

## Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozóides de capote (*Numida meleagris*)

*Powdered coconut water (ACP®) at different temperatures as extender of guinea fowl ("Numida meleagris") spermatozoa*

RONDON, Regina Maria Macedo<sup>1\*</sup>; RONDON, Fernanda Cristina Macedo<sup>2</sup>; NUNES, Jose Ferreira<sup>3</sup>; ALENCAR, Airton Araújo<sup>4</sup>; SOUSA, Francisco Militão de<sup>5</sup>; CARVALHO, Maria Audália Marques<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, Ciências Avícolas, Departamento de Produção Animal, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Ceará, Medicina Veterinária, Departamento de Ciências Veterinárias, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Institut National de La Recherche Agronomique, Medicina Veterinária, Departamento de Produção e Reprodução Animal, Nouzilly, Tours, França.

<sup>4</sup>Université de Tours, Medicina Veterinária, Departamento de Produção e Reprodução Animal, Tours, Indre et Loire, França.

<sup>5</sup>Université de Languedoc, Agronomie, Departament of Zootechnie, Montpellier, Midi, France.

<sup>6</sup>Universidade Federal do Ceará, Engenharia de Pesca, Departamento de Reprodução Animal, Fortaleza, CE, Brasil.

\*Endereço para correspondência: reginarondon@terra.com.br

### RESUMO

Avaliou-se a eficiência *in vitro* do diluidor água de coco em pó (ACP®) em sêmen recém-colhido e resfriado de capotes (*Numida meleagris*), a 4 ou 15°C, em comparação ao diluidor comercial (DC) de sêmen de aves. Registraram-se a concentração espermática, a motilidade, o vigor e as alterações morfológicas nos tempos 0 hora (T0), 2 horas (T2) e 24 horas (T24). A média dos *pools* foi de  $4,88 \pm 0,17 \times 10^9$  spz/mL e a concentração final das alíquotas colhidas, de  $600 \times 10^6$  spz/mL. A média/ejaculado do *pool* foi de  $11,4 \pm 0,95 \times 10^9$  spz/ejaculado. Os quatro tratamentos (4 e 15°C em ACP® ou DC) não ocasionaram diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros avaliados (motilidade, vigor e spz viáveis) no tempo zero (T0). Após 2 horas, apenas os espermatozóides diluídos com ACP® a 4°C mantiveram-se acima dos valores aceitáveis: motilidade 88%, vigor 8,9 e concentração de espermatozóides viáveis de  $10,01 \times 10^9$  spz/mL ( $P < 0,05$ ), fato observado também após 24 horas. Os resultados sugerem o uso do ACP® a 4°C na inseminação artificial em capotes (galinha-d'angola), pois este foi superior aos demais tratamentos *in vitro* em todos os tempos de conservação.

**Palavras-Chave:** galinha d'angola, inseminação artificial, sêmen

### SUMMARY

The *in vitro* efficiency of powdered coconut water (ACP®) as storage medium for fresh, cooled guinea fowl (*Numida meleagris*) sperm at 4 or 15°C compared to a commercially available medium (DC) of poultry semen was evaluated. Sperm concentration, percentage of motile spermatozoa, vigor, and morphology at baseline (T0), 2h (T2) and 24h (T24) were recorded. Average pool concentration was of  $4.88 \pm 0.17 \times 10^9$  spz/mL in the sperm and  $600 \times 10^6$  spz/mL in the final aliquots. The number of spermatozoa in the pool averaged  $11.4 \pm 0.95 \times 10^9$  spz/ejaculate. No treatment effect ( $P > 0.05$ ) on any parameter (motility, vigor and viable spermatozoa percentage) at baseline was detected between four groups (4 and 15°C in ACP® and DC). After two hours (T2), only the spermatozoa in ACP® at 4°C was always higher than the acceptable values: motility 88%, vigor 8.9 and viable spermatozoa concentration of  $10.01 \times 10^9$  spz/mL ( $P < 0.05$ ). This fact was also observed at 24h. These results suggest that ACP® at 4°C can be used in the artificial insemination in guinea fowl, because it was the best among *in vitro* treatments, in all storage times.

