

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE  
GIRASSOL EM FÊMEAS BOVINAS NA PRODUÇÃO DE  
OÓCITOS E EMBRIÕES *IN VITRO***

**Angélica Leão Baltazar**

Bióloga

ARAÇATUBA- SP  
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE  
GIRASSOL EM FÊMEAS BOVINAS NA PRODUÇÃO DE  
OÓCITOS E EMBRIÕES *IN VITRO***

**Angélica Leão Baltazar  
Orientadora: Profa. Pesq. III Flávia Lombardi Lopes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**ARAÇATUBA - SP  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

B197e Baltazar, Angélica Leão  
Efeitos da suplementação com semente de girassol em  
fêmeas bovinas na produção de oócitos e embriões in vitro /  
Angélica Leão Baltazar. – Araçatuba, 2016.  
109f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.  
Orientadora: Profa. Flávia Lombardi Lopes

1. Ácido linoleico. 2. Bovinos. 3. Estruturas embrionárias.  
4 Sementes. 5. Girassol. I. Título.

CDD 664.726



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba  
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Efeitos da suplementação com semente de girassol em fêmeas bovinas na produção de óocitos e embriões in vitro

**AUTORA:** ANGÉLICA LEÃO BALTAZAR

**COORIENTADORA:** Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

  
Dra. CALIE CASTILHO SILVESTRE

  
Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

  
Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 15 de janeiro de 2016.

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE  
- Coorientadora -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ANGÉLICA LEÃO BALTAZAR** – Nascida em 10 de abril de 1990, na cidade de Birigui/SP. Em 2009, ingressou no curso de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campus de Três Lagoas/MS, tendo concluído a graduação em março de 2013. Durante a graduação, desenvolveu atividades de pesquisa no Laboratório de Reprodução Animal, na área de Biotecnologia da Reprodução Animal, com ênfase no cultivo de oócitos bovinos em um sistema sem controle da atmosfera gasosa. No período de 01/08/2010 a 31/07/2011, foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Processo nº 145220/2010-9, com o projeto intitulado “Cultivo de oócitos bovinos em um sistema sem controle da atmosfera gasosa com uso da gonadotrofina sérica equina (PMSG)”. No período de 01/08/2011 a 31/07/2012 foi novamente bolsista de Iniciação Científica do CNPq, Processo nº 144285/2011-8, com o projeto intitulado “Citogenética de oócitos bovinos maturados em sistema sem controle da atmosfera gasosa”. Ambas as iniciações foram realizadas sob orientação do Prof. Dr. Hélder Silva e Luna. Em agosto de 2013, ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba/SP, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação da Profa. Pesquisadora III Flávia Lombardi Lopes. Durante o mestrado, permaneceu no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião - LIFEE, sediado na UNESP, Campus de Dracena/SP, sob coorientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Foi bolsista de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, no período de outubro de 2013 a fevereiro de 2015.

*“Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo. Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência. Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo. Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve. Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia”.*

*Chico Xavier*

## *DEDICATÓRIA*

*A minha família, bem mais precioso que possuo, em especial a minha grandiosa mãe, MARIA LÚCIA LEÃO BALTAZAR, que é meu exemplo de bondade, dedicação e amor. “Tudo aquilo que sou, ou pretendo ser, devo a um anjo, minha mãe” (Abraham Lincoln).*

*Ao meu querido e amado noivo, ARTUR GUISSI ZAVANELLA, por todo carinho, compreensão, companheirismo e apoio as minhas escolhas.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Á Deus, por sempre me dar a força necessária para seguir em frente todos os dias, e me ensinar que os percalços da vida são necessários ao nosso aprendizado e evolução.*

*Aos meus pais, André Baltazar Filho e Maria Lúcia Leão Baltazar, e minha irmã, Andressa Leão Baltazar, e todos meus familiares e amigos, por sempre me darem o suporte necessário, amor e compreensão, estando ao meu lado nas lutas, derrotas e conquistas da vida.*

*Ao meu amado noivo, Artur Guissi Zavanella, que ao longo de nove anos de namoro e companheirismo, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e incentivando. Obrigada por sempre sorrir e por me mostrar o lado positivo de todas as coisas. Com você ao meu lado esta caminhada se tornou mais suave.*

*A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba/SP, em especial a Profa. Dra. Juliana Regina Peiró, pela oportunidade concedida.*

*A minha querida co-orientadora, Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, por sempre persistir, incentivar e se esforçar para que esse trabalho fosse realizado, além de ser um exemplo de dedicação e comprometimento.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.*



*A Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDFUNESP), pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do presente trabalho.*

*A Fazenda Experimental da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), por disponibilizar os animais utilizados no presente estudo, e fornecer o local apropriado para o experimento. Agradeço também aos funcionários da fazenda, pelo apoio, paciência, orientação, e ajuda na execução do experimento e no manejo dos animais, em especial: Edson, Rosa, Jefferson e Paulo.*

*Ao Dr. José Otávio Folino Silva, médico veterinário responsável e proprietário do laboratório Quali's in vitro, por ter disponibilizado a estrutura física do laboratório para os processos de PIV de embriões bovinos, e pela realização do processo de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) nas novilhas utilizadas no experimento.*

*A Profa. Dra. Caliê Castilho Silvestre, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente/SP, pela valiosa contribuição científica e por acompanhar de perto todas as etapas deste experimento.*

*A Profa. Ms. Sheila Merlo Garcia, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela disponibilidade e auxílio na realização dos procedimentos de PIV de embriões.*

*A PROGEST Biotecnologia em Reprodução Animal, em especial á Dra. Raquel Puelker, pela doação de parte dos meios de cultivo utilizados neste estudo.*

*Ao Prof. Dr. Gelci Carlos Lupatini, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), e a sua orientada, Mayara Mayumi dos Santos Shiguematsu, graduanda de Zootecnia pela UNESP de Dracena, pela grandiosa ajuda na coleta, processamento e análise das amostras de forragens e suplementos utilizados no experimento.*

*Ao Prof. Dr. Paulo Meireles, responsável pelo Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Laboratório de Bromatologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, pela realização das análises bromatológicas das forragens e suplementos.*

*A Mariângela Bueno Cordeiro, doutoranda do programa de Pós-graduação da UNESP do Campus de Araçatuba/SP, pela ajuda na utilização do “software” Graph Pad Prism®, Version 5.01, aplicado para a confecção dos gráficos referentes aos resultados do presente estudo.*

*A Profa. Dra. Gisele Zocal Mingoti, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/SP, pela oportunidade de realizar um estágio de treinamento e capacitação em seu Laboratório de Fisiologia da Reprodução, e também por todo auxílio, suporte e atenção que suas orientadas Priscila, Beatriz e Natália dispenderam á mim.*

*Ao Dr. Guilherme Pugliesi, Pós Doutorando do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo – USP, pelo auxílio na realização da análise estatística dos dados.*

*Ao Dr. Milton Maturana Filho, Pós Doutorando do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo – USP, pela realização das mensurações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL.*

*Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba/SP, e ao Dr. Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira, pesquisador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pelas grandes contribuições e valiosas sugestões durante a participação na banca do Exame Geral de Qualificação.*

*Aos queridos amigos Gabriel Molinari de Mattos, Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE); Beatriz de Moraes Ropelli, Alan Brunholi Giroto e Renato Aranda Fernandes, graduandos em Medicina Veterinária pela UNOESTE, pela grandiosa contribuição experimental, auxiliando na execução dos procedimentos técnicos de manejo com os animais. Agradeço pela oportunidade de ter conhecido vocês e pelos momentos de grande alegria e aprendizado que pudemos compartilhar.*

*Aos técnicos de laboratório da UNESP, Campus de Dracena/SP, pelo auxílio concedido, em especial a técnica Ariane Carrascossi da Silva, pela disponibilidade em ajudar, paciência, dedicação e comprometimento com tudo o que faz. Encontrei uma amiga para a vida inteira e que com certeza tornou os dias de dificuldade mais amenos.*

*Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira e a Profa. Dra. Caliê Castilho Silvestre, componentes da banca examinadora, pela disponibilidade e colaboração nesta dissertação.*

*E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho...o meu muito obrigada!*

## SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	29
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1 Características lipídicas da semente de girassol.....	33
2.2 Produção nacional de embriões bovinos <i>in vitro</i> .....	36
2.3 Efeitos dos AGPI na performance reprodutiva de fêmeas bovinas.....	38
2.4 Efeitos da suplementação lipídica em oócitos e embriões.....	40
2.5 Aplicação prática da suplementação lipídica em programas de produção de embriões bovinos.....	43
III. OBJETIVOS.....	48
IV. HIPÓTESE.....	49
V. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.1 Local do experimento.....	50
5.2 Animais.....	50
5.3 Sincronização da onda de crescimento folicular.....	51
5.4 Tratamentos <i>in vivo</i> .....	52
5.5 Aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU).....	54
5.6 Identificação dos COCs.....	55
5.7 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	56
5.8 Fertilização <i>in vitro</i> .....	56
5.9 Cultivo de embriões <i>in vitro</i> .....	56
5.10 Coleta de sangue.....	57
5.11 Mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL.....	58
5.12 Coleta das amostras de forragem e suplementos.....	58
5.13 Análises bromatológicas.....	59
5.14 Análise estatística.....	59
VI. RESULTADOS.....	61
6.1 Ganho de peso.....	61
6.2 Escore de condição corporal.....	64
6.3 Número de folículos visualizados, número de oócitos aspirados e taxa de recuperação oocitária.....	66
6.4 Taxa de clivagem.....	69
6.5 Número de embriões produzidos <i>in vitro</i> .....	70

6.6 Número de blastocistos produzidos <i>in vitro</i> .....	71
6.7 Número de embriões GI e GII produzidos <i>in vitro</i> .....	72
6.8 Taxa de blastocistos.....	73
6.9 Taxa de embriões graus I e II.....	74
6.10 Avaliação das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL .....	75
6.11 Análises bromatológicas das forragens e suplementos.....	80
VII. DISCUSSÃO.....	82
VIII. CONCLUSÃO.....	90
IX. IMPLICAÇÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AGE</b>	Ácidos graxos essenciais
<b>AG</b>	Ácidos graxos
<b>AGPI</b>	Ácidos graxos poliinsaturados
<b>ALA</b>	Ácido Linolênico
<b>AL</b>	Ácido linoleico
<b>BE</b>	Benzoato de estradiol
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>C</b>	Controle
<b>C16:0</b>	Ácido palmítico
<b>C18:0</b>	Ácido esteárico
<b>C18:1</b>	Ácido oleico
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CL</b>	Corpo lúteo
<b>CLA</b>	Ácido linoleico conjugado
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>COCs</b>	Complexos <i>cumulus</i> -oócito
<b>DHA</b>	Ácido docosahexanóico
<b>DPBS</b>	Solução salina em tampão fosfato
<b>ECC</b>	Escore de condição corporal
<b>EE</b>	Extrato etéreo
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>FDA</b>	Fibra em detergente ácido
<b>FDN</b>	Fibra em detergente neutro
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>g</b>	Gramas
<b>G</b>	Girassol
<b>h</b>	Hora
<b>hCG</b>	Gonadotrofina coriônica humana
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HEPES</b>	N- (2-hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4-(2 Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid
<b>hpi</b>	Horas pós-inseminação

<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>IATF</b>	Inseminação artificial em tempo fixo
<b>IFNT</b>	Interferon- tau
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>kg</b>	Kilograma
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>Log</b>	Logarítmo
<b>m</b>	Metro
<b>MCI</b>	Massa celular interna
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MIV</b>	Maturação <i>in vitro</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercúrio
<b>MM</b>	Matéria mineral
<b>MOET</b>	Ovulação múltipla e transferência de embriões
<b>MS</b>	Matéria seca
<b>n</b>	Número
<b>n-3</b>	Ômega-3
<b>n-6</b>	Ômega-6
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NDT</b>	Nutrientes digestíveis totais
<b>OPU</b>	<i>“Ovum pick up”</i>
<b>P4</b>	Progesterona
<b>PB</b>	Proteína bruta
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	Prostaglandina F2 $\alpha$
<b>PHE</b>	Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina
<b>PIV</b>	Produção <i>in vitro</i> de embriões
<b>Rank</b>	Ranqueamento
<b>SAS</b>	Sistema de análise estatística
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SOF</b>	<i>“Synthetic oviduct fluid”</i>
<b>TALP</b>	Tyrode’s” albumina lactato piruvato
<b>TE</b>	Transferência de embriões
<b>TCM-199</b>	“Tissue culture medium” 199
<b>TETF</b>	Transferência de embriões em tempo fixo
<b>UI</b>	Unidades internacionais



<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>%</b>	Porcentagem

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1 –** Representação esquemática do delineamento experimental ilustrando os respectivos dias de OPU, aplicação de PGF2 $\alpha$  e BE, coletas de sangue e o período de suplementação..... 53
- Figura 2 –** Peso Vivo (kg) nos diferentes dias de suplementação, em fêmeas bovinas Nelore (n=30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 61
- Figura 3 –** Peso Vivo (kg) dos animais em relação ao tempo, em cada dia de suplementação para fêmeas bovinas Nelore (n=30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 62
- Figura 4 –** Escore de condição corporal (escala de 1 a 5) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 65
- Figura 5 –** Escore de condição corporal (escala de 1 a 5) em relação ao tempo, de cada grupo em cada dia de suplementação, para fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol..... 66

<b>Figura 6 –</b>	Número de folículos visualizados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	67
<b>Figura 7 –</b>	Número de oócitos aspirados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	68
<b>Figura 8 –</b>	Taxa de recuperação dos oócitos cultivados em relação aos folículos aspirados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	69
<b>Figura 9 –</b>	Taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	70
<b>Figura 10 –</b>	Número de embriões produzidos <i>in vitro</i> em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	71
<b>Figura 11 –</b>	Número de blastocistos em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	72

<b>Figura 12 –</b>	Número de embriões GI e GII produzidos <i>in vitro</i> , em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	73
<b>Figura 13 –</b>	Taxa de blastocistos (porcentagem de blastocisto geral (grau I + grau II) / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	74
<b>Figura 14 –</b>	Taxa de embriões GI e GII (porcentagem de embriões Grau I e Grau II (mórula a blastocisto eclodido) no D7 / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	75
<b>Figura 15 –</b>	Concentrações plasmáticas de colesterol total (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol durante 57 dias.....	76
<b>Figura 16 –</b>	Concentrações plasmáticas de triglicerídeos (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol, durante 57 dias.....	77
<b>Figura 17 –</b>	Concentrações plasmáticas de HDL (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	78

**Figura 18 –** Concentrações plasmáticas de LDL (mg/dL) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) tratadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol (n = 30)..... 79

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1 –</b> Principais fontes de gordura empregadas na alimentação animal e suas respectivas composições de ácidos graxos.....	34
<b>Tabela 2 –</b> Variação da composição em ácidos graxos do óleo em função de seis genótipos de girassol.....	35
<b>Tabela 3 –</b> Médias $\pm$ EPM para as diferentes variáveis analisadas no experimento em relação aos diferentes dias em que foram realizadas aspirações foliculares (OPU), para fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.....	63
<b>Tabela 4 –</b> Médias $\pm$ EPM das variáveis observadas durante o experimento em relação ao peso, ECC, nº de folículos visualizados, nº de oócitos aspirados, taxa de clivagem, nº de embriões, nº de blastocistos, nº de embriões GI e GII, taxa de blastocistos e taxa de embriões GI e GII para fêmeas Nelore suplementadas ou não, e os valores de P considerando grupo, tempo e a interação entre grupo x tempo.....	64
<b>Tabela 5 –</b> Composição bromatológica das amostras de forragens para simulação de pré-pastejo de capim estrela-africana ( <i>Cynodon nlemfüensis</i> ) para os grupos experimentais e dos suplementos contendo ou não semente de girassol utilizados no experimento.....	80

<b>Tabela 6 -</b>	Médias das alturas e da massa de forragem de capim estrela-africana ( <i>Cynodon nlemfüensis</i> ), coletadas no período pré e pós-pastejo, para o Grupo Controle e Girassol.....	81
-------------------	---	----

## APÊNDICE A

Página

<b>Figura 1A</b> – Consumo dos suplementos/animal/dia em relação aos dias de ingestão do suplemento, demonstrando a ingestão estipulada e a ingestão alcançada para o Grupo Controle.....	108
<b>Figura 2A</b> – Consumo dos suplementos/animal/dia em relação aos dias de ingestão do suplemento, demonstrando a ingestão estipulada e a ingestão alcançada para o Grupo Girassol.....	109



## EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SEMENTE DE GIRASSOL EM FÊMEAS BOVINAS NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES *IN VITRO*

**RESUMO-** A suplementação com compostos ricos em ácido linoleico, dentre os quais inclui-se a semente de girassol, promove aumento na taxa de concepção em fêmeas bovinas. Hipotetizou-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos aumenta o número e a qualidade de oócitos, incrementa as taxas de clivagem e determina um aumento no número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*. Assim, objetivou-se investigar o efeito de tal suplementação, no número e qualidade de oócitos cultivados *in vitro*, na taxa de clivagem e no número e qualidade de blastocistos produzidos *in vitro*. Para tanto, cinco vacas e vinte e cinco novilhas (n=30) Nelore foram divididas em dois grupos para receberem um dos seguintes tratamentos: 1,7 kg/dia de suplemento contendo 53% de farelo de soja com 44% de PB e 47% de milho (Grupo Controle - Grupo C; n= 15) ou 1,7 kg/dia de suplemento contendo 40% de farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) e 60% de semente de girassol (Grupo Girassol - Grupo G; n= 15), durante 57 dias. As fêmeas foram submetidas à aspiração folicular nos dias D0, D13, D29, D43, D56 e D77 (D0= início da suplementação; D56= término da suplementação). Os oócitos foram submetidos ao processo de produção de embriões *in vitro*. Os dados foram analisados pelo programa Mixed procedure (SAS) versão 9.2, pelo teste ANOVA modelo misto. Não se observou diferença entre os Grupos C e G no número de folículos visualizados ( $16,85 \pm 1,32$  vs.  $16,12 \pm 1,48$ ); número de oócitos aspirados ( $13,80 \pm 1,27$  vs.  $13,05 \pm 1,25$ ); taxa de recuperação ( $82 \pm 1\%$  vs.  $80 \pm 2\%$ ); taxa de clivagem ( $76,32 \pm 1,58\%$  vs.  $76,78 \pm 2,11\%$ ); número de embriões ( $10,79 \pm 0,94$  vs.  $10,08 \pm 1,01$ ); número de blastocistos ( $5,89 \pm 0,66$  vs.  $4,48 \pm 0,6$ ); número de embriões Grau I e II ( $5,49 \pm 0,64$  vs.  $4,17 \pm 0,57$ ); concentrações plasmáticas de colesterol total ( $85,76 \pm 1,20$  vs.  $87,11 \pm 1,18$  mg/dL), triglicerídeos

(14,98 ± 0,29 vs. 14,26 ± 0,27 mg/dL); HDL (35,12 ± 1,10 vs. 35,40 ± 1,0 mg/dL) e LDL (47,92 ± 1,58 vs. 48,85 ± 1,51 mg/dL), para os respectivos grupos. Conclui-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos não incrementou o número e a qualidade de oócitos, as taxas de clivagem e o número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** ácido linoleico, bovinos, estruturas embrionárias, girassol, oócitos, sementes

## **EFFECTS OF SUPPLEMENT WITH SUNFLOWER SEED IN THE FEMALE BOVINE OOCYTES PRODUCTION AND EMBRYOS *IN VITRO***

**SUMMARY-** Supplementation with compounds rich in linoleic acid, among which is included sunflower seed, promotes increase in conception rates in cows. It was hypothesized that sunflower seed supplementation in oocyte donors increases the number and quality of oocytes, increases the cleavage rates and determines an increase in the number and quality of blastocysts produced *in vitro*. Therefore the objective was to investigate the effect of such supplementation, in the number and quality of oocytes cultured *in vitro* on cleavage rate and in the number and quality of *in vitro* produced blastocysts. Therefore, cows five and twenty-five heifers (n = 30) Nellore were divided into two groups to receive one of the following treatments: 1.7 kg / day supplement containing 53% soybean meal 44% and 47% PB corn (Control Group - Group C, n = 15) or 1.7 kg / containing 40% add-on of soybean meal with 44% crude protein (CP) and 60% sunflower seed (Sunflower group - Group G; n = 15) for 57 days. Females underwent follicular aspiration on days D0, D13, D29, D43, D56 and D77 (D0 = start of supplementation; D56 = end of supplementation). The oocytes were subjected to *in vitro* embryo production process. Data were analyzed by the Mixed procedure (SAS) version 9.2, by ANOVA mixed model. There was no difference between Groups C and G on the number of displayed follicles ( $16.85 \pm 1.32$  vs.  $16.12 \pm 1.48$ ); number of aspirated oocytes ( $13.80 \pm 1.27$  vs.  $13.05 \pm 1.25$ ); recovery rate ( $82 \pm 1\%$  vs.  $80 \pm 2\%$ ); cleavage rate ( $76.32 \pm 1.58\%$  vs.  $76.78 \pm 2.11\%$ ); number of embryos ( $10.79 \pm 0.94$  vs.  $10.08 \pm 1.01$ ); number of blastocysts ( $5.89 \pm 0.66$  vs.  $4.48 \pm 0.6$ ); embryos number of Grade I and II ( $5.49 \pm 0.64$  vs.  $4.17 \pm 0.57$ ); plasma concentrations of total cholesterol ( $85.76 \pm 1.20$  vs.  $87.11 \pm 1.18$  mg / dl),

triglycerides ( $14.98 \pm 0.29$  vs.  $14.26 \pm 0.27$  mg / dL); HDL ( $35.12 \pm 1.10$  vs.  $35.40 \pm 1.0$  mg / dL) and LDL ( $47.92 \pm 1.58$  vs.  $48.85 \pm 1.51$  mg / dL), for the respective groups. It was concluded that sunflower seed supplementation in oocyte donors did not increase the number and quality of oocytes, cleavage rates and the number and quality of blastocysts produced *in vitro*.

