabela 10. Integridade de DNA (média \pm erro padrão) de galos alimentados com e sem farelo de glúten de milho nas dietas

Trat	Integridade de DNA (% de DNA bicatênario)			
	Semanas			
	69	70	71	72
Controle	99,1 \pm 0,4	97,7 \pm 1,1	99,5 \pm 0,3	99,0 \pm 0,7
FGM-21	99,9 \pm 0,1	98,6 \pm 0,6	98,3 \pm 0,8	99,2 \pm 0,3
Valor de P*	0,0229	0,7600	0,0824	0,3564

*não houve diferença significativa pelo teste de Tukey para $p > 0,05$

4. Considerações finais

Todas as avaliações realizadas servem como indicadores de uma eficiência reprodutiva dos machos, pois uma análise conclusiva sobre a fertilidade dos machos deverá ser realizada com trabalhos mais detalhados e específicos, incluindo variáveis e técnicas como o uso de membranas perivitelinas.

Considerando a escassa literatura sobre a utilização deste produto na alimentação de galos, assim como outros alimentos alternativos, sugere-se que sejam feitos novos trabalhos com outros níveis de inclusão de FGM-21. Os resultados desses trabalhos permitiriam a criação de um banco de informações sobre quais produtos utilizar na alimentação de galos sem haver prejuízo, tanto no desempenho reprodutivo quanto no aspecto econômico.

5. Conclusão

Baseado nos resultados obtidos, pode-se inferir que a inclusão de 10% de farelo de glúten de milho (FGM-21) na dieta dos galos não influenciou significativamente nas características seminais, podendo ser utilizado como uma alternativa na alimentação dos galos.

6. Referências

Agência Embrapa de Informação Tecnológica – Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso em março 2016.

ANDREAZZI, M.A; RIGOLON, L.P.; BARBOSA, M.J.B; MORAES, G.V. Influência da alimentação com canola em grão sobre a qualidade do sêmen de galos. *Arquivos de Ciência em Saúde Unipar*, v.1, n.1: 13-15, 1997.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Disponível em <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura>. Acesso em fevereiro de 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 13.ed. Arlington: AOAC International, 2000. 989p.

BAKST, M.R.; LONG, J.A. Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. 2nd ed. Buffalo, MN: **The Midwest Poultry Federation**, 2010.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989, 285p.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: Bearden, H.J.; Fuquay, J.W. (Ed.). **Applied Animal Reproduction**. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall. Cap. 15, 1997. p.159-170.

BONGALHARDO, D.C.; Desafios da Biologia da Reprodução. In: Macari, M.; Gonzales, E.; Patrício, I. N.; Nääs, I. A.; Martins, P. C. (Org.). **Manejo da Incubação**. 3 ed. Jaboticabal, SP: FACTA, 2013, v.1, p. 87-92.

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

BURROWS, W.H.; QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**. v.14, p 252-254, 1937.

BRUM JÚNIOR, Berilo de Souza. **Quirera de Arroz na Dieta de Francos de Corte**. 2009. 88f. Pelotas, Rio Grande do Sul, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, 2009.

CAMPOS, E.J.; O comportamento das aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** – versão on-line. v.2, n.2, may/ago. 2000. Acesso em janeiro 2016.

CASARTELLI, E.M., FILLARDI, R.S.; JUNQUEIRA, O.M.; LAURENTIZ, A.C.; ASSUENA, V.; DUARTE, K. F. Commercial laying hen diets formulated according to diferente recommendation of total na digestible amino acids. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.7, n.3, p.177-180. 2005.

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

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

CORN PRODUCTS DO BRASIL. Ingrediente proteico de milho REFINAZIL. São Paulo, 1996, p.4 (Boletim Técnico).

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed vis the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in na artificial insemination program. **Theriogenology**. v.48, p.721-731, 1997.

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

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

FILARDI, R. S.; JUNQUEIRA, O. M.; LAURENTIZ, A. C.; CASARTELLI, E, M.; ASSUENA, V.; PILEGGI, J.; DUARTE, K. F. Utilização do farelo de arroz em rações para poedeiras comerciais formuladas com base em aminoácidos totais e digestíveis. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 397-405, jul./set. 2007.

FREITAS, A.C.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R. et al. Efeito de níveis de proteína bruta e de energia metabolizável na dieta sobre o desempenho de codornas de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.838-846, 2005.

FREITAS, A.C.; REIS, J.C.; LANA, G.R.Q.; FUENTES, M.F.; SAMPAIO, I.B.M.; OLIVEIRA, M.A. Refinazil como ingrediente de rações para frango de corte. **Revista Científica de Produção Animal**. v.8 n.1, p.11-20, 2006.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y.,1999. **Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status**. Fertil. Steril.v.71, p.497 – 501.

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

MACARI, Marcos; GONZALES, Elisabeth. **Manejo da Incubação**. Campinas: 2003. 537p.

MACEDO, L.G.P.et al. Substituição do farelo de soja pela farinha de glúten de milho na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p.992-1001, 2003.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P. P.; MARQUES, J. A.; ZAWARDZKI, F.; PRADO, R. M.; PRADO, I.N. Influência da proteína sobre a reprodução anima: Uma revisão. **Campo Digital**. Campo Mourão, v.1, n.2, p. 105-110, jan/out. 2008.

MARTINS, P.C. et al. Efeito da temperatura ambiente sobre a viabilidade do sêmen de varrões. **PUBVET**, Londrina, V.5, n.20, Ed 167, Art. 1127, 2011.

PARTIKA, A.; NIZANSKI, W.; LUKASZEWICZ, E. Evaluation of fresh frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. **Theriogenology**, v.74, p.1019-1027, 2010.

PEDROSO, A. M.; **Substituição do milho em grãos por subprodutos da agroindústria na ração de vacas leiteiras em confinamento**. 2006. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PEDROSO, A. M.; CARVALHO, M. P. **Utilização de subprodutos na alimentação de ruminantes com eficiência técnica e econômica** – Curso online Agripoint 2004.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F. de; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3ª ed. Viçosa/MG: UFV, DZO, 252p. 2011.

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

SANTOS, F.A.; Glúten de milho na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, n.3, p79-100 nov/dez 2004.

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

SHIBAHARA, H.; ONAGAWA, T.; AYUSTAWATI, JORSARAEI, S.; HIRANO, Y.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; SUZUKI, M. Clinical significance of the Acridine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria. **International Journal of Andrology**. v.26(4), p.236–241, 2003.

SOARES, M.B.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R. et al. Farelo de amêndoa da castanha de caju na alimentação de codornas japonesas na fase de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p.1076-1082, 2007 (supl.).

SUCUPIRA, F.S.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R. et al. Alimentação de codornas de postura com rações contendo levedura de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.528-532, mar-abr, 2007.

SURAI, A.P.; SURAI, P.F.; STEINBERG, W.; WAKEMAN, W.G.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C.; Efect of canthaxanthin content of maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. **Poultry Science**, v.44, p.612-619, 2003.

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

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

TONINI, C.; **Óleo de copaíba sobre as características seminais de galos**. 2016. 63p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

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