**Keywords:** artificial insemination, guinea fowl, sperm

## INTRODUÇÃO

O *Numida meleagris*, vulgarmente conhecido como capote ou galinha-d'angola, é uma ave de origem africana criada para diversos fins, principalmente alimentação (RURALNEWS, 2004). Pouco se conhece sobre a morfologia e fisiologia reprodutiva destas aves (PEREIRA et al., 1994), assim como suas características seminais, que podem oferecer subsídios para o desenvolvimento de biotecnologias de reprodução, como conservação espermática, inseminação artificial e melhoramento genético dessa espécie. As técnicas para preservação do sêmen têm como finalidade reduzir os danos causados durante o armazenamento por longos períodos ou no transporte por longas distâncias. Assim, técnicas de preservação do sêmen são importantes para manutenção de maior número de espermatozóides viáveis (SAUVEUR, 1988). A utilização de um diluidor rico em nutrientes, capaz de manter a isotonicidade do meio (isotonicidade e osmolaridade) e o pH sem comprometer a membrana dos espermatozóides é fundamental para o sucesso da inseminação artificial. O diluidor deve ter suas funções mantidas e/ou potencializadas com a adição de protetores de resfriamento e/ou crioprotetores (CARDOSO et al., 2000). Este estudo foi realizado para avaliar o comportamento dos espermatozóides recém-colhidos e resfriados em diferentes temperaturas (4°C e 15°C), em diluente à base de água de coco em pó (ACP®).

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período de 16 de maio a 7 de julho de 2005, quando foi realizada uma colheita de sêmen por semana, totalizando nove repetições. A cada semana, dos 196 machos, 20 (com aproximadamente 50 semanas de idade) eram escolhidos aleatoriamente para obtenção do *pool* de ejaculados. Os animais eram criados em gaiolas e alojados (2 a 3 machos/gaiola) em galpões com as laterais abertas. A temperatura dentro do galpão variava de 28°C a 32°C. Os animais possuíam livre acesso à água e ração.

A colheita do sêmen foi realizada conforme descrito por Burrow & Quinn (1937). Imediatamente, no local da colheita, foram avaliados os aspectos macroscópicos (volume, cor, aspecto) e microscópicos (concentração de espermatozóides e análise subjetiva da motilidade progressiva e do vigor) em microscopia de luz, com aumento de 100x.

O sêmen foi acondicionado em temperatura de 25°C pré-diluído em ACP® e DC (1:1) em tubos individuais com tampa. O *pool* de amostras pré-diluídas de cada tubo foi fracionado em oito alíquotas: quatro com ACP® e quatro com diluente comercial de ave DC. Todas as etapas de diluição foram realizadas em temperatura de 25°C, de modo que o sêmen permaneceu em “raspas de gelo” para manter a temperatura (SOUSA, 1998). As alíquotas foram colocadas primeiramente em béquer com água a 25°C, dentro de uma geladeira de modo a se obter diminuição lenta da temperatura e posteriormente foram armazenadas em temperaturas de 4° e 15°C nos tempos: zero (T0), 2 horas (T2) e 24 horas (T24). Ao atingir a temperatura de 15°C, quatro alíquotas (duas de ACP® e duas de DC) foram colocadas em garrafa térmica de boca larga, com quatro tubos de poliestireno ou polipropileno de 15 ou 50mL contendo 45mL de ácido acético, previamente congelados e trocados a cada 4 horas para manutenção da temperatura de 15°C no

interior da garrafa. As outras quatro alíquotas (duas de ACP® e duas do DC) foram mantidas na geladeira à 4°C.

Esfregaços do sêmen foram confeccionados em ambos os diluidores, adicionando-se 10 µL de sêmen de cada alíquota pré-diluída em lâminas esterilizadas juntamente com duas gotas de corante eosina e nigrosina (CHALAH et al., 1999). Foram avaliados 200 espermatozóides em cada lâmina, observando-se as alterações morfológicas em microscopia de luz com aumento de 400x. O número de espermatozóides com má formação foi encontrado dividindo-se o número de espermatozóides com anormalidades pelo número de espermatozóides totais e multiplicando-se o resultado por 100. Ressalta-se que os espermatozóides do sêmen recém-colhido e resfriado (4°C e ou 15°C) foram classificados conforme escala de Sauveur (1988): estacionária a muito rápido [0 a 10] no parâmetro de vigor.