**Keywords:** linoleic acid, cattle, embryonic structures, sunflower, oocytes, seed

## I- INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce de forma desproporcional ao aumento da população (FEDOROFF et al., 2010). O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, estimado em 217.550.000 animais, sendo 80% destes destinados à produção de carne. Estima-se que a produção nacional de carne bovina em 2015 tenha sido de 8.192.920 toneladas de equivalente carcaça, proveniente do abate de 43.070.000 cabeças (ANUALPEC, 2015). Atualmente, o Brasil apresenta uma taxa de desfrute (número de animais abatidos divididos pelo número total de animais x 100) de 20% e abate carcaças com um peso médio de 15 arrobas (ANUALPEC, 2015). Em comparação, os norte-americanos desfrutam de 30% do seu rebanho e abatem carcaças pesando 24 arrobas (ANUALPEC, 2015). Assim, o rebanho nacional apresenta uma produção de carne/animal abatido aquém da almejada.

Na bovinocultura de corte, a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, que devem apresentar um intervalo entre partos de 12 meses, gerando a produção de um bezerro/matriz/ano. Em 2014, o rebanho nacional era composto por 80.632.741 matrizes, destas 65.548.639 eram vacas e 15.084.102 novilhas com mais de 24 meses. Em 2015, estimou-se uma produção nacional de 47.984.262 bezerros (ANUALPEC, 2015), caracterizando uma média nacional de 0,6 bezerro/vaca/ano, um intervalo entre partos de aproximadamente 18 meses e uma baixa eficiência reprodutiva.

Para que a bovinocultura brasileira supere os índices atuais de produtividade, além da eficiência reprodutiva, o melhoramento genético necessita ser priorizado (BARUSELLI et al., 2006). O emprego de biotécnicas que possibilitam que fêmeas bovinas geneticamente superiores se multipliquem em maior escala favorece o incremento genético do rebanho. Neste contexto, o Brasil se tornou líder mundial no emprego da técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). A TETF, aliada à produção *in vitro* (PIV) de

embriões, constituem biotécnicas poderosas para aumentar os produtos nascidos oriundos de matrizes geneticamente superiores.

O número total de embriões produzidos no mundo (coletados *in vivo* e produzidos *in vitro*), entre 2008 e 2012, apresentou um aumento de 5,8%. Entre 2012 e 2013, o aumento foi de 11,6%, chegando ao total de 1.275.874 embriões produzidos (Sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 2015). Atualmente, o Brasil consagrou-se como líder mundial na PIV de embriões bovinos, responsável por 70% do total de embriões gerados no mundo (Federação da agricultura e pecuária do estado de Minas Gerais, 2013).

As matrizes zebuínas apresentam maior produção de oócitos quando comparadas as fêmeas taurinas. Com o emprego da aspiração folicular guiada por ultrassonografia pelo método de “*ovum pick up*” (OPU) associado à produção *in vitro* (PIV), fêmeas da raça Nelore se tornaram as principais representantes do rebanho nacional de matrizes, pois rendem em média 30 oócitos por sessão de OPU, podendo chegar até mais que 128 oócitos viáveis coletados em um único animal (PONTES et al., 2011). Com o emprego destas biotécnicas, torna-se possível obter entre 50 a 100 embriões/fêmeas/ano. Considerando uma taxa de concepção de 50% após a TETF, torna-se possível obter de 25 a 50 bezerros/vaca/ano (RHEINGANTZ, 2005), índice que supera a eficiência dos métodos convencionais que associam a superovulação a transferência de embriões (MOET), resultando em um menor custo por prenhez. No comparativo entre as técnicas de OPU associada à PIV com o método convencional MOET (ovulações múltiplas e transferência de embriões), a OPU/PIV oferece a vantagem de reduzir o intervalo entre as coletas no mínimo em 15 dias, além de possibilitar a produção em média de oito embriões viáveis por sessão de aspiração. Pela técnica de MOET, a média seria de três a quatro embriões viáveis por coleta (PONTES et al., 2009).

A OPU/PIV permite empregar sêmen de touros de alto valor genético, reduzindo o custo do sêmen e do embrião produzido, uma vez que mais de 100 embriões podem ser originados com uma única palheta de sêmen. A PIV

permite a escolha do sexo dos bezerros gerados pela possibilidade de emprego do sêmen sexado e permite ainda o uso em maior escala das fêmeas receptoras de embriões, reduzindo o custo desta categoria (RHEINGANTZ, 2005). Entretanto, deve-se salientar que o principal obstáculo para a expansão comercial da PIV no Brasil é a obtenção de taxas de concepção insatisfatórias quando se transfere embriões criopreservados (NOGUEIRA, 2008a).

A maior produção de embriões por OPU/PIV reduz o custo por bezerro nascido. Desta forma, estratégias que possam incrementar a produção de oócitos aspirados, de embriões produzidos *in vitro* e/ou as taxas de concepção tornam-se relevantes para aumentar a eficiência destas biotécnicas associadas.

Dentre os fatores que exercem influência na reprodução de fêmeas bovinas, a nutrição tem um papel reconhecidamente importante por modificar a performance reprodutiva (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010). Observou-se em estudos prévios, que os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) promovem benefícios às funções reprodutivas de fêmeas bovinas através de mecanismos não relacionados à suplementação energética (FUNSTON, 2004; RAES et al., 2004; STAPLES et al., 1998). Para bovinos, os AGPI da família do ômega 3 (n-3) e 6 (n-6), são os mais importantes envolvidos na reprodução. O ácido linoleico (AL) é abundante nos óleos vegetais e é um dos representantes da família do ômega 6 (WATHES et al., 2007). Dentre as sementes oleaginosas, uma das fontes mais ricas em AL é a semente de girassol (*Helianthus annuus L.*). O teor de óleo do girassol varia de 20 a 45% de acordo com o cultivar (DAGHIR et al., 1980; KARUNOJEEWA et al., 1989; SILVA, 1990), caracterizando-se por ter alta relação de AGPI/saturados (65,3%/11,6%). Em tal semente, os AGPI são constituídos por 65% de AL e 20% de ácido graxo insaturado oléico (CHEVA- ISARAKUL; TANGTWEWIPAT, 1991).

Em estudos prévios realizados por este grupo (CORDEIRO et al., 2015), observou-se que a taxa de concepção foi aumentada em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol durante 22 dias a partir da

Inseminação artificial em tempo fixo- IATF (47,8% vs. 66,7%), onde verificou-se um incremento de 18,9% nas taxas de concepção quando tal suplementação foi aliada a IATF. O entendimento dos mecanismos pelos quais tal incremento é ocasionado torna-se de grande interesse.

O efeito dos AGPI fornecidos na dieta sobre a reprodução pode ser parcialmente mediado por alterações na composição destes no fluído folicular e no microambiente que cerca o complexo *cumulus*-oócitos durante o desenvolvimento e maturação do folículo (CHILDS et al., 2008a; FOULADI-NASHTA et al., 2009). Além disso, relata-se que a suplementação com AGPI (FERGUSON, 1991), altera o número e o tamanho de folículos ovarianos (BILBY et al., 2006; LUCY et al., 1991; ROBINSON et al., 2002), além de incrementar a qualidade oocitária (CERRI et al., 2009b; CHILDS et al., 2008a; KIM et al., 2001; KOJIMA et al., 1997; ZERON et al., 2002). Em relação aos efeitos que os AGPI podem promover no microambiente uterino, estratégias nutricionais podem ser empregadas com a finalidade de reduzir a mortalidade embrionária entre os dias 15 e 19 da gestação. Tais estratégias objetivam minimizar a capacidade de síntese de  $PGF2\alpha$  no endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo concepto. A utilização de determinados componentes na dieta poderia promover alterações na composição lipídica endometrial, tornando-o menos luteolítico (MATTOS et al., 2000). Dentre os componentes citados, encontra-se o ácido linoleico.

A hipótese do presente estudo é que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos aumenta o número e a qualidade de oócitos, incrementa as taxas de clivagem e determina um aumento no número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*.

No presente estudo, objetivou-se investigar o efeito da suplementação com semente de girassol no número e qualidade de oócitos cultivados *in vitro*, na taxa de clivagem e no número e qualidade de blastocistos produzidos *in vitro* provenientes de fêmeas Nelore.



## II- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características lipídicas da semente de girassol

Existem várias fontes de gordura que podem ser fornecidas aos animais, tais como sementes de oleaginosas, sebo, óleo reciclado de cozinha, óleos vegetais, óleos de peixe e gorduras comercialmente protegidas contra ação dos microorganismos ruminais, como os sais de cálcio de ácidos graxos e gorduras granuladas (WATHES et al., 2007). Cada fonte de gordura é composta de uma mistura de diferentes ácidos graxos (AG) individuais. Os principais AG presentes nas dietas são ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), ambos saturados; ácido oléico (C18:1), este insaturado, e ácido linoleico e linolênico, ambos poliinsaturados (SOARES, 2009).

Na Tabela 1, estão sumarizadas as principais fontes de gordura utilizadas na alimentação animal e suas respectivas composições de ácidos graxos.

Tabela 1 – Principais fontes de gordura empregadas na alimentação animal e suas respectivas composições de ácidos graxos

Fonte de gordura	CONSTITUIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
	Mirístico	Palmítico	Palmito-oléico	Estearílico	Oléico	Linoleico	Linolênico
Sebo	3	25	3	18	43	4	<1
Óleo reciclado de cozinha	2	21	4	11	44	14	<1
Energy Booster 100 <sup>1</sup>	3	40	1	43	10	2	<1
Megalac; EnerG-II <sup>1</sup>	1	50	<1	4	36	8	<1
Megalac-R <sup>1</sup>	1	36	<1	4	26	29	3
Óleo de canola	<1	4	<1	2	63	19	9
Óleo de caroço de algodão	1	23	1	3	18	54	1
Óleo de linhaça	<1	5	<	3	20	16	55
Óleo de colza	<1	5	<1	2	54	22	11
Óleo de cártamo	<1	7	<1	2	12	78	<1
Óleo de soja	<1	11	<1	4	23	54	8
Óleo de girassol	<1	7	<1	5	19	68	1
Óleo de peixe Menhaden <sup>2</sup>	7	16	8	3	12	1	2

<sup>1</sup> Preparações comerciais consideradas parcialmente inertes no rúmen.

<sup>2</sup> Também contém 14% EPA e 9% DHA.

Fonte: Staples (2009).

As gorduras de graxaria, denominadas de sebo animal e a gordura amarela representada pelo óleo reciclado de cozinha são fontes de gordura compostas principalmente de ácido oléico (~43%). As gorduras granuladas, como Energy Booster 100, EnerG-II e Megalac; são gorduras secas compostas principalmente de ácido palmítico (36-50%). O óleo de canola é rico em ácido oléico (63%). O óleo de caroço de algodão, cártamo, girassol e soja são ricos em AL (54 a 78%). O ácido linoleico, abreviado como C18:2, representa um AG essencial do tipo ômega 6.

Em geral, as sementes oleaginosas são ricas em AGPI, mas uma das fontes mais ricas em AL é o girassol (*Helianthus annuus L.*). O teor de óleo do girassol varia de 20 a 45% de acordo com o cultivar (DAGHIR et al., 1980;

KARUNOJEEWA et al., 1989; SILVA, 1990), caracterizando-se por ter alta relação de AGPI/saturados (65,3%/11,6%), possuindo cerca de 24% de proteínas e 47% de AG em sua composição. Os AGPI são constituídos, quase na sua totalidade, pelo ácido linoleico e oleico, sendo que a concentração desses ácidos corresponde a 90% do total dos AG presentes no óleo de girassol (MANDARINO, 1992). O AL constitui o AG mais abundante na composição das sementes de girassol, apresentando teores próximos à 68% (QUEIROGA; DURÁN, 2010). Segundo Leite et al. (2005), a composição média das sementes de girassol é 4,8% de umidade, 19,9% de carboidratos totais, 24% de proteína, 47,3% de óleo, e 4% de cinzas, além de possuir em torno de 24% de fibra em detergente neutro (FDN).

Queiroga e Durán (2010) avaliaram a composição química de ácidos graxos do óleo de seis genótipos de semente de girassol. De acordo com a Tabela 2, observa-se que na semente de girassol, independente do genótipo, o AG mais abundante é o linoleico, procedido pelo oleico, palmítico e esteárico, respectivamente.

Tabela 2 – Variação da composição em ácidos graxos do óleo em função de seis genótipos de girassol

Genótipos	ÁCIDOS GRAXOS (%)				
	Palmítico (16:0)	Esteárico (18:0)	Oleico (18:1)	Linoleico (18:2)	Outros
Toledo-2	6,77	2,52	31,42	56,55	2,74
Peredovik	7,2	3,4	26	62,82	0,58
Narval	5,87	3,55	36,5	54,05	0,03
Girospan-70	5,87	4,2	26,37	62,4	1,16
Toledo-8	6,55	3,95	27,25	61,62	0,63
Monro-45	7,15	5,22	33,92	52,85	0,86

Fonte: Adaptada de Queiroga e Durán (2010).

Telles (2006) caracterizou os grãos de três variedades de girassol (Catissol, EMBRAPA e uma variedade híbrida) e reportou teores de lipídios entre 27,6 e 34,4% para as variedades analisadas. O mesmo autor determinou a composição de AG nas três variedades analisadas, sendo que o AG predominante foi o ácido linoleico (64,4 a 69,7%), seguido do ácido oleico (17,1 a 23,0%). Em relação aos ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (entre 5,8 e 6,5%) e o ácido esteárico (entre 4,1 e 4,4%) foram os predominantes nas três variedades estudadas.

Em áreas onde se faz rotação de culturas com o girassol, observa-se um aumento de produtividade de 10% nas lavouras de soja e entre 15 e 20% nas de milho. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), em 2015 o Brasil plantou mais de 120 mil hectares de girassol tendo havido uma produção nacional de 190 mil toneladas, sendo o estado de Mato Grosso responsável por quase 85% do girassol produzido no país, seguido pelo estado de Goiás, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, que juntos concentram mais de 90% do total produzido no país. Analisando-se a distribuição geográfica do rebanho de corte nacional, a região centro-oeste concentra 31,8% do rebanho nacional e detém 31,51% do total de matrizes, havendo no estado do Mato Grosso a maior concentração de matrizes do rebanho de corte nacional. Diante deste contexto, o incremento na performance reprodutiva com o uso da semente de girassol demonstrada em estudos anteriores realizados por este grupo (CORDEIRO et al., 2015) caracteriza a mesma como uma fonte de AGPI economicamente viável.

## **2.2 Produção nacional de embriões bovinos *in vitro***

A PIV representa uma biotécnica que tem sido amplamente empregada na reprodução assistida das áreas humana e animal. No âmbito da produção animal, a técnica consiste em coletar oócitos da fêmea doadora, e em seguida, tais estruturas são cultivadas, fecundadas com o sêmen de um determinado

animal, e os embriões são cultivados *in vitro*, sendo que após sete dias de cultivo são transferidos para as fêmeas receptoras (Federação da agricultura e pecuária do estado de Minas Gerais, 2013). Tal biotécnica têm sido de grande importância para o melhoramento genético animal e alcançou um nível de desenvolvimento tecnológico que permitiu sua aplicação comercial em rebanhos bovinos (RHEINGANTZ, 2005). Atualmente, a técnica de OPU é o método mais utilizado para obtenção de oócitos para PIV, visando complementar os programas convencionais de superovulação e TE.

O número de embriões produzidos no país, de 2003 a 2012, passou de 50 mil para 400 mil em uma década. Os dados referentes à produção e TE em 2013 confirmaram tendências de crescimento observadas anteriormente, ano em que foi comunicada a produção de 416.970 embriões bovinos no Brasil. Mundialmente, o número total de embriões produzidos (coletados *in vivo* e produzidos *in vitro*) entre 2008 e 2012 teve um aumento de 5,8% e entre 2012 e 2013 o aumento foi de 11,6%, chegando ao total de 1.275.874 embriões (Sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 2015). No ano de 2015, o Brasil aumentou sua produtividade para 450.000 embriões bovinos através da técnica de PIV (Sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 2015). Na PIV de embriões bovinos, o Brasil tornou-se líder mundial, sendo atualmente responsável pela produção de 70% dos embriões produzidos no mundo.

Em 2005, houve um grande pico na produção sul americana de embriões coletados *in vivo* que foi de 150.424 embriões. Dentro do cenário sul americano e mundial, o Brasil se destaca como o quinto maior produtor mundial de embriões coletados *in vivo*, com 50.455 embriões transferíveis coletados em 2013, mesmo com uma pequena queda de 1% em relação a 2012. O número total de embriões produzidos *in vivo* no Brasil (66% em bovinos de corte e 34% em bovinos de leite) corresponde a 6% do total mundial (Sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 2015). Com relação aos embriões produzidos por OPU/PIV, a produção de embriões *in vitro* encontra-se em plena ascensão. Desta forma, estratégias que possam incrementar a produção de embriões *in vitro* tornam-se de grande interesse.

### **2.3 Efeitos dos AGPI na performance reprodutiva de fêmeas bovinas**

A suplementação lipídica em animais ruminantes é uma prática comum para aumentar a densidade energética da dieta, sendo bastante utilizada em bovinos de leite, uma vez que a gordura apresenta uma quantidade 2,25 vezes maior de conteúdo energético quando comparada aos carboidratos (REDDY et al., 1994; SIMAS, 1998). Entretanto, além de fornecer energia, determinados tipos de lipídios são capazes de modificar alguns eventos fisiológicos reprodutivos específicos (FUNSTON, 2004; RAES et al., 2004).

Atualmente, muitos estudos tem enfatizado em bovinos a importância da inclusão na dieta de duas famílias de ácidos graxos essenciais (AGE) que estão envolvidas na reprodução, o ômega 3 (n-3) tendo como principal representante o ácido linolênico (ALA) e o ômega 6 (n-6), sendo o principal o ácido linoleico (AL). Os mesmos são denominados AGE, pois devem ser obtidos a partir da dieta fornecida, uma vez que o organismo é incapaz de produzi-los, devido à falta da enzima dessaturase apropriada (SANTOS et al., 2008a). Em geral, as sementes oleaginosas são ricas em AGPI, e sendo assim, maiores quantidades de lipídios podem ser fornecidas pela adição de gorduras ou sementes oleaginosas na dieta.

Entretanto, a maior dificuldade para o estudo dos efeitos dos AGPI sobre a reprodução em bovinos é a incapacidade em prever a disponibilidade dos mesmos para absorção no intestino delgado, e sua distribuição pelo organismo do animal. No fornecimento de AGPI, deve-se considerar que a atividade de biohidrogenação exercida pela microbiota ruminal reduz drasticamente a quantidade de AGPI que alcança o intestino delgado, local de absorção dos mesmos (SANTOS et al., 2008b). De fato, foi demonstrado em estudos que mais de 70% do AL e mais de 85% do ALA ingerido por vacas em lactação foi biohidrogenado no rúmen quando fornecido na forma de gordura não protegida (JUCHEM et al., 2010).

Os AGPI são capazes de modificar algumas vias específicas e influenciar o metabolismo de alguns hormônios esteróides e eicosanóides que

modulam vários processos nos ovários e útero, além de exercer efeitos diretos na transcrição de genes que codificam proteínas essenciais à reprodução. O efeito dos AGPI fornecidos na dieta sobre a reprodução pode ser parcialmente mediado por alterações na composição desses ácidos graxos no fluido folicular e no microambiente que cerca o complexo *cumulus*-oócitos durante o desenvolvimento e maturação do folículo (CHILDS et al., 2008a, FOULADINASHTA et al., 2009). De maneira geral, relata-se que a inclusão de uma dieta suplementada com AGPI (FERGUSON, 1991), altera o número e o tamanho de folículos ovarianos (BILBY et al., 2006; LUCY et al., 1991; ROBINSON et al., 2002); o tamanho do CL (BILBY et al., 2006; RAES et al., 2004); a qualidade oocitária (CERRI et al., 2009b; CHILDS et al., 2008a; KIM et al., 2001; KOJIMA et al., 1997; ZERON et al., 2002), quantidade e qualidade de embriões produzidos (THANGAVELU et al., 2007) e promove a diminuição dos sinais luteolíticos durante o reconhecimento materno da gestação (MATTOS et al., 2000). Além disso, também se observou que fêmeas bovinas suplementadas com AGPI apresentaram modificações na concentração circulante de prostaglandina e hormônios esteróides (CHILDS et al., 2008b; PETIT, 2003; RYAN et al., 1992).

Em relação aos efeitos que os AGPI podem promover no microambiente uterino, Petit e Twagiramungu (2006); Williams e Stanko (1999) e Staples et al. (1998) sugerem que a suplementação com AGPI promove um atraso na luteólise por inibir a síntese de  $PGF2\alpha$ . Alguns estudos reportam a possibilidade de controlar os eventos reprodutivos através de manipulações da dieta, visto que controlando os ingredientes da dieta pode-se alterar a composição lipídica do útero, tornando-o menos luteolítico (LOPES, 2009; MATTOS et al., 2000, 2002, 2004; PETIT et al., 2004; ROBINSON et al., 2002; STAPLES, 2009; THATCHER et al., 1997; WILKINS et al., 1996).

Além disso, a adição de gordura nas dietas tem mostrado consistentes aumentos no colesterol plasmático e no colesterol contido no conteúdo folicular

e luteal (LAMMOGLIA et al., 1996; RYAN et al., 1992; STAPLES et al., 1998; WILLIAMS, 1989). O colesterol serve como precursor para a síntese de progesterona (P4) nas células ovarianas (GRUMMER; CARROLL, 1991). Os mecanismos pelos quais a suplementação melhora o desempenho reprodutivo também parecem envolver o aumento nas concentrações de P4 circulante e na vida útil do CL (LAMMOGLIA et al., 1996; RYAN et al., 1992; WILLIAMS, 1990). Especula-se que a suplementação com AGPI, aumenta a pulsatilidade do hormônio luteinizante- LH (HIGHTSHOE et al., 1991), com consequente aumento no tamanho do folículo pré-ovulatório e subsequente CL formado (RAES et al., 2004) ou diminui o metabolismo hepático dos hormônios esteróides, inclusive P4 (HAWKINS et al., 1995). Outras possibilidades de ação dos AGPI seriam o aumento das concentrações circulantes de colesterol, precursor da síntese de esteróides (THOMAS et al., 1997) e/ou a inibição da síntese de prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ), desta forma preservando o CL (CHILDS et al., 2008b; PETIT; TWAGIRAMUNGU, 2006). Relata-se ainda que os AGPI promovam a formação de um CL maior, com um maior acúmulo de lipídios nas células luteais observado após microscopia eletrônica. Assim, pode-se esperar que ocorra uma maior produção de P4 (BILBY et al., 2006).

No entanto, informações adicionais sobre a influência da suplementação da dieta com AGPI e sua interferência na fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas, ainda necessitam ser melhor compreendidas.

## **2.4 Efeitos da suplementação lipídica em oócitos e embriões**

Em nível celular, os lipídios funcionam como uma fonte de energia e são componentes críticos para a estrutura física e funcional das células. O conteúdo e a composição de lipídios em oócitos e embriões podem influenciar sua competência (SANTOS et al., 2008b). O *status* energético do animal está ligado à maturação folicular e a ovulação (SANTOS et al., 2008b), considerando que a energia fornecida pela suplementação com gordura



aumenta a produção de propionato no rúmen, a gliconeogênese hepática, a produção de insulina e o fator de crescimento semelhante á insulina tipo 1-IGF-1 (NOGUEIRA, 2008a). A glicose tem um efeito positivo sobre a secreção do LH (FUNSTON, 2004), aumentando a frequência de pulsos de LH e dessa forma o crescimento e maturação folicular (MATTOS et al., 2000). A insulina e o IGF-1 agem no folículo dominante estimulando a esteroidogênese e a proliferação das células da granulosa (ARMSTRONG et al., 2002). O aumento das concentrações de glicose tem um papel importante em mediar o crescimento folicular, aumentando o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a aquisição da competência oocitária, o que resulta em aumento da viabilidade embrionária (COYNE et al., 2011).

Os AG são utilizados como fonte de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (FERGUSON; LEESE, 2006), até o estágio de 8 a 16 células, período que em bovinos corresponde à ativação do genoma do próprio embrião e início da síntese de transcritos (LIM et al., 1999). Entretanto, a suplementação com AGPI não altera a composição de ácidos graxos nos oócitos (STURMEY et al., 2009), ou das membranas celulares (ZERON et al., 2001). Atualmente, acredita-se que os AGPI atuem regulando o momento da retomada da maturação nuclear do oócito e a expansão das células do *cumulus*, eventos críticos para o desenvolvimento oocitário e fertilização (MAREI et al., 2010).

Os lipídios constituem uma importante fonte de energia durante a maturação do oócito, estruturação celular, fertilização e clivagem embrionária. Os AGPI são usados como fonte de energia pelo oócito durante os processos de maturação citoplasmática e nuclear (KIM et al., 2001; STURMEY et al., 2009), bem como durante o desenvolvimento embrionário até à implantação.

A maior parte dos lipídios intracelulares sintetizados em oócitos e embriões bovinos são os triacilgliceróis, que correspondem a 50% da massa lipídica total em embriões produzidos *in vivo*. No entanto, essa proporção pode alcançar até 88% da massa de lipídios em embriões PIV (PEREIRA et

al., 2008). Assim os AGPI compreendem menos de 20% do total de AG, sendo o ácido linoleico conjugado (CLA), da família n-6, o mais abundante deles (SANTOS et al., 2008b). O acúmulo lipídico intracitoplasmático funciona como um reservatório potencial de energia para o desenvolvimento embrionário inicial, antes da ativação do próprio genoma embrionário (KIM et al., 2001; STURMEY et al., 2009; ZERON et al., 2001).

A presença de CLA durante a maturação *in vitro* (MIV) também afeta a competência do oócito bovino e posterior desenvolvimento dos embriões (LAPA et al., 2011). Da mesma forma, os efeitos positivos foram relatados na maturação dos oócitos e subsequente desenvolvimento embrionário precoce após a adição de concentrações apropriadas de AL no meio de maturação (MAREI et al., 2009). Este cenário reflete um efeito acelerador dos AGPI sobre eventos associados à maturação oocitária, o que resulta em melhor potencial de desenvolvimento e qualidade embrionários (MAREI et al., 2009).

Os embriões possuem uma grande necessidade por AGE (HAGGARTY et al., 2006), o que poderia explicar a melhoria da qualidade dos embriões e o desenvolvimento embrionário (CERRI et al., 2004; RYAN et al., 1992; THANGAVELU et al., 2007). Childs et al. (2008a) relataram que novilhas alimentadas com uma dieta rica em AGPI n-3 exibiu redução no número de embriões degenerados. Além disso, Thangavelu et al. (2007) observaram embriões com maior número de blastômeros de vacas holandesas suplementadas com ALA ou AL.

Relativamente, poucos trabalhos avaliaram o efeito dos AGPI na produção e desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* (BADER et al., 2005; CERRI et al., 2009b; CHILDS et al., 2008a; KOJIMA et al., 1997; PETIT et al., 2008; RYAN et al., 1992; THANGAVELU et al., 2007) e alguns resultados são contraditórios, pois na maioria das vezes é impossível distinguir o nível de impacto dos AGPI sobre os oócitos ou embriões (LEROY et al., 2010). Além disso, se desconhece se os AGPI são mais importantes para o embrião em si ou para sua implantação (PETIT et al., 2008), pois podem reduzir a síntese de

PGF2 $\alpha$  endometrial e auxiliar o embrião a produzir interferon- tau (IFNT), bem como alterar o ambiente do oviduto e do útero. Esses efeitos dos AGPI contribuem para o desenvolvimento embrionário, redução na morte embrionária e consequente estabelecimento da prenhez (BINELLI et al., 2001; CHILDS et al., 2008a; MATTOS et al., 2004). A maior parte dos estudos foram realizados em bovinos leiteiros e, em razão das diferenças na ingestão de matéria seca e no nível de produção de leite, os resultados dessas pesquisas tornam-se limitados nas fêmeas destinadas á produção de carne (FUNSTON, 2004).

## **2.5 Aplicação prática da suplementação lipídica em programas de produção de embriões bovinos**

Em estudos prévios realizados por este grupo (CORDEIRO et al., 2015), observou-se que a taxa de concepção foi aumentada em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol durante 22 dias a partir da IATF (47,8% vs. 66,7%). Desta forma, verificou-se um incremento de 18,9% nas taxas de concepção quando tal suplementação foi aliada a IATF. Wilkins et al. (1996) alimentaram vacas de corte com uma dieta de caroço de algodão descascado, tratado com formol. Tal dieta era rica em AL protegido, que escapa a biohidrogenação ruminal. As taxas de concepção no primeiro (61 vs. 46%) e segundo (71 vs. 56%) ciclo estral foram maiores para as vacas que receberam a dieta rica em AL.

Lopes et al. (2009) forneceram Megalac-E durante o início do protocolo de sincronização do estro até 28 dias após IATF em vacas Nelore lactantes, e observaram taxas de prenhez superiores, em relação ao grupo não suplementado (51,2% vs. 39,6%, respectivamente). No mesmo estudo, o Megalac-E foi fornecido a receptoras de embriões (n = 435) do final do protocolo de sincronização até 21 dias após a TETF e verificou-se uma diferença de 11,9% entre os grupos, o que representou um aumento de 31,5% na taxa de concepção nas receptoras suplementadas (49,6% vs. 37,7%).

Esses autores verificaram que os AGPI possuem efeito pós IA ou TE, provavelmente durante o período de luteólise.

Em alguns estudos, verificou-se uma melhoria na quantidade ou qualidade dos embriões após a suplementação com os AGPI (FOULADI-NASHTA et al., 2009). Em complemento, em outros estudos, observou-se uma redução no número de embriões degenerados (CHILDS et al., 2008a) e melhoria na produção de blastocistos (FOULADI-NASHTA et al., 2007, THANGAVELU et al., 2007). Thangavelu et al. (2007) suplementaram vacas Holandesas (n=24) em lactação com dietas contendo ácidos graxos saturados (SAT; ricos em ácidos palmítico e esteárico) ou linhaça inteira (FLX; ricos em ácido  $\alpha$ -linolênico) ou sementes de girassol (SUN; ricos em AL). As vacas foram suplementadas durante 20 dias, e não houve efeito da dieta sobre o número médio de folículos, CL, oócitos e embriões totais, embriões transferíveis e taxa de fertilização. No entanto, a taxa de recuperação (número de oócitos recuperados após punção de uma determinada quantidade de folículos) foi mais elevada nas vacas do grupo SUN e o número total de blastômeros foram aumentados. Quando todas as categorias de embriões foram consideradas, os embriões coletados de vacas alimentadas com SAT tinham menos blastômeros do que os de vacas alimentadas com FLX ou SUN. No entanto, as diferenças foram claramente evidentes na fase de blastocisto expandido, onde os embriões de vacas alimentadas com FLX ou SUN tiveram maior número de blastômeros do que os de vacas alimentadas com SAT. Portanto, os autores concluíram que as dietas enriquecidas com AGPI, por meio da adição de linhaça ou semente de girassol, acelerou o desenvolvimento embrionário em vacas leiteiras, obtendo embriões com um maior número de blastômeros em comparação com uma dieta enriquecida com ácidos graxos saturados. O reforço do desenvolvimento embrionário foi manifestado por aumentos significativos nos números de blastômeros além da fase de mórula.

Childs et al. (2008a) suplementou novilhas de corte mestiças com palha de cevada ou ração concentrada ou ácido palmítico (n-3). O suplemento n-3 não promoveu efeitos no número de ovulações, número total de embriões não

fertilizados e recuperados e número de embriões de boa qualidade (graus I e II). No entanto, houve uma redução no número de embriões degenerados recuperados de novilhas na dieta com AGPI n-3. Os mesmos autores concluem que a suplementação com n-3 não aumentou a resposta à superovulação e a produção de embriões comparados aos outros tratamentos, entretanto, promoveu uma redução do número de embriões degenerados.

Vários trabalhos utilizaram o produto Megalac® como fonte de gordura empregada na alimentação de bovinos. Este produto, que associa ácidos graxos ao cálcio, também chamado de sais de cálcio, é uma gordura granular composta de sais de cálcio de óleo de palma, contendo ácidos graxos saturados (palmítico e esteárico) e insaturados (ácido linoleico e ácido linolênico). Os ácidos graxos reagem com sais de cálcio, unidos em forma de sal, e são popularmente chamados de sabões de cálcio (ARM; HAMMER, 2006). Fouladi-Nashta et al. (2009) utilizaram vacas da raça Holandesa (n=12) e estas receberam três dietas contendo gordura protegida ruminal (Megalac®), soja ou linhaça como a principal fonte de AG por três períodos de 25 dias. O número de folículos pequenos (< 4 mm), médios (4-10 mm) e grandes (>10 mm) por vaca não diferiram entre os tratamentos. Também não houve diferença de tratamento no número e qualidade dos oócitos produzidos. A taxa de clivagem foi maior (P = 0,029) para oócitos coletados de vacas suplementadas com Megalac® comparada as outras duas dietas. No entanto, a dieta não afetou o rendimento de blastocistos que se desenvolveram a partir do número de oócitos inseminados ou clivados e nem afetou a qualidade embrionária. Não houve efeito de tratamento dietético em proporções de trofotoderma ou massa celular interna (MCI) em células de blastocistos, ou a relação de MCI para trofotoderma. Conseqüentemente, não houve efeito da dieta sobre os números de folículos e desenvolvimento pós-fecundação de oócitos *in vitro*.

Em estudos anteriores de Fouladi-Nashta et al. (2007) com vacas em lactação, a suplementação com sais de cálcio de óleo de palma incrementou o número de oócitos que se desenvolveram até o estágio de blastocisto. Para

tanto, as vacas receberam uma dieta contendo gordura protegida ruminal (Megalac®) na quantidade de 200 g/dia (grupo baixa gordura) ou 800 g/dia (grupo alta gordura) nos dias 40 a 60 pós-parto. Os animais do grupo de baixa gordura tiveram aumento significativo no número de folículos ovarianos pequenos, médios e grandes, e, por conseguinte, mais oócitos foram recuperados comparados ao grupo alta gordura. No entanto, não houve diferença significativa na taxa de recuperação de oócitos entre os dois grupos. Para o grupo alta gordura, a porcentagem de oócitos grau II recolhidos foi mais elevada ( $P = 0,08$ ), os oócitos recuperados tiveram uma taxa de clivagem superior ( $72,0\% \pm 2,2\%$  vs.  $66,6\% \pm 2,1\%$ ;  $P = 0,076$ ) e significativo aumento na taxa de desenvolvimento ( $27,4\% \pm 2,2\%$  vs.  $19,4\% \pm 1,8\%$ ), na produção de blastocisto e no número de embriões clivados ( $38,0\% \pm 2,8\%$  vs.  $29,1\% \pm 2,5\%$  nos grupos alta e baixa gordura, respectivamente). No grupo de alta gordura, observaram-se embriões com maior número total de células, número de células trofodérmicas e células da MCI foram maiores nesse grupo, sugerindo blastocistos de melhor qualidade que podem melhorar o seu subsequente desenvolvimento.

Ácidos graxos não esterificados adicionados durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos teve efeitos sobre a qualidade do embrião. Marei et al. (2009) relataram que o ALA pode aumentar a maturação do oócito bovino e seu potencial de desenvolvimento, melhorando a qualidade dos blastocistos. Ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenoico (EPA) também melhoraram a qualidade do embrião e criotolerância (MARQUES et al., 2010). Vacas de leite alimentadas com sais de cálcio de AL apresentaram maiores porcentagens de embriões de alta qualidade ( $73,5\%$  vs.  $51,5\%$ ,  $P = 0,06$ ) em relação aos animais que receberam sais de cálcio de óleo de palma (CERRI et al., 2009b).

Lapa et al. (2011) demonstrou que a presença de CLA trans-10 cis-12 durante a MIV pode melhorar a competência citoplasmática de oócitos bovinos, aumentando a taxa de blastocistos com morfologia adequada. Esse efeito benéfico foi associado com a presença de trans-10 cis-12 CLA e menores

níveis de AA no perfil de AG de oócitos maturados. No entanto, a melhor qualidade obtida a partir de blastocistos com oócitos suplementados com CLA pode estar relacionada com alterações nos níveis de fatores de crescimento presentes no citoplasma. Esses autores concluem que a presença de CLA durante a maturação interferiu no metabolismo lipídico, melhorando a competência do oócito bovino e desenvolvendo embriões de melhor qualidade. Da mesma forma, os efeitos positivos foram relatados na maturação dos oócitos e subsequente desenvolvimento embrionário precoce após a adição de níveis apropriados de AL no meio de maturação (MAREI et al., 2009).