Os dados microscópicos foram avaliados mediante análise de

variância, pelo procedimento GLM do programa SYSTAT 7.0, seguido pelo teste Tukey, para estabelecer a comparação entre médias. Para todos os parâmetros de porcentagem, foi realizada transformação angular de porcentagens correspondentes aos valores de ACS (SQR % sptz móveis/100). O valor de significância aceito foi de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 ejaculados formou-se um *pool* de  $2,35 \pm 0,25$  mL, branco leitoso e com certa viscosidade. A morfologia dos espermatozóides (sptz) foi muito semelhante à dos espermatozóides de *Gallus gallus* (Tabela 1). As médias do pH e da osmolaridade do sêmen foram de  $7,4 \pm 0,11$  e  $325 \pm 10,14$ , respectivamente. A média de espermatozóides/mL no *pool* foi de  $4,88 \pm 0,17 \times 10^9$  e a concentração final trabalhada na formação das alíquotas,  $600 \times 10^6$  sptz/mL. A média de concentração do *pool* por ejaculado foi de  $11,41 \pm 0,89 \times 10^9$  sptz/ejaculado (Tabela 1).

Tabela 1. Médias obtidas dos pools de sêmen dos capotes

Cor	Aspecto	Osmolaridade	Volume	pH-	Nº sptz <sup>1</sup> x10 <sup>9</sup> /mL	Nº de sptz <sup>1</sup> x10 <sup>9</sup> /ejaculados
Branca	leitoso	7,4± 0,11	325±10,14	2,35±0,25	4,87±0,16	11,4±9,5

<sup>1</sup>Espermatozóides.

Os resultados obtidos para o volume e a concentração por ejaculado do sêmen foram semelhantes aos achados de De Reviers (1972). No entanto, a concentração de espermatozóides por mL foi superior à encontrada por De Reviers (1972) e Surai & Wishart (1996). O pH e a osmolaridade do sêmen neste trabalho se assemelharam às observadas por Sauveur (1988).

Considerou-se que a permeabilidade das membranas de espermatozóides de

capotes pode ser semelhante à de espermatozóides de galos. Em galos, as membranas são metabolicamente facultativas para o oxigênio e diferenciam-se das membranas de espermatozóides de perus, cujo metabolismo é estritamente aeróbio (VAN WANBEKE, 1996). Na inseminação artificial de capotes, utiliza-se a diluição de 1:1 em tempo não superior a 30 minutos da colheita para a inseminação das fêmeas, fato observado

na rotina da granja comercial das aves. Dessa forma, o armazenamento das alíquotas fracionadas foi realizado sem ultrapassar esse período de tempo.

Modificou-se para 325 mOsm a osmolaridade do DC com variação de 410 a 420 mOsm a fim de se assemelhar à osmolaridade do sêmen colhido e evitar o efeito deletério que o DC de aves, na sua forma original, causou nos espermatozoides de capotes nas avaliações iniciais e após diferentes tempos de conservação.

A ACP® no tempo zero, isto é, imediatamente pós-diluição 1:1 em temperatura de 25°C, não diferiu significativamente da obtida com DC (P>0,05).

Após 2 horas (T2) de conservação a 4°C e a 15°C, observou-se redução dos valores no percentual de motilidade, vigor e número de espermatozoides viáveis em ambos os diluidores, o que confirma relatos sobre a influência do tempo de estocagem, da temperatura, do volume e/ou da quantidade de sêmen de aves (VAN WAMBEKE & FUJIHARA, 1994; VAN WAMBEKE, 1996; BONNES et al., 2005).

No entanto, para todos os parâmetros avaliados, o diluidor à base de água de coco em pó a 4°C apresentou melhor desempenho em todos os tempos de conservação. No tempo T2, permaneceu

acima dos valores mínimos recomendados para a inseminação artificial, resultado observado também no T24 (P<0,05) (Tabela 2).

Para um sêmen ser considerado bom, deve conter mínimo de 80% de espermatozoides normais e máximo de 20% de espermatozoides com anormalidades (FONTANA et al., 1990). O aumento do número de espermatozoides móveis *in vitro* pressupõe que maior número de fêmeas pode ser inseminado (Tabela 3).

Os resultados obtidos foram superiores a 70%, portanto, são compatíveis com o número mínimo de células necessário para se obter fertilidade ótima (FONTANA et al., 1990).