### III. OBJETIVOS

O objetivo geral foi investigar o efeito da suplementação com semente de girassol no número e qualidade de oócitos cultivados *in vitro*, na taxa de clivagem e no número e qualidade de blastocistos produzidos *in vitro*, provenientes de fêmeas Nelore.

Desta forma tornam-se objetivos específicos avaliar o efeito da suplementação contendo semente de girassol no:

- a) número de folículos visualizados;
- b) número de oócitos aspirados;
- c) taxa de recuperação (porcentagem do número de oócitos aspirados / número de folículos visualizados);
- d) taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados / total de oócitos cultivados);
- e) número de embriões produzidos *in vitro*;
- f) número de blastocistos produzidos *in vitro*;
- g) número de embriões GI e GII produzidos *in vitro*;
- h) taxa de blastocistos (porcentagem de blastocisto geral (grau I + grau II) / total de oócitos cultivados);
- i) taxa de embriões GI e GII (porcentagem de embriões grau I e grau II (mórula a blastocisto eclodido) no D7 / total de oócitos cultivados).



#### **IV. HIPÓTESE**

A hipótese do presente estudo é que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos aumenta o número e a qualidade de oócitos, incrementa as taxas de clivagem e determina um aumento no número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*.

## V. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local do experimento

Este estudo foi conduzido na Fazenda Experimental da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), localizada no município de Presidente Bernardes, estado de São Paulo, Brasil. O processo de maturação de oócitos *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo de embriões *in vitro* foi realizada no Laboratório Quali's *in vitro*, sediado no município de Presidente Prudente, estado de São Paulo, Brasil. As análises das mensurações plasmáticas de lipídios foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Reprodução (LFR), da Universidade de São Paulo-USP, sediado na cidade de Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil. As análises bromatológicas das forragens e suplementos foram realizadas no Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, no Laboratório de Bromatologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. Os procedimentos com os animais foram conduzidos de outubro a dezembro de 2014. Todas as práticas envolvendo os animais foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena (Protocolo nº 14/2013), estado de São Paulo, Brasil.

### 5.2 Animais

Foram utilizadas 30 fêmeas da raça Nelore (*Bos taurus taurus*), das quais três vacas e doze novilhas compuseram o Grupo Controle (Grupo C; n=15) e duas vacas e treze novilhas o grupo tratado com semente de girassol

(Grupo G; n=15). As vacas apresentavam três a quatro anos e as novilhas vinte e dois meses de idade. No D0 (dia de início da suplementação), as fêmeas apresentaram um peso médio  $\pm$  EPM de  $403,8 \pm 20,9$  kg para o Grupo C e  $398,1 \pm 26,7$  kg para o Grupo G. No D56 (dia de término da suplementação), as fêmeas apresentaram um peso médio  $\pm$  EPM de  $422,43 \pm 8,82$  kg no Grupo C e  $406,67 \pm 10,17$  kg no Grupo G. As fêmeas foram avaliadas quanto ao escore de condição corporal (ECC), segundo Houghton et al. (1990), em uma escala de 1 a 5, sendo 1 muito magro; 2 magro; 3 intermediário; 4 gordo e 5 muito gordo. No D0, a média de ECC  $\pm$  EPM foi de  $3,0 \pm 0,0$  para o Grupo C e  $3,0 \pm 0,0$  para o Grupo G e no D56 a média de escore  $\pm$  EPM foi de  $3,0 \pm 0,05$  e  $2,78 \pm 0,05$ , respectivamente para os Grupos C e G. Para a formação dos grupos experimentais, as fêmeas foram divididas equitativamente segundo idade, peso, ECC e condição ovariana, sendo que no primeiro dia do experimento (D0), a condição ovariana (população folicular) foi avaliada de acordo com o número de folículos totais existentes no ovário no momento da primeira aspiração (D0), sendo que para cada 10 folículos aspirados foram computados uma +, os animais variaram de + a +++++. Durante o período experimental, as fêmeas foram mantidas em piquetes de pastagem de estrela africana (*Cynodon nlemfüensis*), delimitados em uma área de 1 hectare/cada, sob lotação rotacionada com três dias de ocupação. Os animais tinham água e suplementação mineral à vontade.

### **5.3 Sincronização da onda de crescimento folicular**

No período compreendido entre cinco e sete dias antes de cada aspiração folicular (D-6, D6, D20, D38, D43, D50), foram aplicadas 0,5 mg de PGF $2\alpha$  (Sincrocio® - Ouro Fino) e 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE-Tecnopec), ambos por via intramuscular, com o intuito de sincronizar a emergência de onda folicular de todas as fêmeas.

#### 5.4 Tratamentos *in vivo*

Os animais do Grupo C (n=15) receberam 1,7 kg/animal/dia de suplemento contendo 53% de farelo de soja e 47% de milho. Os animais do Grupo G (n=15) receberam 1,7 kg/animal/dia de suplemento contendo 40% de farelo de soja e 60% de semente de girassol. Os suplementos para ambos os grupos foi fornecido durante 57 dias a partir do D0. O farelo de soja utilizado na formulação de ambos os suplementos continha 44% de proteína bruta (PB). Os suplementos fornecidos aos dois grupos foram igualmente balanceados em energia e proteína, ambos com 72% de NDT e 24% de PB, porém acrescido ou não com semente de girassol. Durante os dias de suplementação, antes do fornecimento diário do suplemento, as sobras da refeição anterior eram pesadas para mensuração do consumo médio diário de cada grupo ao longo de todo o período de suplementação. O suplemento foi fornecido uma vez ao dia, por volta das 07h00min. Os suplementos foram administrados em cochos com espaço de 33 cm lineares/animal e os piquetes foram alternados entre os grupos para que houvesse a eliminação do efeito do ambiente. Os animais de cada grupo foram intercalados em piquetes com características de produção semelhantes, permanecendo três dias em cada piquete, com o objetivo de reduzir ao máximo o efeito da pastagem. Os animais de ambos os grupos receberam, do D29 ao D57, uma ração comercial para bovinos (Ração Bovinos 18% (Premix Nutrição de Resultados, Presidente Prudente, SP, Brasil), na quantidade de 333,33 g/animal/dia, associado ao suplemento. Tal ração foi adicionada para que o consumo do suplemento fosse garantido. Os procedimentos realizados durante o experimento encontram-se sumarizados na Figura 1.

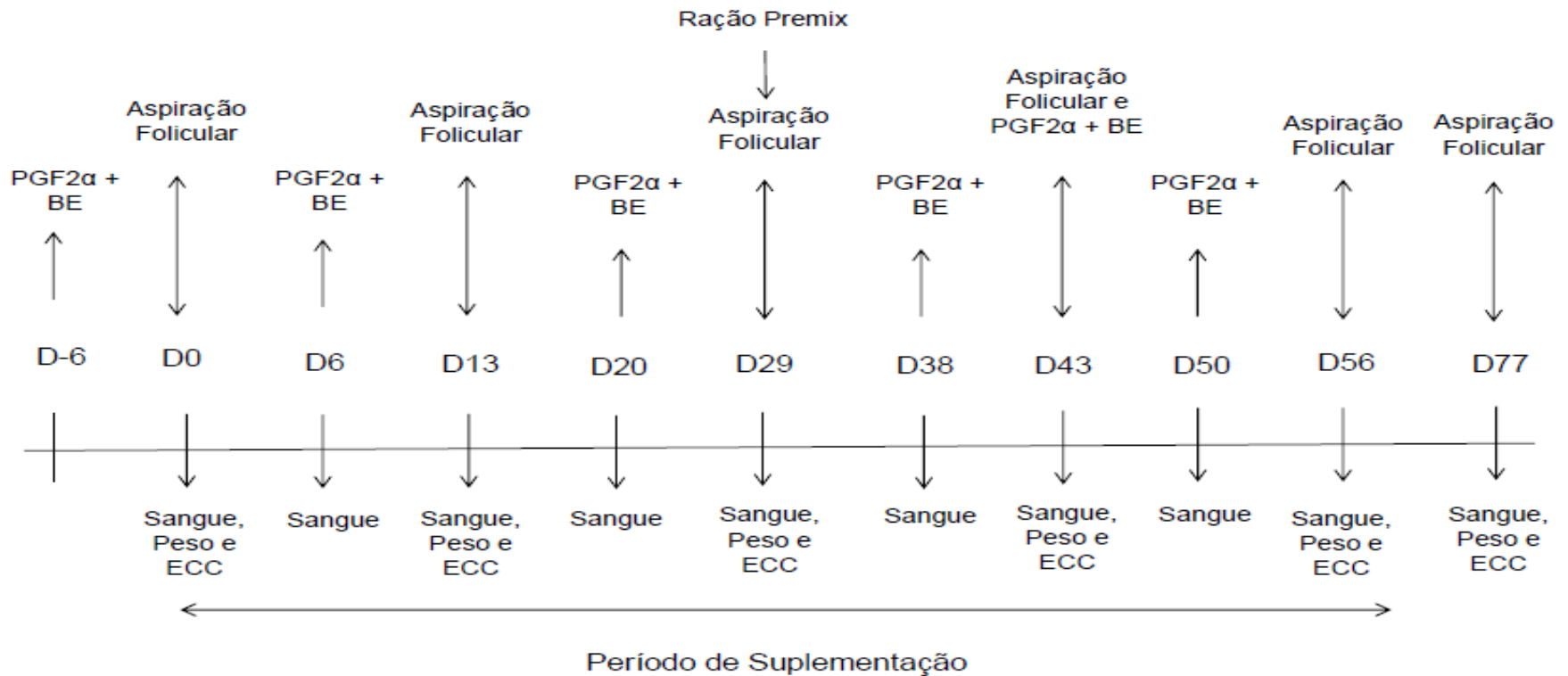


FIGURA 1 – Representação esquemática do delineamento experimental ilustrando os respectivos dias de OPU, aplicação de PGF2 $\alpha$  e BE, coletas de sangue e o período de suplementação. A OPU ocorreu em 6 momentos diferentes (D0, D13, D29, D43, D56 e D77), e em torno de 5 a 7 dias antes de cada aspiração, foram aplicados 0,5 mg de PGF2 $\alpha$  e 2 mg de BE (D-6, D6, D20, D38, D43 e D50), para sincronizar a emergência de onda folicular. As fêmeas foram reavaliadas quanto ao peso e ao escore de condição corporal nos mesmos dias em que foram realizadas as aspirações foliculares, e as coletas de sangue foram realizadas no D0, D6, D13, D20, D29, D38, D43, D50, D56 e D77. No D29 houve mudança na dieta, com inclusão da ração para bovinos da Premix, para ambos os grupos de tratamento.

### 5.5 Aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU)

De cinco a sete dias após a aplicação de cada injeção de  $\text{PGF2}\alpha$  e BE foi realizada a OPU. Imediatamente antes da aspiração folicular, foi procedida à aplicação de 0,1 g de lidocaína injetável (Lidovet®, Laboratório Bravet Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com 5 mg de Acepromazina (Acepran 1,0%, Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda) no espaço intervertebral, ambos administrados pela via peridural. Em seguida, foi realizada a avaliação da população folicular ovariana (contagem da população folicular) com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia (Aloka, modelo SSD-500, Berger Distribuidora Aloka para Brasil), com transdutor de aspiração folicular (Aloka, modelo 981, Eletromed representações T). Todos os folículos maiores do que 5 mm visualizados nos ovários foram puncionados para obtenção dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs). Para tanto, foi utilizado um cateter (Jelco) 18G acoplado à sonda convexa transvaginal, com bomba de sucção a vácuo, 100 mmHg/min (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil, modelo BV 003), produzindo um fluxo de 15 mL/min. O conteúdo folicular foi recuperado a partir de um circuito de Teflon (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil), de 2 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, ligando a agulha a um tubo plástico de 50 mL, contendo 0,5 mL de meio constituído de Tampão fosfato de Dulbecco-salino (DPBS), suplementado com 1% de soro fetal bovino- SFB (Gibco BRL) e 125 UI de heparina sódica/mL (Heparin®, Cristália, Itapira, SP, Brasil), com temperatura entre 35 e 37°C. O material coletado contido no tubo foi depositado em um filtro de coleta de embriões, com malha de 80  $\mu\text{m}$  (Millipore®, Bedford, MA, USA) e lavado com DPBS. Todas as aspirações foram realizadas por um único veterinário.

## 5.6 Identificação dos COCs

Os COCs recuperados no filtro foram transferidos para placas de poliestireno 100 x 20 mm (Corning Incorporated, NY, USA), contendo DPBS suplementado com 1% de SFB e avaliados através de microscópio estereoscópico. Os oócitos foram classificados segundo Lonergan (1992) em cinco grupos de qualidade, onde grau I = células do *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células; grau II = células do *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; grau III = células do *cumulus* presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do *cumulus* e Atrésicos = células do *cumulus* em regressão celular, *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus* oocitário escuro e irregular. Após classificação, os oócitos graus I, II, III e desnudos com citoplasma homogêneo foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199, constituído por TCM-199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e 75 µg de Gentamicina/mL. Posteriormente foram lavados uma vez em meio de maturação B-199, constituído de TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de Gentamicina/mL, 0,5 µg de FSH/mL (Pluset®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI de hCG/mL (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco BRL), antes de serem transferidos para o cultivo de maturação. Todos os meios de cultivo utilizados neste estudo foram produzidos pelo Laboratório Progest® (Progest Biotecnologia em Reprodução Animal, Botucatu- SP, Brasil). Tal procedimento, ao longo de todo o período experimental, foi realizado por um único médico veterinário.

### **5.7 Maturação *in vitro* dos oócitos**

Os oócitos foram maturados em meio TCM-199 com sais de Earles, glutamina e  $\text{NaHCO}_3$ , suplementado com 10% de SFB, piruvato (22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sulfato de amicacina (16,67  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) e 0,5  $\mu\text{g}$  de FSH/mL, 50  $\mu\text{g}$  de LH/mL e 1  $\mu\text{g}$  de estradiol/mL, em microgotas de 100  $\mu\text{l}$  de meio de maturação, cobertas com óleo mineral e levados à incubadora a 38,5 °C, com 5% de  $\text{CO}_2$  em ar e com máxima umidade, durante 22 a 24 horas.

### **5.8 Fertilização *in vitro***

Após o período de maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro*, em microgotas de 100  $\mu\text{l}$  de meio TALP suplementado com heparina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), piruvato (22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sulfato de amicacina (16,67  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), BSA livre de ácidos graxos (6 mg/mL) e solução de PHE (2  $\mu\text{M}$  de penicilamina, 1  $\mu\text{M}$  de hipotaurina e 0,25  $\mu\text{M}$  de epinefrina). Foram utilizados dois touros diferentes da raça Nelore (fertilidade *in vitro* previamente comprovada) para o processo de fertilização *in vitro*. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 35 °C, durante 30 segundos e seu conteúdo centrifugado á 1500 rpm por 8 minutos em gradiente de Percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozoides móveis. Em seguida, foram centrifugados em meio FIV, por 3 minutos a 900 rpm, para remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração espermática foi de  $2 \times 10^6$  espermatozoides vivos/mL e os oócitos foram transferidos para as microgotas (de 25 a 30 oócitos/gota) contendo os espermatozoides, onde permaneceram sob incubação em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$  em ar a 38,5 °C, por um período de 18 a 20 horas.

### **5.9 Cultivo de embriões *in vitro***



Após os processos de MIV e FIV, os prováveis zigotos tiveram as células do *cumulus* removidas parcialmente, onde permaneceram poucas monocamadas de células da granulosa; e foram cultivados *in vitro* em meio SOF (“synthetic oviduct fluid”) suplementado com 0,5% de SFB (livre de ácidos graxos), piruvato (22 µg/mL) e sulfato de amicacina (16,67 µg/µl). Decorridas 72 horas pós-inseminação (hpi), ou seja, no D3, foi verificada a taxa de clivagem. Os oócitos não clivados, ou seja, aqueles oócitos que não foram fertilizados e que não continuaram seu desenvolvimento embrionário e se degeneraram após a fertilização foram retirados, e o meio de cultivo foi renovado (*feeding*). Foi realizado um segundo “*feeding*” 144 hpi (D6). O estágio de desenvolvimento embrionário, incluindo a classificação de mórulas, blastocistos iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos foi avaliado de acordo com Lindner e Wright Júnior (1983), nos dias seis e sete após a fertilização. A qualidade dos embriões foi avaliada segundo Kennedy et al. (1983). Os embriões permaneceram incubados em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, a 38,5 °C. Todos os processos de PIV de embriões, incluindo MIV, FIV e cultivo *in vitro* foram realizados por uma única técnica.

### **5.10 Coleta de sangue**

Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia caudal mediana no D0 (dia do início da suplementação); D6, D13, D20, D29, D38, D43, D50, D56 (último dia de suplementação); e por fim, no D77, onde os animais não estavam mais sendo suplementados. O sangue foi coletado utilizando-se agulha de calibre 21G x 1” (BD Vacutainer®, REF 360212), e foi dispensado em um tubo de vidro de 4 ml com vácuo (Vacutainer; Labor Import, São Paulo, SP, Brasil) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio (EDTA), com sal tripotássico de EDTA. Imediatamente após a coleta, o sangue foi delicadamente homogeneizado com a solução de EDTA e acondicionado em gelo até a centrifugação. Posteriormente, dentro de 2 horas, foi centrifugado

(Centrífuga Marca Centribio, modelo 80-2B), a 2500 rpm por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após este procedimento, o plasma foi transferido para microtubos e acondicionado a -20°C devidamente identificado.

### **5.11 Mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL**

A mensuração das concentrações plasmáticas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram feitas pelo método colorimétrico enzimático, utilizando um kit comercial (Randox CH3810), de acordo com o método descrito por Allain et al. (1974). A determinação das concentrações plasmáticas de triglicerídeos foram realizadas pelo método colorimétrico enzimático, utilizando um kit comercial (Randox TR3823), de acordo com a técnica descrita por Fossati e Prencipe (1982). Para todas as análises, as amostras foram mensuradas em duplicata.

### **5.12 Coleta das amostras de forragem e suplementos**

Foram coletadas amostras do pasto por meio da simulação de pré-pastejo para ambos os grupos, de acordo com o método proposto por Sollenberger e Cherney (1995). As amostras foram coletadas pelo método “*hand-plucking*”, na qual a forragem é colhida manualmente após uma prévia observação do hábito de pastejo dos animais (ANDRADE, 2003). Cada amostra de forragem foi pesada e homogeneizada. Posteriormente, retirou-se de cada amostra duas subamostras para determinação de matéria seca e da composição morfológica, separando a forragem em folhas verdes, folhas senescentes e secas, colmo verde, e colmo seco mais material morto. As subamostras foram secadas em estufa de circulação de ar a 65°C, por no mínimo 72 horas e após este procedimento foram pesadas. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo *Wiley* (Marconi®, Equipamentos para

laboratórios Ltda, Piracicaba, SP, Brasil), com peneira de malha de 1 mm. As amostras dos suplementos que foram fornecidas aos animais foram coletadas nos dias D0, D6, D14, D20, D29, D35, D42, D48 e D56, foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em local de baixa umidade e protegidas da luz solar. Posteriormente, foram encaminhadas para as análises bromatológicas.

### **5.13 Análises bromatológicas**

As amostras de forragem de simulação do pré-pastejo e dos suplementos foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), e nutrientes digestíveis totais (NDT); segundo método proposto por Van Soest (1994), sendo os valores corrigidos para 100% de MS a 100 °C por 24 horas (SILVA; QUEIROZ, 2002).

### **5.14 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico MIXED procedure do SAS (SAS, 2003; SAS Institute, Cary, NC, USA), versão 9.2. Foi realizado o teste ANOVA (modelo misto), com uma estrutura paramétrica especial sobre as matrizes de covariância. Foram utilizadas como covariáveis no modelo: ECC, peso, número de folículos visualizados, número de oócitos aspirados, taxa de recuperação (porcentagem do número de oócitos aspirados / número de folículos visualizados), taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados / total de oócitos cultivados), número de embriões, número de blastocistos, número de embriões grau I e II, taxa de blastocistos (porcentagem de blastocisto geral (grau I + grau II) / total de oócitos cultivados) e taxa de embriões GI e GII (porcentagem de embriões grau I e grau II (módulo

a blastocisto eclodido) no D7 / total de oócitos cultivados). O modelo incluiu interação entre grupos, interação entre tempo (dias) e interação entre grupos x tempo (dias). As variáveis foram testadas quanto à normalidade utilizando o artifício “Guided Data Analysis” do SAS, e quando necessário, foram transformadas conforme a sugestão do programa para alcançar a normalidade. Em relação ao ECC, taxa de recuperação, HDL e LDL, os dados não foram transformados, pois seguiram a normalidade. O peso, número de oócitos aspirados, taxa de clivagem, colesterol total e triglicerídeos foram transformados por ranqueamento (Rank). O número de embriões, taxa de clivagem e embriões de grau I e II foram transformados por raiz quadrada. O número de blastocistos e a taxa de blastocistos foram transformados em logaritmo (Log). Os resultados serão apresentados com médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) não transformados. Em todas as análises considerou-se um nível de significância de 5%, onde diferenças com probabilidades (P) < 0,05 foram consideradas significativas.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Ganho de peso

Conforme ilustrado na Figura 2, para o peso vivo (kg) das fêmeas, ao longo do período de suplementação, não foi observado efeito de grupo. Observou-se um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ) e uma interação entre grupo x tempo ( $P < 0,03$ ). No D43, houve uma diferença significativa ( $P < 0,048$ ) em relação ao grupo x tempo, onde verificou-se que o peso do Grupo C ( $412,5 \pm 20,1$  kg) foi maior que o Grupo G ( $391,0 \pm 22,1$  kg).

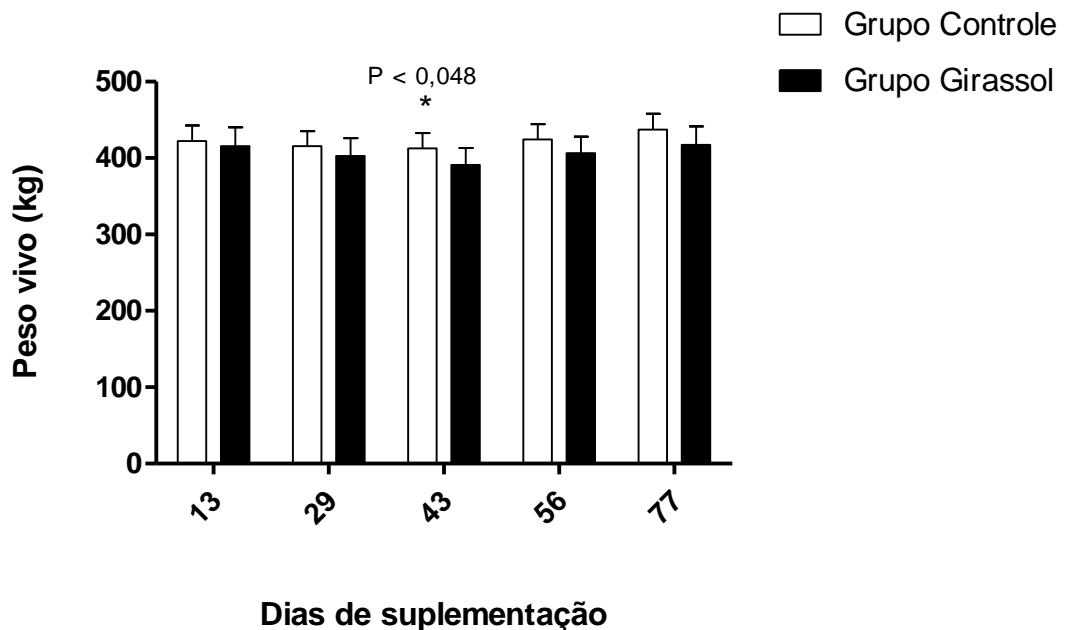


FIGURA 2 - Peso Vivo (kg) nos diferentes dias de suplementação, em fêmeas bovinas Nelore (n=30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ) e uma interação entre os grupos de tratamento vs. os dias de suplementação ( $P < 0,03$ ).

(\*) Diferença significativa ( $P < 0,048$ ) no D43 entre grupos e dia de suplementação.

Conforme ilustrado na Figura 3, para o efeito de tempo, considerando o peso médio de todos os animais independente do tratamento, no D77 (427,33 ± 15,7 kg) o peso foi maior que no D13 (418,97 ± 15,75 kg) e D56 (415,47 ± 14,66 kg). No D13 e D56, o peso médio dos animais foi maior que no D29 (409,2 ± 14,96 kg). O peso médio no D29 foi maior que no D43 (401,77 ± 14,84 kg). Os dados estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

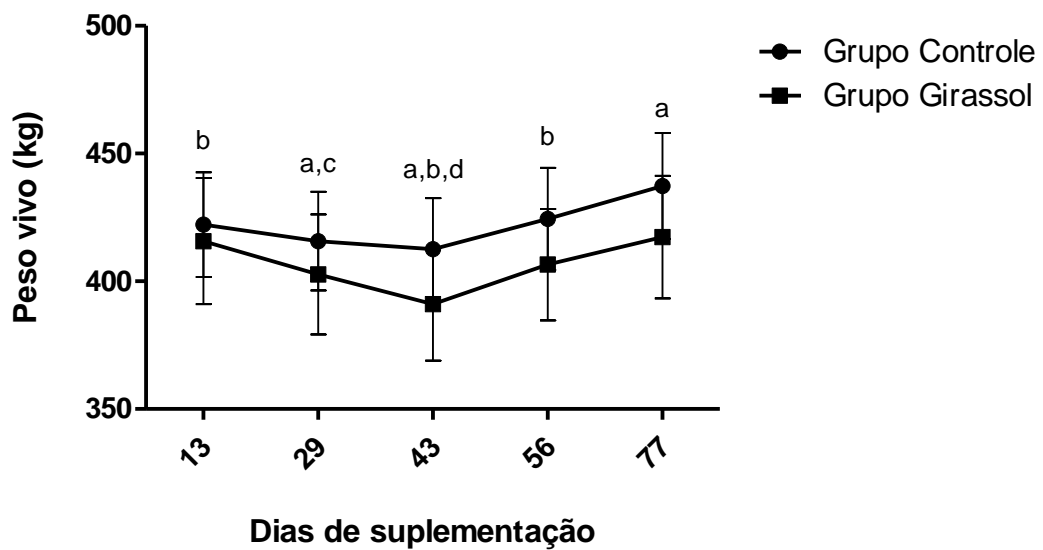


FIGURA 3 – Peso Vivo (kg) dos animais em relação ao tempo, em cada dia de suplementação para fêmeas bovinas Nelore (n=30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes nas respectivas linhas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que o peso foi maior no D77 (427,33 ± 15,7 kg) do que nos demais dias de suplementação.

TABELA 3 – Médias  $\pm$  EPM para as diferentes variáveis analisadas no experimento em relação aos diferentes dias em que foram realizadas aspirações foliculares (OPU), para fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7kg de suplemento contendo ou não semente de girassol

Variáveis	Grupo Controle (n=15)					Grupo Girassol (n=15)				
	D13	D29	D43	D56	D77	D13	D29	D43	D56	D77
Peso Vivo (kg)	422,2 $\pm$ 20,5	415,7 $\pm$ 19,3	412,5 $\pm$ 20,1	424,4 $\pm$ 20,0	437,3 $\pm$ 20,8	415,7 $\pm$ 24,7	402,7 $\pm$ 23,5	391,0 $\pm$ 22,1	406,5 $\pm$ 21,8	417,3 $\pm$ 24,0
ECC	3,3 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	2,9 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,1
Nº de folículos vis.	14,5 $\pm$ 2,7	11,8 $\pm$ 1,8	19,7 $\pm$ 3,0	17,6 $\pm$ 3,0	20,6 $\pm$ 3,8	12,0 $\pm$ 3,5	10,8 $\pm$ 2,0	22,9 $\pm$ 4,2	14,9 $\pm$ 2,6	19,9 $\pm$ 3,2
Nº de oócitos asp.	14,0 $\pm$ 2,7	10,7 $\pm$ 1,8	15,7 $\pm$ 2,3	14,5 $\pm$ 2,8	14,0 $\pm$ 2,9	12,2 $\pm$ 3,5	10,2 $\pm$ 1,8	18,3 $\pm$ 3,7	11,1 $\pm$ 2,2	13,5 $\pm$ 2,1
% de recuperação	0,96 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,07	0,95 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,08	0,70 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,06
% de clivagem	73,8 $\pm$ 4,0	79,8 $\pm$ 2,5	80,8 $\pm$ 3,3	74,4 $\pm$ 4,3	72,9 $\pm$ 3,2	70,6 $\pm$ 6,7	82,6 $\pm$ 2,5	72,2 $\pm$ 6,4	73,8 $\pm$ 5,5	69,3 $\pm$ 7,6
Nº de embriões	10,3 $\pm$ 1,9	8,7 $\pm$ 1,6	13,1 $\pm$ 2,1	11,1 $\pm$ 2,6	10,7 $\pm$ 2,3	8,9 $\pm$ 2,5	8,5 $\pm$ 1,6	14,0 $\pm$ 3,0	8,7 $\pm$ 1,9	10,3 $\pm$ 1,9
Nº de blastocistos	10,3 $\pm$ 1,9	8,7 $\pm$ 1,6	13,1 $\pm$ 2,1	11,1 $\pm$ 2,6	10,7 $\pm$ 2,3	8,9 $\pm$ 2,5	8,5 $\pm$ 1,6	14,0 $\pm$ 3,0	8,7 $\pm$ 1,9	10,3 $\pm$ 1,9
Nº embriões GI e GII	5,6 $\pm$ 1,4	4,1 $\pm$ 1,2	7,3 $\pm$ 1,4	5,2 $\pm$ 1,9	5,3 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 1,7	4,2 $\pm$ 1,3	4,4 $\pm$ 1,2
% de blastocistos	42,8 $\pm$ 6,9	32,3 $\pm$ 6,5	48,6 $\pm$ 4,4	33,2 $\pm$ 5,2	36,6 $\pm$ 6,4	23,6 $\pm$ 8,2	30,8 $\pm$ 5,9	31,4 $\pm$ 5,2	30,8 $\pm$ 6,3	30,0 $\pm$ 6,6
% embriões GI e GII	36,7 $\pm$ 6,0	29,9 $\pm$ 6,3	45,8 $\pm$ 3,6	31,4 $\pm$ 4,8	35,4 $\pm$ 6,1	22,5 $\pm$ 7,8	25,9 $\pm$ 5,7	28,0 $\pm$ 5,2	29,7 $\pm$ 6,1	26,9 $\pm$ 5,8

Os dados são a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

TABELA 4 – Médias  $\pm$  EPM das variáveis observadas durante o experimento em relação ao peso, ECC, nº de folículos visualizados, nº de oócitos aspirados, taxa de clivagem, nº de embriões, nº de blastocistos, nº de embriões GI e GII, taxa de blastocistos e taxa de embriões GI e GII para fêmeas Nelore suplementadas ou não, e os valores de P considerando grupo, tempo e a interação entre grupo x tempo

Variáveis	Controle	Girassol	P-valor		
			Grupo	Tempo	G X T
Peso	422,43 $\pm$ 8,82	406,67 $\pm$ 10,17	0,21	<0,0001	0,03
ECC	3,0 $\pm$ 0,05	2,78 $\pm$ 0,05	0,01	<0,001	0,0509
Nº de folículos visualizados	16,8 $\pm$ 1,32	16,1 $\pm$ 1,48	0,2	<0,0001	0,34
Nº de oócitos aspirados	13,8 $\pm$ 1,27	13,05 $\pm$ 1,25	0,53	0,0002	0,22
% de recuperação	82 $\pm$ 1%	80 $\pm$ 2%	0,83	<0,0001	0,17
% de clivagem	76,32 $\pm$ 1,58	76,78 $\pm$ 2,11	0,4	0,37	0,69
Nº de embriões	10,79 $\pm$ 0,94	10,08 $\pm$ 1,01	0,58	0,0023	0,7378
Nº de blastocistos	5,89 $\pm$ 0,66	4,48 $\pm$ 0,6	0,96	0,19	0,31
Nº de embriões GI e GII	5,49 $\pm$ 0,64	4,17 $\pm$ 0,57	0,22	0,002	0,37
% de blastocistos	38,71 $\pm$ 2,68	30,53 $\pm$ 2,89	0,26	0,95	0,03
% de embriões GI e GII	35,83 $\pm$ 2,47	27,72 $\pm$ 2,74	0,31	0,99	0,02

Considerou-se um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 6.2 Escore de condição corporal

Conforme representado na Figura 4, para o ECC houve efeito de grupo ( $P < 0,0096$ ), tempo ( $P < 0,001$ ) e efeito da interação entre grupo x tempo ( $P = 0,0509$ ). Para o efeito de interação entre os grupos x tempo, se observou maior ECC para o Grupo C nos dias D13, D43 e D56 (3,3  $\pm$  0,2; 2,9  $\pm$  0,1 e 3,0  $\pm$  0,0; respectivamente) quando comparado ao Grupo G (2,9  $\pm$  0,2; 3,0  $\pm$  0,0 e 3,0  $\pm$  0,0; respectivamente); não tendo havido efeito no D29 e no D77 para o Grupo C (2,8  $\pm$  0,1; 3,0  $\pm$  0,0; respectivamente) e para o Grupo G (2,8  $\pm$  0,3; 3,1  $\pm$  0,1; respectivamente). O ECC foi maior no Grupo C para os dias D13 ( $P < 0,005$ ), D43 ( $P < 0,05$ ) e D56 ( $P < 0,026$ ).



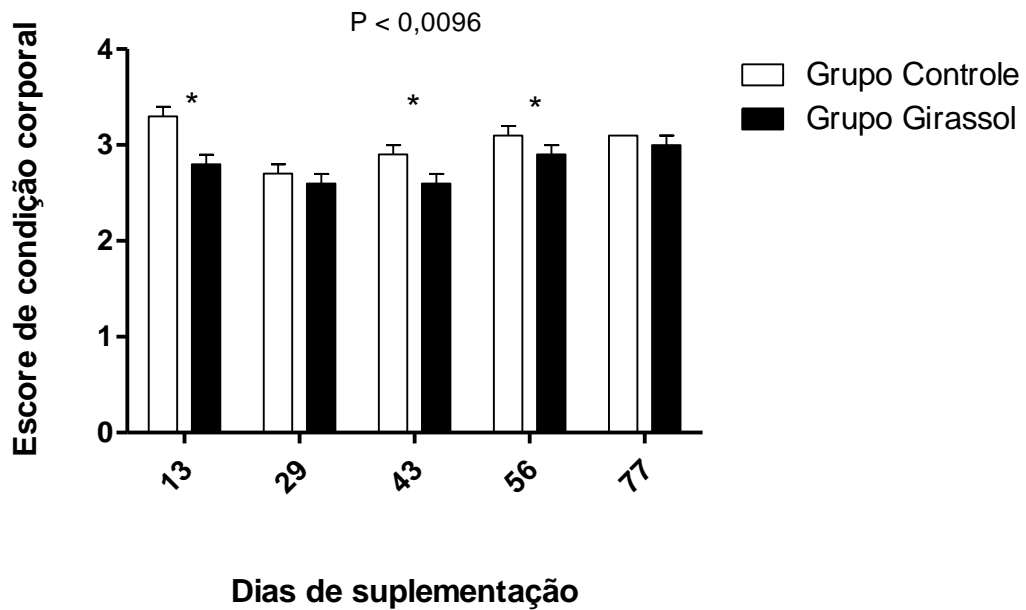


FIGURA 4 – Escore de condição corporal (escala de 1 a 5) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de grupo ( $P < 0,0096$ ), efeito de tempo ( $P < 0,001$ ) e uma interação entre os grupos de tratamento vs. os dias de suplementação ( $P = 0,0509$ ).

(\*) Diferença significativa entre os grupos de tratamento, onde o ECC foi maior no Grupo C em 3 momentos: D13 ( $P < 0,005$ ), D43 ( $P < 0,05$ ) e D56 ( $P < 0,026$ ).

Conforme representado na Figura 5, para o efeito de tempo, houve maior ECC nos dias D13 ( $3,07 \pm 0,1$ ), D56 ( $2,99 \pm 0,64$ ) e D77 ( $3,05 \pm 0,06$ ) quando comparado aos dias D29 ( $2,62 \pm 0,06$ ) e D43 ( $2,73 \pm 0,08$ ), para ambos os grupos. Para o efeito de grupo, a média geral do Grupo C foi maior que a média do Grupo G ( $3,0 \pm 0,05$  vs.  $2,78 \pm 0,05$ , respectivamente).

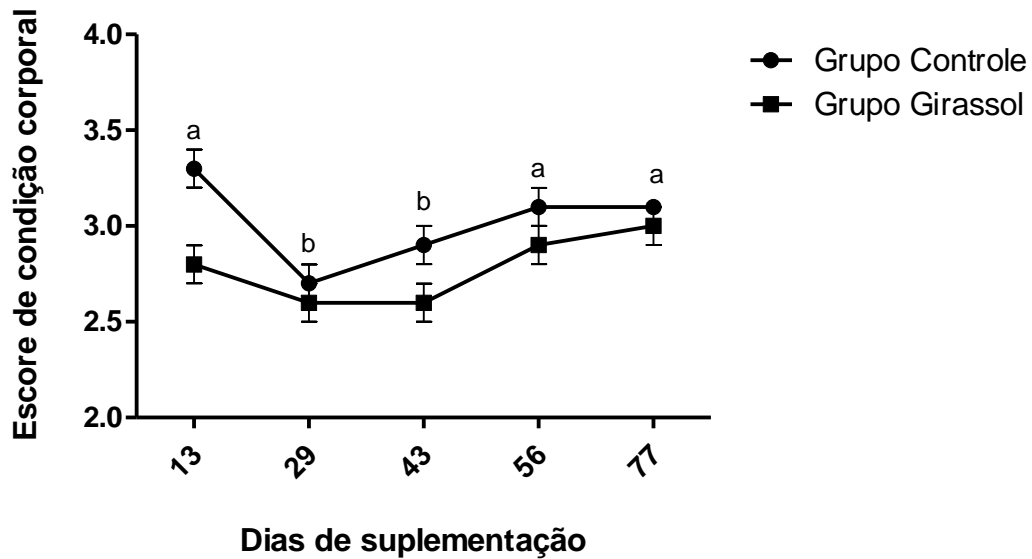


FIGURA 5 – Escore de condição corporal (escala de 1 a 5) em relação ao tempo, de cada grupo em cada dia de suplementação, para fêmeas bovinas Nelore ( $n = 30$ ) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas linhas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve uma diferença significativa entre os grupos de tratamento em relação ao tempo, onde observa-se um maior ECC nos dias D13 ( $3,07 \pm 0,1$ ), D56 ( $2,99 \pm 0,64$ ) e D77 ( $3,05 \pm 0,06$ ) do que nos demais dias de suplementação, para ambos os grupos.