O ACP® à 4°C apresentou o melhor desempenho espermático após duas horas de conservação (91%), seguido do mesmo diluidor a 15°C (80%), que não diferiu do comercial a 4°C (80%) e, por último, do sêmen diluído com o comercial a 15°C (78%). Após 24 horas, apenas o sêmen do diluidor água de coco manteve-se com 80% de espermatozoides normais. Os outros tratamentos não permitiram obter o valor mínimo de 80% de espermatozoides normais, provavelmente porque os fatores tempo e/ou temperatura interferiram na ação protetora e conservadora do diluidor comercial.

Tabela 2. Parâmetros de motilidade do sêmen de capote diluído em água de coco em pó (ACP®) e diluidor comercial conservados e resfriados à temperatura (T) de 4°C e 15°C durante 24 horas

T (°C)	Motilidade (%)			Vigor (0 a 10)			Espermatozoides (Viáveis x 10 <sup>9</sup> /mL)		
	0h	2h	24h	0h	2h	24h	0h	2h	24h
Água de coco em pó (ACP®)									
4	94±0,6 <sup>a</sup>	88±0,9 <sup>a</sup>	74±3,7 <sup>a</sup>	9,3±0,0 <sup>a</sup>	8,9±0,07 <sup>a</sup>	7,4±0,3 <sup>a</sup>	10,8±0,3 <sup>a</sup>	10,01±0, <sup>a</sup>	8,65±0,5 <sup>a</sup>
15	94±0,5 <sup>a</sup>	71±2,3 <sup>b</sup>	60±3 <sup>b</sup>	9,3±0,0 <sup>a</sup>	7,2±0,4 <sup>b</sup>	5,1±0,3 <sup>b</sup>	10,5±0,5 <sup>a</sup>	8,1±0,3 <sup>b</sup>	6,93±0,3 <sup>b</sup>
Diluidor Comercial									
4	94±0,6 <sup>a</sup>	75±3 <sup>b</sup>	53±3,3 <sup>c</sup>	9,3±0,0 <sup>a</sup>	8,1±0,11 <sup>a</sup>	4,9±0,2 <sup>b</sup>	10,8±0,3 <sup>a</sup>	8,3±0,47 <sup>b</sup>	5,95±0,3 <sup>b</sup>
15	95±0,0 <sup>a</sup>	61±2 <sup>c</sup>	41,7±1,9 <sup>d</sup>	9,3±0,0 <sup>a</sup>	5,9±0,3 <sup>c</sup>	4,0±0,2 <sup>b</sup>	9,4±0,6 <sup>a</sup>	7,0±0,26 <sup>c</sup>	4,83±0,3 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (P<0,05).

Tabela 3. Percentagem das alterações morfológicas dos espermatozóides de capotes em dois diluidores resfriados após 2 horas e 24 horas de armazenamento

Diluidor	Temperatura (°C)	Normais (%)	
		2h	24h
Água de coco em pó (ACP®)	4	91±0,04 <sup>a</sup>	80±0,06 <sup>a</sup>
Água de coco em pó (ACP®)	15	80±0,04 <sup>b</sup>	63±0,08 <sup>b</sup>
COMERCIAL	4	80±0,05 <sup>b</sup>	58±0,07 <sup>b</sup>
COMERCIAL	15	78±0,05 <sup>c</sup>	58±0,06 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (P<0,05).

A concentração do número de espermatozóides nos ejaculados de um mesmo capote assemelhou-se aos resultados encontrados em *Gallus gallus* por De Reviere (1972). Assim como a aparência do sêmen de capotes é semelhante à do *Gallus gallus*, tanto no aspecto como na cor.

Os resultados obtidos demonstraram que o diluidor à base de água de coco em pó na temperatura de 4°C possibilita obter melhores resultados de desempenho em todos os tempos de conservação, pois o sêmen apresentou menor percentual de alterações morfológicas e maior percentual de espermatozóides viáveis.

Achados similares também foram obtidos em mamíferos como: ovinos e caprinos (SALLES, 1989; NUNES, 1998; BRAZ, 2003); suínos (NASCIMENTO et al., 2004); eqüinos (ENGLAND & PONZIO, 1996); e aves (GEE & SEXTON, 1990; BLANCO et al., 2000; DOUARD et al., 2000). A água de coco para congelamento de sêmen canino, além de preservar a qualidade espermática, ainda apresentou baixo custo e fácil preparo. (CARDOSO et al., 2000).