### 6.3 Número de folículos visualizados, número de oócitos aspirados e taxa de recuperação oocitária

Conforme ilustrado na Figura 6, para o número de folículos visualizados, não se observou efeito de grupo, entretanto, observou-se um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ). Verificou-se número maior de folículos visualizados no D43 ( $21,33 \pm 2,54$ ) e D77 ( $20,26 \pm 2,41$ ) quando comparado aos demais dias. Nos dias D13 ( $13,26 \pm 2,17$ ) e D29 ( $11,30 \pm 1,32$ ), as médias foram menores quando comparadas ao D56 ( $16,26 \pm 1,96$ ), para ambos os grupos de tratamento.

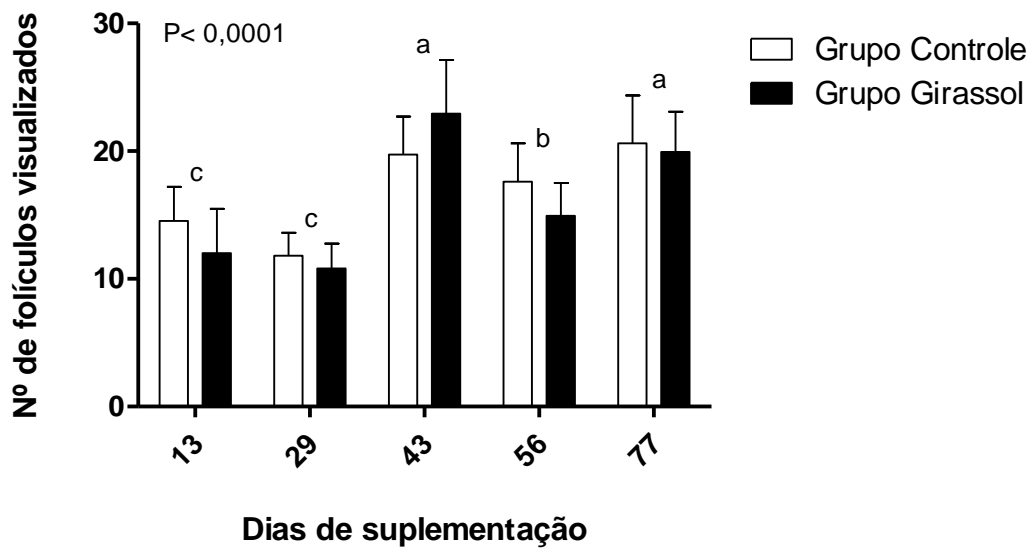


FIGURA 6 – Número de folículos visualizados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ).

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve uma diferença significativa entre os grupos de tratamento em relação ao tempo, observando-se um maior número de folículos visualizados nos dias D43 ( $21,33 \pm 2,54$ ) e D77 ( $20,26 \pm 2,41$ ) do que nos demais dias de suplementação, para ambos os grupos.

Conforme demonstrado na Figura 7, em relação ao número de oócitos aspirados, não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento, pois as médias foram semelhantes para o Grupo C ( $13,8 \pm 1,27$ ) e G ( $13,05 \pm 1,25$ ). Entretanto, houve efeito de tempo ( $P < 0,0002$ ), onde a média do número de oócitos aspirados no D43 ( $17,0 \pm 2,17$ ) foi maior que nos demais dias avaliados para ambos os grupos. A média do D77 ( $13,77 \pm 1,79$ ) foi maior do que nos dias D13 ( $13,1 \pm 2,17$ ), D29 ( $10,47 \pm 1,26$ ) e D56 ( $12,8 \pm 1,79$ ).

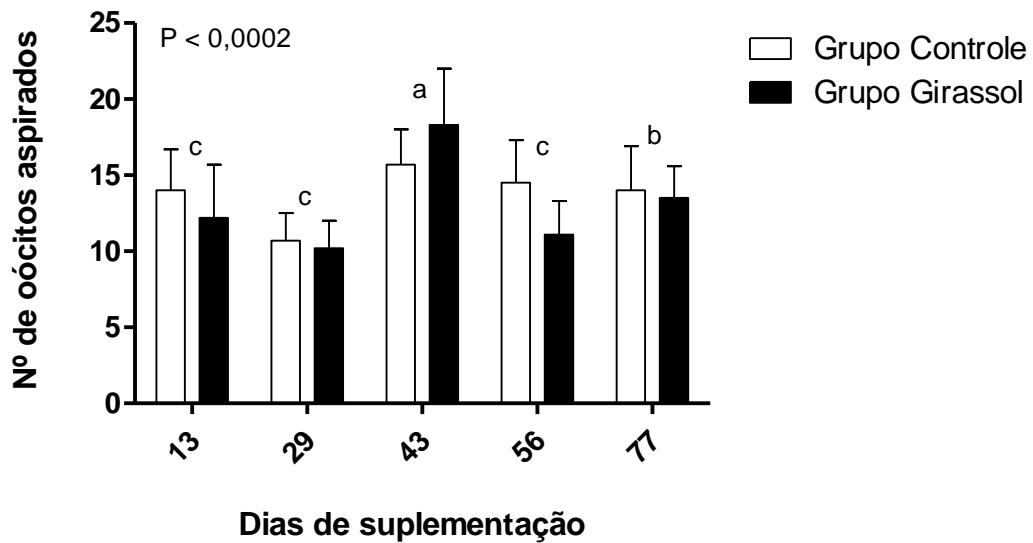


FIGURA 7 – Número de oócitos aspirados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de tempo ( $P < 0,0002$ ).

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve uma diferença entre os grupos de tratamento em relação ao tempo, observando-se um maior número de oócitos aspirados no D43 ( $17,0 \pm 2,17$ ) do que nos demais dias de suplementação, para ambos os grupos.

Conforme ilustrado na Figura 8, quanto à taxa de recuperação (número de oócitos aspirados / número de folículos visualizados), não houve efeito de grupo, entretanto, houve um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ), havendo uma maior taxa de recuperação para os dias D13 ( $95 \pm 0,3\%$ ) e D29 ( $92 \pm 1\%$ ), do que para os dias D43 ( $77 \pm 4\%$ ), D56 ( $75 \pm 2\%$ ) e D77 ( $65 \pm 3\%$ ), independente do grupo de tratamento.

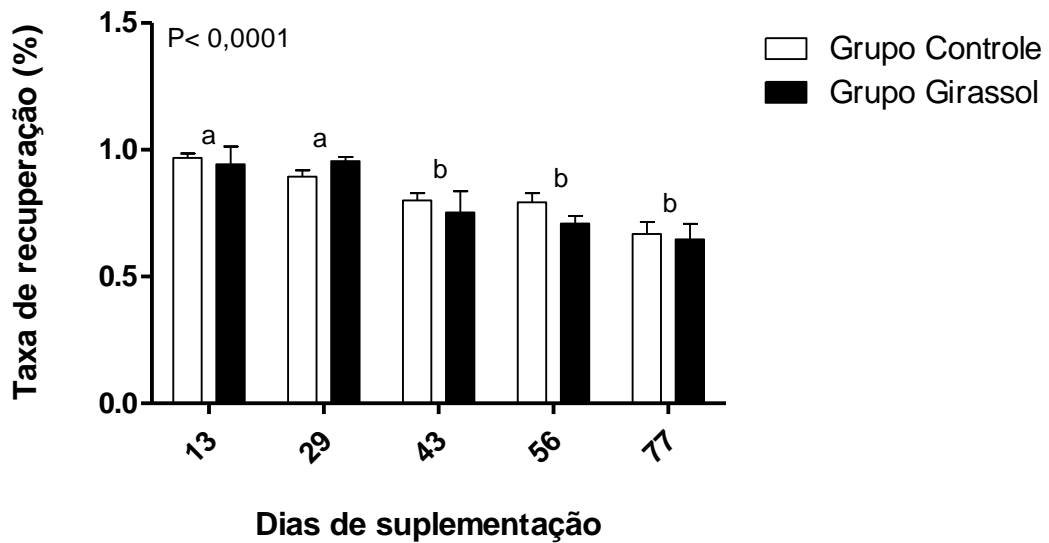


FIGURA 8 – Taxa de recuperação dos oócitos cultivados em relação aos folículos aspirados em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve uma diferença entre os grupos de tratamento em relação ao tempo, observando-se uma maior taxa de recuperação nos dias D13 ( $95 \pm 0,3\%$ ) e D29 ( $92 \pm 1\%$ ), do que nos demais dias de suplementação.

#### 6.4 Taxa de clivagem

De acordo com a Figura 9, na taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados / total de oócitos cultivados), não houve efeito de grupo, efeito de tempo e interação entre os grupos x tempo. Ambos os grupos (Grupo C e G) apresentaram médias semelhantes ( $76,32 \pm 1,58\%$  vs.  $76,78 \pm 2,11\%$ ; respectivamente).

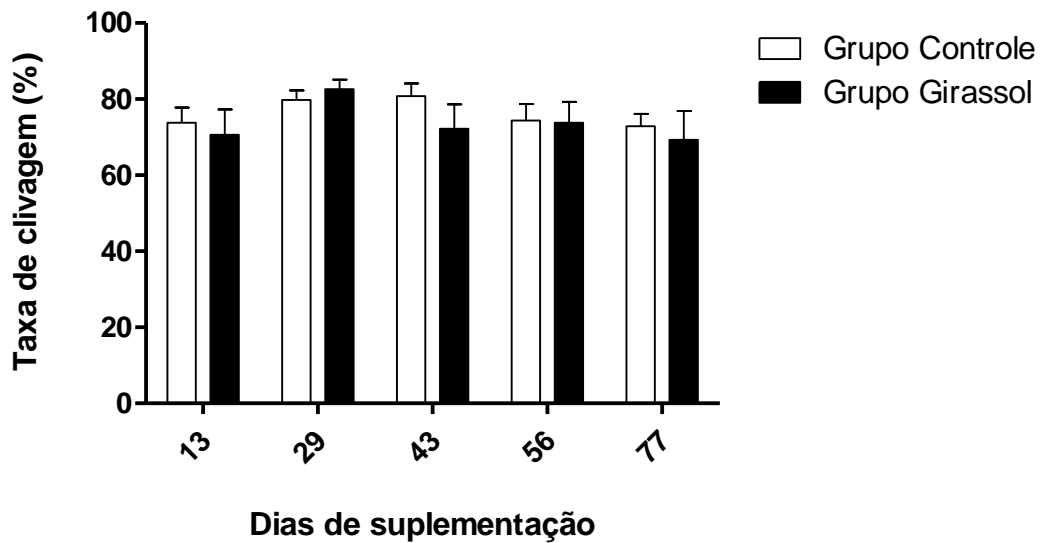


FIGURA 9 – Taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

### 6.5 Número de embriões produzidos *in vitro*

Conforme ilustrado na Figura 10, em relação ao número de embriões produzidos *in vitro*, as médias de ambos os grupos não diferiram significativamente, sendo  $10,79 \pm 0,94$  para o Grupo C e  $10,08 \pm 1,01$  para o Grupo G. Entretanto, houve efeito de tempo, onde se observou um aumento ( $P < 0,0023$ ) no número de embriões produzidos no D43 ( $13,53 \pm 1,8$ ) quando comparado aos dias D13 ( $9,6 \pm 1,57$ ); D29 ( $8,63 \pm 1,11$ ); D56 ( $9,9 \pm 1,6$ ) e D77 ( $10,5 \pm 1,48$ ), independente dos grupos de tratamento. Para os demais dias, as médias para o número de embriões produzidos não foram diferentes.

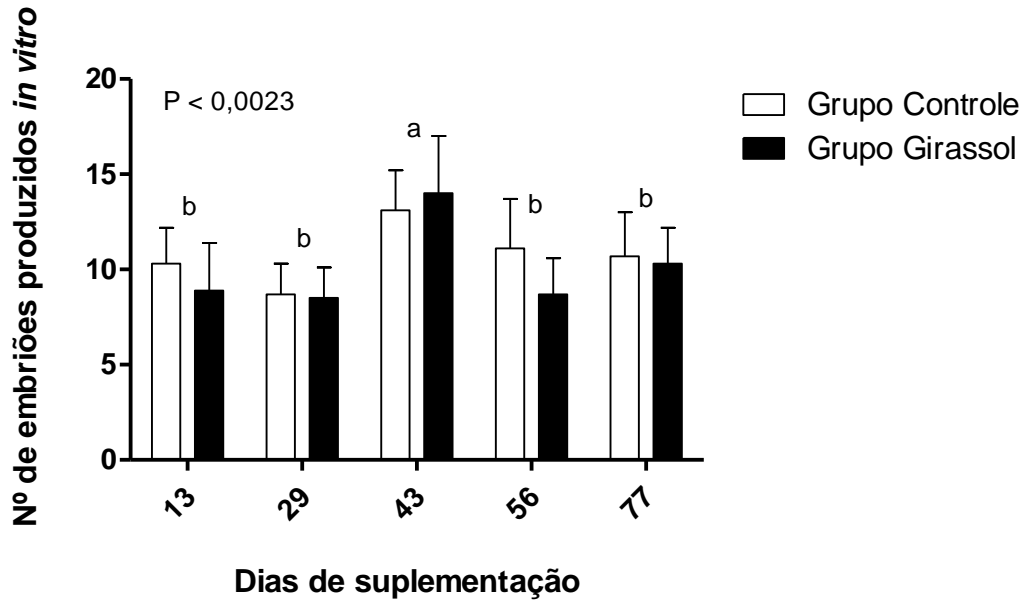


FIGURA 10 – Número de embriões produzidos *in vitro* em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de tempo (P < 0,0023).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve uma diferença entre os grupos de tratamento em relação ao tempo, observando-se um maior número de embriões produzidos *in vitro* no D43 (13,53 ± 1,8) do que nos demais dias de suplementação.

### 6.6 Número de blastocistos produzidos *in vitro*

Como ilustrado na Figura 11, para o número de blastocistos produzidos *in vitro*, não houve diferença significativa dos grupos de tratamento entre a média do Grupo C e G considerando todos os dias de suplementação (5,89 ± 0,66 vs. 4,48 ± 0,6, respectivamente). Também não houve efeito de tempo e interação entre os grupos x tempo.

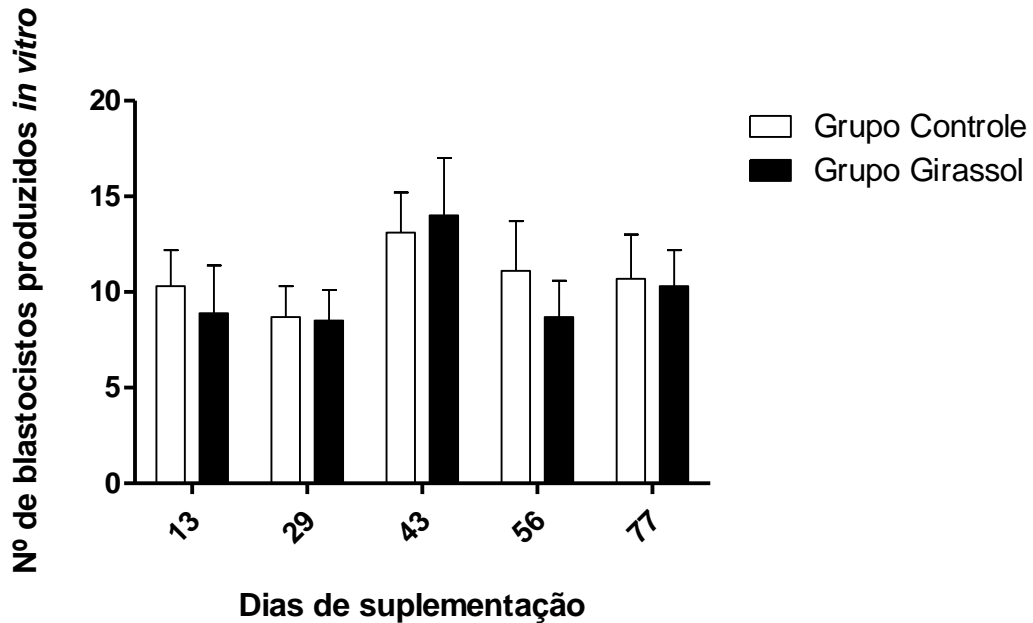


FIGURA 11 – Número de blastocistos em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

### 6.7 Número de embriões GI e GII produzidos *in vitro*

Como ilustrado na Figura 12, em relação ao número de embriões grau I e II produzidos, as médias dos grupos C e G não diferiram significativamente, sendo de  $5,49 \pm 0,64$  vs.  $4,17 \pm 0,57$ ; respectivamente. Entretanto, houve um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ), onde o número de embriões grau I e II produzidos no D43 ( $6,67 \pm 1,1$ ) foi maior quando comparado ao D13 ( $4,1 \pm 0,84$ ), D29 ( $3,83 \pm 0,79$ ), D56 ( $4,7 \pm 1,16$ ) e D77 ( $4,87 \pm 0,85$ ), para ambos os grupos de tratamento.



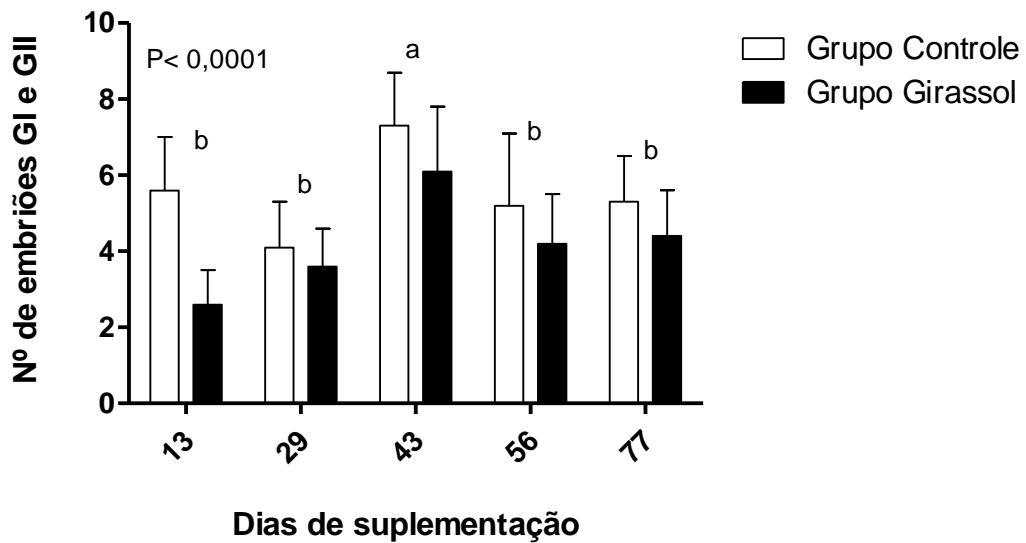


FIGURA 12 – Número de embriões GI e GII produzidos *in vitro*, em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de tempo ( $P < 0,0001$ ).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas colunas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve uma diferença entre os grupos de tratamento em relação ao tempo, observando-se um maior número de embriões GI e GII produzidos *in vitro* no D43 ( $6,67 \pm 1,1$ ) do que nos demais dias de suplementação.

### 6.8 Taxa de blastocistos

Como ilustrado na Figura 13, para a taxa de blastocistos, não houve efeito de tratamento e nem de tempo, entretanto, houve um efeito de interação entre os grupos x tempo ( $P < 0,03$ ). Comparando-se os grupos nos diferentes dias, a diferença foi significativa ( $P < 0,02$ ) apenas no D43 para o Grupo C, que apresentou uma média  $\pm$  EPM de  $48,6 \pm 4,4\%$ . O Grupo G não apresentou efeito nenhum ao longo do tempo, ou seja, se comportou da mesma maneira, apresentando uma média  $\pm$  EPM de  $31,4 \pm 5,2\%$ .

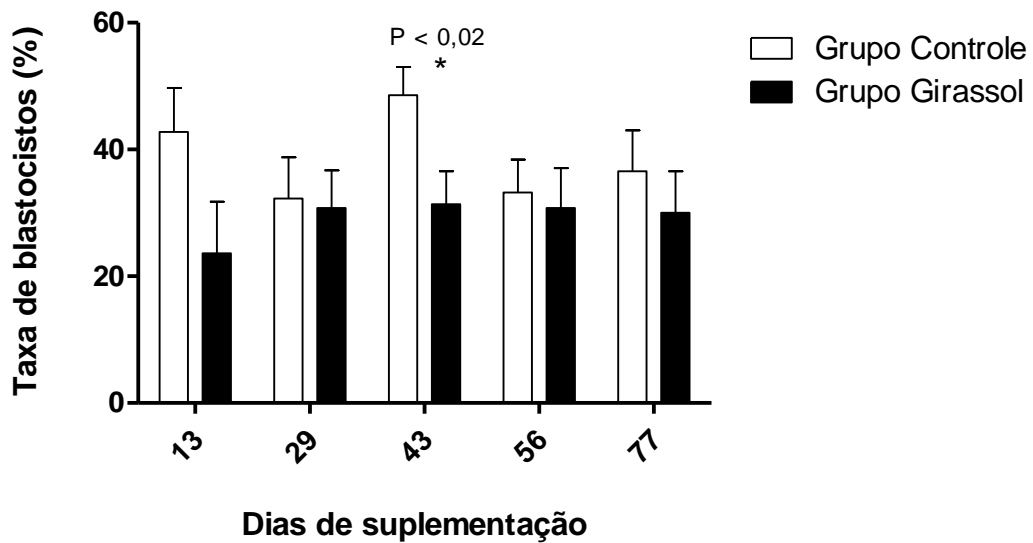


FIGURA 13 – Taxa de blastocistos (porcentagem de blastocisto geral (grau I + grau II) / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de interação entre os grupos vs. tempo (P < 0,03).

(\*) Diferença significativa (P < 0,02) na taxa de blastocistos, onde houve uma maior taxa de blastocistos no D43 para o Grupo C (48,6 ± 4,4%) em relação ao Grupo G (31,4 ± 5,2%).

### 6.9 Taxa de embriões graus I e II

Conforme ilustrado na Figura 14, para a taxa de embriões GI e GII, não houve efeito de grupo e de tempo. Entretanto, houve interação entre os grupos x tempo (P < 0,02), onde se observou que no Grupo G não houve efeito ao longo do tempo, enquanto no Grupo C houve diferença significativa no D43 (P < 0,016), ou seja, houve uma maior taxa de embriões GI e GII neste dia em relação aos demais dias de suplementação, apresentando uma média ± EPM de 45,8 ± 3,6%; enquanto o grupo G apresentou uma média ± EPM no D43 de 28,0 ± 5,2%.

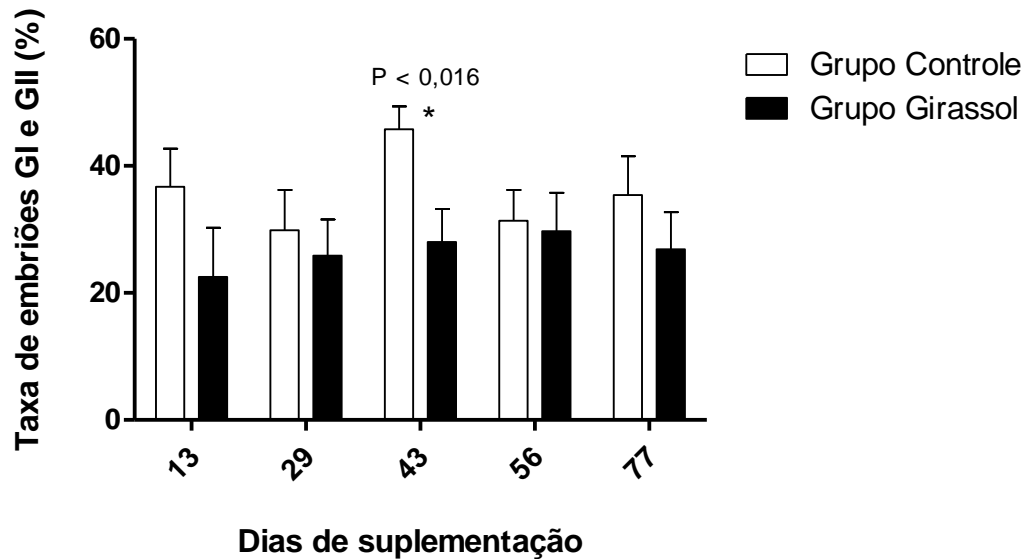


FIGURA 14 – Taxa de embriões GI e GII (porcentagem de embriões Grau I e Grau II (mórula a blastocisto eclodido) no D7 / total de oócitos cultivados) em fêmeas bovinas Nelore (n = 30) suplementadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de interação entre os grupos vs. tempo (P < 0,02).

(\*) Diferença significativa (P < 0,016) na taxa de embriões GI e GII, onde houve uma maior taxa no D43 para o Grupo C (45,8 ± 3,6%) em relação ao Grupo G (28,0 ± 5,2%).

### 6.10 Avaliação das concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL

Conforme representado na Figura 15, não foram observados efeitos de grupo e nem interação entre os grupos x tempo. As concentrações plasmáticas de colesterol total no D6, D13, D20, D29, D38, D43, D50, D56 e D77 para o Grupo Controle foram 79,14 ± 2,88; 89,51 ± 4,30; 81,12 ± 3,01; 92,17 ± 4,37; 98,20 ± 3,52; 82,36 ± 2,16; 81,46 ± 2,69; 81,55 ± 3,47 e 86,30 ± 3,27 mg/dL, respectivamente. Para o Grupo Girassol foram de 83,71 ± 3,24; 92,81 ± 3,53; 83,39 ± 3,73; 89,27 ± 3,81; 92,07 ± 3,89; 85,84 ± 3,21; 86,70 ± 4,28; 82,06 ±

2,69;  $88,12 \pm 3,08$  mg/dL, respectivamente. Não houve diferença significativa em relação às médias  $\pm$  EPM para o Grupo C e para o Grupo G ( $85,76 \pm 1,20$  vs.  $87,11 \pm 1,18$  mg/dL, respectivamente), ou seja, a média geral de ambos os grupos foram semelhantes. Verificou-se que tanto no Grupo Controle como no Girassol houve efeito significativo de tempo ( $P < 0,0003$ ), tendo havido uma maior concentração de colesterol total no D38 ( $95,14 \pm 2,64$  mg/dL) comparados aos dias D6 ( $81,42 \pm 2,17$ ), D13 ( $91,16 \pm 2,75$ ), D20 ( $82,25 \pm 2,36$ ), D29 ( $90,72 \pm 2,86$ ), D43 ( $84,10 \pm 1,93$ ), D50 ( $84,08 \pm 2,53$ ), D56 ( $81,81 \pm 2,16$ ) e D77 ( $87,21 \pm 2,21$ ), independente do grupo de tratamento.

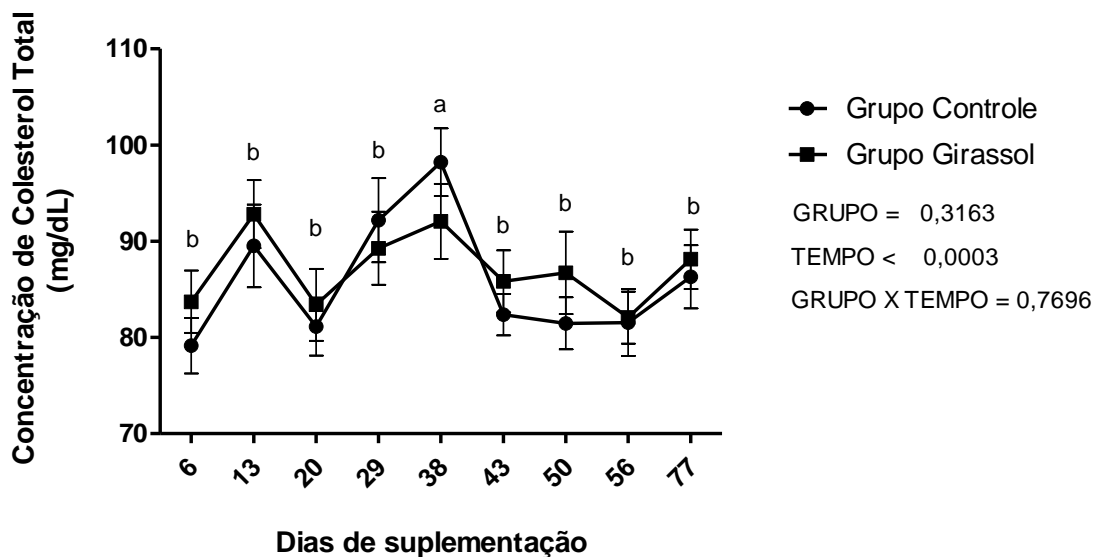


FIGURA 15 – Concentrações plasmáticas de colesterol total (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore ( $n = 30$ ) tratadas com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol durante 57 dias.

Houve um efeito significativo de tempo ( $P < 0,0003$ ).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas linhas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve um efeito em relação ao tempo, observando-se um maior concentração de colesterol total no D38 ( $95,14 \pm 2,64$  mg/dL) do que nos demais dias de suplementação, independente do grupo de tratamento.

Conforme representado na Figura 16, não foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de triglicerídeos entre o Grupo Controle e Girassol ( $14,98 \pm 0,29$  vs.  $14,26 \pm 0,27$  mg/dL, respectivamente). As concentrações plasmáticas de triglicerídeos no D6, D13, D20, D29, D38, D43, D50, D56 e D77 para o Grupo Controle foram  $15,76 \pm 0,70$ ;  $14,54 \pm 1,43$ ;  $15,21 \pm 0,49$ ;  $15,83 \pm 0,98$ ;  $15,53 \pm 0,70$ ;  $13,46 \pm 0,95$ ;  $14,78 \pm 0,62$ ;  $15,22 \pm 0,59$  e  $14,52 \pm 1,16$  mg/dL; respectivamente. Para o Grupo Girassol, as concentrações foram  $14,93 \pm 0,67$ ;  $15,56 \pm 0,97$ ;  $15,16 \pm 0,65$ ;  $15,04 \pm 1,28$ ;  $13,54 \pm 0,61$ ;  $13,68 \pm 0,67$ ;  $13,68 \pm 0,77$ ;  $14,62 \pm 0,48$  e  $12,15 \pm 0,95$  mg/dL, respectivamente. Não houve efeito de grupo e nem interação entre os grupos x tempo. Verificou-se que para ambos os grupos de tratamento, houve um efeito de tempo ( $P= 0,0928$ ), tendo havido uma maior concentração plasmática de triglicerídeos nos dias D6 ( $15,34 \pm 0,48$  mg/dL) e D29 ( $15,43 \pm 0,80$  mg/dL), independente do grupo de tratamento.

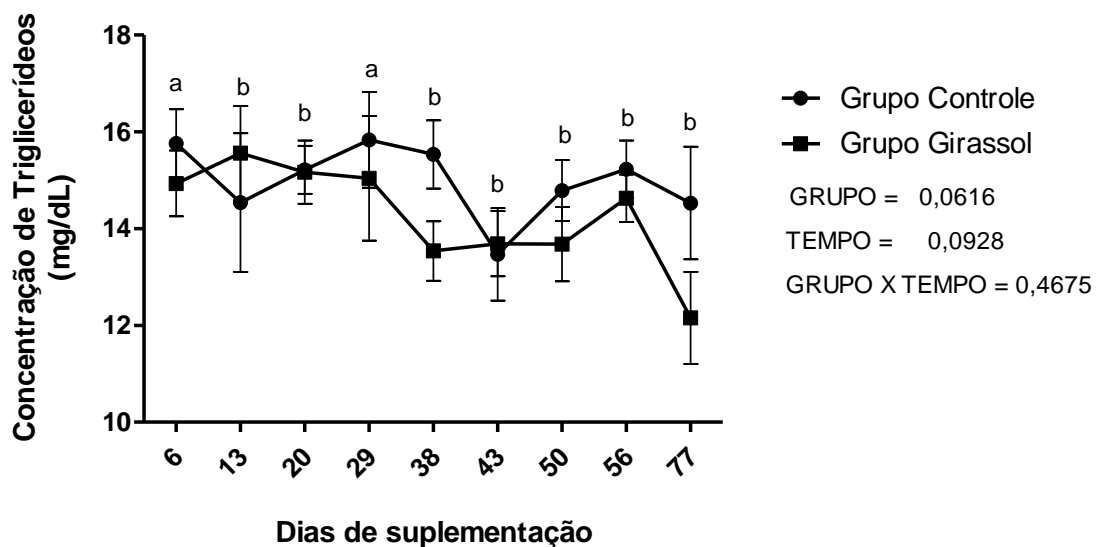


FIGURA 16 – Concentrações plasmáticas de triglicerídeos (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore ( $n = 30$ ) tratadas com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol, durante 57 dias.

Houve um efeito de tempo ( $P= 0,0928$ ).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas linhas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve um efeito em relação ao tempo, observando-se um maior concentração de triglicerídeos nos dias D6 ( $15,34 \pm 0,48$  mg/dL) e D29 ( $15,43 \pm 0,80$  mg/dL) do que nos demais dias de suplementação, independente do grupo de tratamento.

Conforme ilustrado na Figura 17, não foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas médias  $\pm$  EPM das concentrações plasmáticas de HDL entre o Grupo Controle e Girassol ( $35,12 \pm 1,10$  vs.  $35,40 \pm 1,0$  mg/dL, respectivamente). No Grupo Controle, as concentrações plasmáticas de HDL no D6, D13, D20, D29, D38, D43, D50, D56 e D77 foram de  $38,90 \pm 2,64$ ;  $35,44 \pm 3,88$ ;  $29,58 \pm 2,96$ ;  $35,67 \pm 3,97$ ;  $33,44 \pm 3,50$ ;  $35,44 \pm 3,59$ ;  $34,08 \pm 2,63$ ;  $31,53 \pm 3,47$  e  $42,03 \pm 2,67$  mg/dL. No Grupo Girassol, as concentrações foram de  $36,15 \pm 2,99$ ;  $36,61 \pm 3,11$ ;  $33,37 \pm 3,16$ ;  $38,13 \pm 2,89$ ;  $31,86 \pm 3,64$ ;  $35,54 \pm 3,06$ ;  $31,64 \pm 2,29$ ;  $33,94 \pm 2,51$  e  $41,35 \pm 3,24$  mg/dL; respectivamente. Não houve interação entre os grupos  $\times$  tempo. As concentrações plasmáticas de HDL em ambos os grupos apresentaram efeito significativo de tempo ( $P < 0,0406$ ), tendo havido uma maior concentração plasmática de HDL no dia D77 ( $41,69 \pm 2,06$  mg/dL), independente do grupo de tratamento.

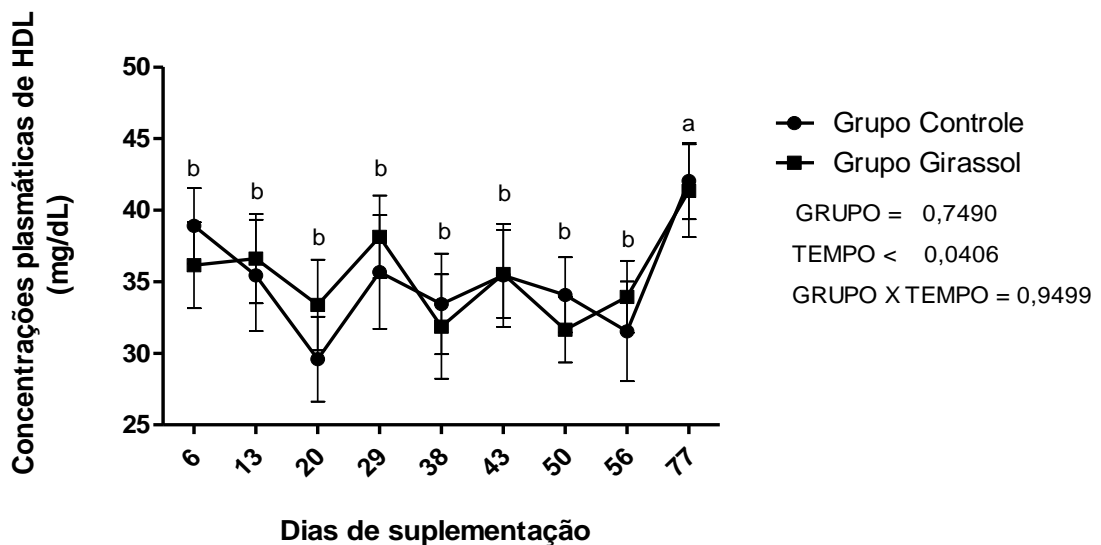


FIGURA 17 – Concentrações plasmáticas de HDL (mg/dL) de fêmeas bovinas Nelore ( $n = 30$ ) tratadas durante 77 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol.

Houve um efeito de tempo ( $P < 0,0406$ ).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas linhas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve um efeito em relação ao tempo, observando-se um maior concentração de HDL no dia D77 ( $41,69 \pm 2,06$  mg/dL) do que nos demais dias de suplementação, independente do grupo de tratamento.

Conforme representado na Figura 18, não foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas médias  $\pm$  EPM das concentrações de LDL entre o Grupo Controle e Girassol ( $47,92 \pm 1,58$  vs.  $48,85 \pm 1,51$ mg/dL, respectivamente). Em ambos os grupos, houve efeito significativo de tempo ( $P < 0,0036$ ). As concentrações de LDL aumentaram no dia D38 ( $59,57 \pm 3,56$  mg/dL), independente do grupo de tratamento. No Grupo Controle, as concentrações plasmáticas de LDL no D6, D13, D20, D29, D38, D43, D50, D56 e D77 foram  $37,08 \pm 4,69$ ;  $51,18 \pm 4,34$ ;  $48,49 \pm 4,48$ ;  $53,34 \pm 5,58$ ;  $61,65 \pm 4,63$ ;  $44,22 \pm 3,98$ ;  $44,42 \pm 4,31$ ;  $49,64 \pm 4,17$  e  $41,35 \pm 4,55$  mg/dL; respectivamente. No Grupo Girassol foram  $44,57 \pm 4,16$ ;  $53,09 \pm 3,73$ ;  $46,97 \pm 4,27$ ;  $48,12 \pm 4,50$ ;  $57,50 \pm 5,52$ ;  $47,54 \pm 5,17$ ;  $52,30 \pm 5,32$ ;  $45,18 \pm 4,12$  e  $44,35 \pm 3,83$  mg/dL; respectivamente. Não houve efeito de grupo e nem interação entre os grupos x tempo.