Em outro estudo, Cardoso et al. (2007) avaliaram a relação entre os testes de interação espermatozóide-ócito, por meio de análise computadorizada da morfologia espermática e da fluorescência na avaliação do sêmen canino congelado diluído em água de coco em pó (ACP® 106) e concluíram que o ACP®-106 é capaz de manter o potencial fertilizante *in vitro* do espermatozóide canino. Este

resultado confirma a função conservativa descrita em pesquisas com sêmen de outros animais. O interesse de pesquisadores agrega o fator econômico do produtor, que poderá reduzir os custos no controle do tempo de estocagem e no período de inseminação.

A água de coco em pó a 4°C pode ser usada na conservação do sêmen de capotes.

## REFERÊNCIAS

BLANCO, M.J.; GEE, G.; WILDT, D.E.; DONOGHUE, A.M. Species variations in osmotic, cryoprotectant on semen volume and sperm concentration in broiler breeder male. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1164-1171, 2000.

BONNES, G.; DESCLAUDE, J.; DROGOUL, C. **Reproduction des animaux d'élevage**. 2.ed. France: Educagri Dijon, 2005. 407p.

BRAZ, V.B. **Influência do diluidor, da temperatura de conservação e da taxa de diluição sobre a sobrevivência espermática in vitro do sêmen de ovino resfriado**. 2003. 73f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UECE, Fortaleza.

BURROWS, W.H.; QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v.16, n.1, p.19-24, 1937.



CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP®-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p. 11-16, 2007.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Congelamento do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. **Ciência Animal**, v. 10, p. 29-36, 2000.

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

DE REVIERS, M. Evaluation des reserves spermatique dans les voies déferentes du coq. **Annual Biology Animal Biochemical Biophysics**, v.12, p. 5-11, 1972.

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

ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 165-171, 1996.

FONTANA, E.A.; WEAVER, W.D.; VAN KREY, H.P. Effects of various feeding regimens on reproduction in broiler breeder males. **Poultry Science**, v. 69, p.209-216, 1990.

GEE, G.F.; SEXTON, T.J. Cryogenic preservation of sêmen from the Aleutian Canada goose. **Zoo Biology**, v. 9, p. 361-371, 1990.

NASCIMENTO, A.B.; OLIVEIRA, V.P.; MARQUES, M.G.; TONIOLLI, R.; GERGER, R.P.C.; VISINTIN, J.A.; SENEDA, M.M. Efeito in vitro da água de coco e BTS associados à cafeína sobre a capacitação espermiática em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.2, p.93-97, 2004.

NUNES, J.F. A utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do Homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.109-112, 1998.

PEREIRA, K.S.; MARUCHI, S.M.G.; RIBEIRO, M.G.; TELES, M.E.O. Morfologia do testículo de *Numida meleagris* (Linné, 1758) Numididae-Galliformes. **BIOS – Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC**, v.2, n.2, p.19-24, 1994.

RURALNEWS. **Criação de galinha d'angola**. Belo horizonte, 2004. Disponível em: <<http://www.ruralnews.com.br>>. Acesso em: 17 set. 2005.

SALLES, M.G.F. **Água de coco (Cocos nucifera) in natura e sob a forma de gel estabilizada como diluidor de sêmen caprino**. 1989. 176f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SAUVEUR, B. Reproduction femelle formation d'ouef. In: SAUVEUR, B. **Reproduction des volailles et production d'oeufs**. Paris: INRA,1988. 357p.

SOUSA, F.M. **Efeitos do ácido indol 3-acético (AIA) sintético na estocagem de sêmen do galo (Gallus gallus)**. 1998. 103f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

SURAI, P. F.; WISHART, G. J. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former. **Poultry Science**, v. 53, n. 3, p. 27-43, 1996.

VAN WANBEKE, J. Factors affecting the storage of the fowl and turkey semen liquid state. **World's Poultry Congress**, p.531-538, 1996.

VAN WANBEKE, J; FUJIHARA, N. The effect of transparent fluid on fertility, hatchability and embryonic mortality following insemination of normal number of stored fowl spermatozoa. **Canadian Journal Animal of Science**, v. 74, p.462-475, 1994

Data de recebimento: 21/05/2008

Data de aprovação: 2/09/2008