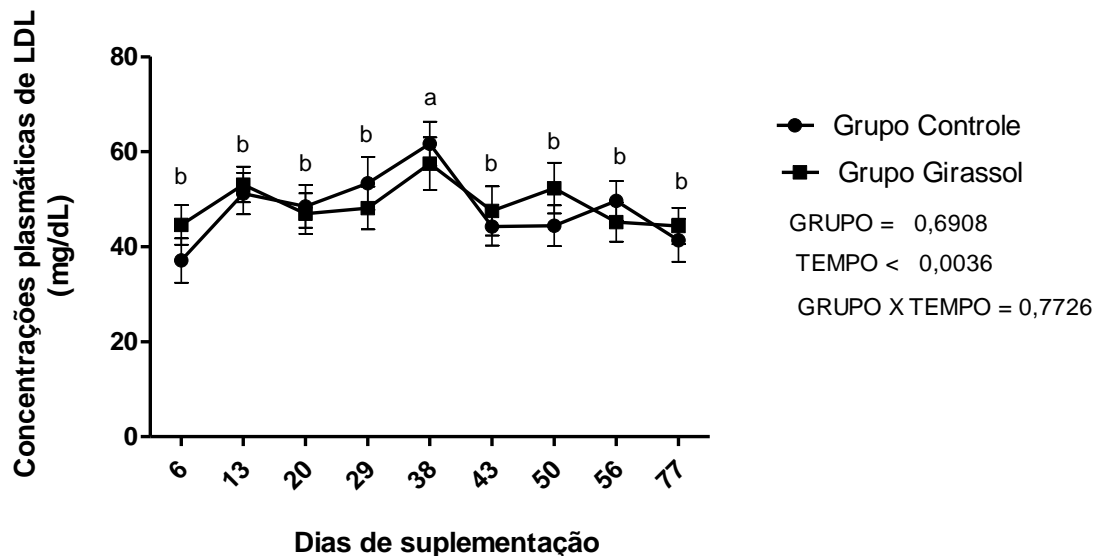


FIGURA 18 – Concentrações plasmáticas de LDL (mg/dL) em fêmeas bovinas Nelore ( $n = 30$ ) tratadas durante 57 dias com 1,7 kg de suplemento contendo ou não semente de girassol. Houve um efeito de tempo ( $P < 0,0036$ ).

<sup>a,b</sup> Letras diferentes nas respectivas linhas ilustram que os valores diferiram estatisticamente, demonstrando que houve uma diferença entre os grupos de tratamento em relação ao tempo, observando-se um maior concentração de LDL no dia D38 ( $59,57 \pm 3,56$  mg/dL), do que nos demais dias de suplementação, independente do grupo de tratamento.

### 6.11 Análises bromatológicas das forragens e suplementos

Conforme representado na Tabela 5, segue a composição das forragens para os Grupos C e G respectivamente: matéria seca (91,6 vs. 91,2), matéria mineral (7,85 vs. 7,35), proteína bruta (14,34 vs. 15,64), Fibra em Detergente Neutro (77,52 vs. 75,27), Fibra em Detergente Ácido (73,97 vs. 72,76), extrato etéreo (2,78 vs. 2,52) e nutrientes digestíveis totais (53,5 vs. 54,1). Quando os suplementos foram avaliados quanto à constituição, verificou-se para os Grupos C e G respectivamente: matéria seca (87,5 vs. 90,5), matéria mineral (5,04 vs. 5,53), proteína bruta (30,91 vs. 31,37) e nutrientes digestíveis totais (83,6 vs. 87,1). Entretanto, pela diferenciada composição de AGPI da semente de girassol, verificou-se para o Grupo C e G respectivamente: Fibra em Detergente Neutro (21,4 vs. 46,68), Fibra em Detergente Ácido (7,02 vs. 38,39) e extrato etéreo (5,7 vs. 24,38). Observou-se que para o suplemento contendo girassol, o teor de FDN foi alto, 46,68% em comparação com 21,40% do Grupo C. O teor de FDN é correlacionado com a capacidade de consumo da dieta, visto que este parâmetro é responsável pelo preenchimento do rúmen.

Tabela 5- Composição bromatológica das amostras de forragens para simulação de pré-pastejo de capim estrela-africana (*Cynodon nlemfüensis*) para os grupos experimentais e dos suplementos contendo ou não semente de girassol utilizados no experimento

Alimento/Amostra	MS (%)	MM (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)	EE (%)	NDT (%)
Fragem do Grupo Controle	91,6	7,9	14,3	77,5	74	2,8	53,5
Fragem do Grupo Girassol	91,2	7,4	15,6	75,3	72,8	2,5	54,1
Suplemento do Grupo Controle	87,5	5,0	30,9	21,4	7,0	5,7	83,6
Suplemento do Grupo Girassol	90,5	5,5	31,4	46,7	38,9	24,4	87,1

Resultados expressos em 100% da matéria seca.

**MS:** Matéria Seca; **MM:** Matéria Mineral; **PB:** Proteína bruta; **FDN:** Fibra em Detergente Neutro; **FDA:** Fibra em Detergente Ácido; **EE:** Extrato Etéreo; **NDT:** Nutrientes digestíveis totais.



A altura do capim estrela-africana (*Cynodon nlemfüensis*) foi semelhante nos tratamentos e foi de 32 cm na entrada das novilhas nos piquetes (pré-pastejo) e 19 cm na saída (pós-pastejo). No pré-pastejo, as médias da massa seca de forragem para os grupos C e G foram 3,61 kg/ha e 3,55 kg/ha, respectivamente. Os dados estão representados na Tabela 6, os quais foram semelhantes entre os tratamentos. Os resultados obtidos da massa de forragem e o manejo adotado foram similares ao utilizado no trabalho de Alvim et al. (2003).

Tabela 6- Médias das alturas e da massa de forragem de capim estrela-africana (*Cynodon nlemfüensis*), coletadas no período pré e pós-pastejo, para o Grupo Controle e Girassol

Parâmetro do pasto	Pré-pastejo		Pós-pastejo	
	Controle	Girassol	Controle	Girassol
Altura (cm)	32,2	31,6	19,2	19,4
Massa de forragem (kg/ha)	3.611	3.555	1.883	1.906

## VII. DISCUSSÃO

O período de suplementação utilizado neste estudo foi determinado a partir do tempo requerido para que os folículos primários se desenvolvessem até o estágio antral e assim sejam observados os efeitos da dieta sobre a qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário (WEBB et al., 2004). No presente estudo, esperava-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos durante 57 dias aumentaria o número de folículos visualizados e oócitos coletados, assim como incrementaria a qualidade dos mesmos. Tal premissa fundamentou-se no fato de que o fornecimento de dietas contendo elevadas concentrações de AL, componente presente em altas concentrações na semente de girassol, contribuiria para a maturação nuclear e o nível de expansão das células do *cumulus*-oócitos, favorecendo a competência oocitária (MAREI et al., 2010). Entretanto, neste estudo, a suplementação com semente de girassol não aumentou o número de folículos visualizados, visto que ao longo do período experimental, as médias foram semelhantes para o Grupo C ( $20,2 \pm 1,01$ ) e G ( $19,01 \pm 1,05$ ). Tal suplementação também não incrementou o número de oócitos aspirados, visto que as médias foram semelhantes para o Grupo C ( $13,8 \pm 1,27$ ) e G ( $13,05 \pm 1,25$ ).

Embora poucos estudos tenham sido realizados com fêmeas de corte, Leão (2012) realizaram um estudo com novilhas Nelore suplementadas com uma fonte de gordura protegida rica em AGPI n-6 e n-3 (Megalac-E®- 100 g/dia) durante 60 dias antes da aspiração folicular. Os mesmos autores não observaram efeito direto da suplementação sobre o número de folículos ovarianos e taxa de recuperação de oócitos destinados a PIV. Em novilhas de corte suplementadas com AGPI (CHILDS et al., 2008a; RYAN et al., 1992), verificou-se não ter havido melhoria no número de folículos após os programas de superestimulação. E ainda, Fouladi-Nashta et al. (2009) utilizaram vacas da

raça Holandesa e estas receberam três dietas contendo gordura protegida ruminal (Megalac), soja ou linhaça como a principal fonte de AG e não verificaram efeito no número de folículos pequenos, médios e grandes, no número e qualidade dos oócitos produzidos e no rendimento de blastocistos. Deve-se salientar que no presente estudo, as fêmeas suplementadas com semente de girassol não ingeriram diariamente a quantidade inicialmente estipulada do referido suplemento, enquanto as fêmeas do Grupo Controle consumiram a quantidade estipulada (Apêndice A). Possivelmente a alta concentração de AGPI, presentes na suplementação contendo semente de girassol, tenha limitado o consumo no grupo tratado, comprometendo os parâmetros reprodutivos avaliados. Sabidamente, a ingestão de maior quantidade de gordura reduz a velocidade de trânsito do alimento no tubo digestório, desta forma podendo promover uma redução na quantidade de alimento ingerido. Deve-se salientar que em experimentos anteriores realizados por este grupo com tal suplemento (CORDEIRO et al., 2015), fornecido na mesma quantidade animal/dia, não houve esta limitação de consumo.

No presente estudo, não foi realizado um período de adaptação do fornecimento da suplementação com fornecimento diário da dieta de manutenção, com o objetivo de observar o consumo progressivo até a estabilização. Sabe-se que o estresse de adaptação reduz o apetite e ingestão de alimentos através de vias hormonais, e tem um impacto negativo sobre a secreção de hormônios sexuais. Sendo assim, pode prejudicar também a maturação dos gametas e causar abortos e nascimentos prematuros (DOBSON; SMITH, 2000).

Adicionalmente, deve-se considerar que as fêmeas foram submetidas a um manejo intensivo para avaliações ultrassonográficas e colheitas sanguíneas, e que tais fontes de estresse podem ter influenciado negativamente a subsequente ovulação (DOBSON et al., 2001), além de que há indícios que animais submetidos à situações de estresse também seriam doadores de oócitos menos competentes (SENEDA et al., 2000). A exposição

de um animal ao estresse evitável compromete seu bem estar.

De fato, em consoância com o exposto, em relação ao peso corporal, houve um declínio do mesmo até o D43 para o Grupo C (de  $422,2 \pm 20,5$  kg para  $412,5 \pm 20,1$  kg; para D13 e D43, respectivamente); e Grupo G (de  $415,7 \pm 24,7$  kg para  $391,0 \pm 22,1$  kg; para D13 e D43, respectivamente). Do D43 ao D77, evidenciou-se um aumento no peso vivo para o Grupo C (de  $412,5 \pm 20,1$  kg para  $437,3 \pm 20,8$  kg; para D43 e D77, respectivamente); e Grupo G (de  $391,0 \pm 22,1$  kg para  $417,3 \pm 24,0$  kg; para D43 e D77, respectivamente). No mesmo período, também se observou aumento no ECC para o Grupo C (de  $2,9 \pm 0,1$  para  $3,0 \pm 0,0$ ; para D43 e D77, respectivamente) e Grupo G (de  $3,0 \pm 0,0$  para  $3,1 \pm 0,1$ ; para D43 e D77, respectivamente). Embora o presente estudo tenha objetivado avaliar especificamente a suplementação com AL na performance reprodutiva e não os aspectos energéticos, a redução da ingestão, peso vivo e ECC observado nestes animais influenciou a performance reprodutiva das fêmeas avaliadas.

Em ambos os grupos, independente do tratamento, verificou-se uma maior concentração de colesterol total e LDL no D38 quando comparado aos demais dias do estudo, parâmetro que demonstra no D38 um “status” energético superior. Tal achado coincide com o incremento da performance reprodutiva, também em ambos os grupos no D43, momento em que foi caracterizada o maior número de folículos visualizados, maior número de oócitos aspirados, maior número de embriões produzidos *in vitro*, maior número de embriões GI e GII, maior taxa de blastocistos e maior taxa de embriões GI e GII. Tais achados reforçam o fato de que os aspectos energéticos influenciaram a performance reprodutiva das fêmeas avaliadas, já que no D29 houve uma mudança na dieta, pela adição da ração para bovinos da Premix.

Entretanto, considerando que ambos os grupos de tratamento são coincidentes no comportamento temporal de perda de peso do D13 ao D43 e de ganho de peso do D43 ao D77, pode-se observar no Grupo G que a perda

de peso foi mais acentuada e o ganho de peso menos proeminente quando comparado ao Grupo C, embora ambos os grupos de tratamento não tenham diferido na performance reprodutiva. Desta forma, especula-se que animais em processo de perda de peso, suplementados com AL, possam manter sua performance reprodutiva na OPU associada a PIV.

No presente estudo, esperava-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos favorecesse a taxa de clivagem, aumentando o número de embriões produzidos. Porém, não foi observado tal efeito, considerando que ambos os grupos (Grupo C e G) apresentaram médias semelhantes ( $76,32 \pm 1,58\%$  vs.  $76,78 \pm 2,11\%$ ; respectivamente). Leão (2012) suplementou novilhas Nelore com AGPI (Megalac-E®- 100 g/dia) durante 60 dias antes da aspiração folicular e não observou efeito na taxa de clivagem e produção de blastocistos. Contudo, Fouladi-Nashta et al. (2007), que suplementou vacas em lactação com sais de cálcio de óleo de palma verificaram uma maior taxa de clivagem ( $P = 0,076$ ), embora o valor de  $P$  demonstre apenas uma tendência.

Em relação ao número de embriões produzidos *in vitro*, também não se observou tal efeito positivo, considerando que as médias de ambos os grupos não diferiram significativamente, sendo  $10,79 \pm 0,94$  para o Grupo C e  $10,08 \pm 1,01$  para o Grupo G. Em vários estudos que utilizaram a suplementação com AGPI, evidenciou-se um incremento na quantidade dos embriões produzidos (FOULADI-NASHTA et al., 2009), assim como uma redução no número de embriões degenerados em vacas de leite, com aumento do consumo de matéria seca (CHILDS et al., 2008a). Thangavelu et al. (2007) suplementaram vacas Holandesas em lactação com dietas contendo ácidos graxos saturados (SAT), linhaça inteira (FLX) ou sementes de girassol (SUN). Os mesmos autores concluíram que as dietas FLX e SUN acelerou o desenvolvimento embrionário e favoreceu embriões com um maior número de blastômeros quando comparada a dieta SAT. No presente estudo, a suplementação com

semente de girassol não promoveu incremento na quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

Childs et al. (2008a) suplementaram novilhas de corte mestiças com palha de cevada, ração concentrada ou ácido palmítico. Em novilhas de corte suplementadas com ácido palmítico, houve uma redução no número de embriões degenerados. Os mesmos autores atribuem que a redução nesta degeneração poderia ser promovida por alterações no ambiente uterino, possivelmente por uma mudança na síntese e secreção das três séries de prostaglandinas. Assim, trabalhos que utilizaram a suplementação com AGPI e avaliaram embriões coletados produzidos *in vivo*, certamente contam com a influência de tal suplementação também no microambiente uterino e no tecido endometrial, enquanto que estudos que priorizam a suplementação com AGPI para a produção de embriões *in vitro* tenham tais influências desconsideradas. Assim, a produção de embriões pelos diferentes métodos estabelecem analogias diferentes para a compreensão dos mecanismos pelos quais os AGPI favorecem a produção de embriões. Em concordância com este estudo, Bilby et al. (2006) não verificaram diferença significativa na produção de blastocistos produzidos *in vitro* quando oócitos foram coletados de vacas leiteiras aspiradas, suplementadas com óleo de girassol ou sais de cálcio trans ou sais de cálcio de óleo vegetal (ricos em n-6) e óleo de linhaça (rica em n-3).

No presente estudo também não foram encontrados efeitos da suplementação com AL no número de blastocistos e número de embriões grau I e grau II em novilhas Nelore suplementadas durante 57 dias. No estudo de Leão (2012), novilhas Nelore suplementadas com Megalac-E não tiveram maior produção de blastocistos. Adamiak et al. (2004) relataram que novilhas leiteiras que receberam gordura protegida não tiveram incremento na qualidade dos embriões. Os mesmos autores concluem que a suplementação com gordura protegida contendo AL não melhorou a produção e o desenvolvimento dos embriões *in vitro*. Em outro estudo realizado, Guardieiro et al. (2014) suplementaram novilhas Nelore com Megalac-E e concluíram que tal fonte de

AL não melhorou a produção de embriões, a criotolerância e a qualidade embrionária.

Pelo fato de existir variação na seletividade e consumo individuais entre os animais a pasto, a proporção de AL inicialmente estipulada para o consumo pode não ter sido alcançada satisfatoriamente neste estudo, podendo explicar as médias semelhantes e que não diferiram significativamente para ambos os grupos de tratamento em relação ao desenvolvimento dos embriões e número de blastocistos. No presente estudo, houve a preocupação de fornecer aos dois grupos suplementos igualmente balanceados em energia e proteína, ambos com 72% de NDT e 24% de PB, porém observou-se um maior ECC para o Grupo C em relação ao Grupo G. Torna-se importante que para ambos os grupos de tratamento, o ganho de peso dos animais foi relativamente baixo, demonstrando que isto pode ter influenciado a performance reprodutiva das fêmeas.

Embora poucos estudos tenham sido realizados com *Bos taurus indicus*, conclui-se que os resultados da suplementação com AGPI na performance reprodutiva são bastante controversos. As variáveis para os diferentes resultados encontrados na literatura são muitas. Deve-se considerar que vacas de leite apresentam um regime alimentar diferenciado quando comparado a vacas de corte. A própria população de microorganismos do rúmen torna-se diferenciada em vacas de leite, com a predominância de bactérias amilolíticas, enquanto em vacas de corte ocorre um predomínio das celulolíticas. Tais populações apresentam comportamentos de biohidrogenação de ácidos graxos diferenciada, e ainda vacas de leite apresentam mais agilidade em vários procesos de metabolização hepática. O fato dos AGPI serem, em sua maioria, biohidrogenados pelos microorganismos ruminais, pode gerar proporções diferenciadas dos produtos finais que torna-se bastante variável, inclusive pela composição da dieta restante que ocupa o rúmen durante o processo de biohidrogenação. Isso torna-se válido também para as gorduras protegidas, que diante deste contexto podem se tornar mais ou menos protegidas. Assim,

embora possamos tratar de fontes semelhantes de AGPI, diante do processo percorrido por tais fontes e do aproveitamento das mesmas, podemos estar estabelecendo comparações bastante discrepantes.

Observou-se também, no presente estudo, que para algumas variáveis, quando considerado o efeito de tempo, houve no geral um aumento das médias para o dia D43, em relação às seguintes variáveis: número de folículos visualizados, número de oócitos aspirados, número de embriões e número de embriões GI e GII. A inclusão da ração para bovinos da Premix nos suplementos dos animais a partir do D29 para ambos os grupos parece ter melhorado positivamente o consumo e parece justificar o aumento para essas variáveis no D43. No contexto da aspiração folicular, sabe-se que é possível haver um aumento no número de folículos após várias semanas de aspirações foliculares (STUBBINGS e WALTON, 1995), porém esta informação não se aplica ao presente estudo, já que foi realizada a sincronização da onda de crescimento folicular.

Analisando-se o consumo alimentar, houve uma grande variação do consumo de suplemento contendo semente de girassol, fato que não ocorreu no Grupo Controle. No Grupo G, na maioria dos dias em que as novilhas foram suplementadas, a ingestão alcançada foi inferior à ingestão estipulada, e a sobra dos suplementos foi significativa (Apêndice A). A gordura também pode promover um efeito negativo na digestibilidade das fibras e no consumo de matéria seca, devido ao revestimento físico e à proteção contra a ação dos microrganismos, já que apresentam um efeito tóxico dos ácidos graxos de cadeia longa sobre as bactérias ruminais (HENDERSON, 1973). Além disso, o excesso de gordura pode atuar contra a seleção de microrganismos com capacidade celulolítica (EZEQUIEL, 2001). Portanto, alterações na fermentação ruminal podem diminuir o consumo, como foi observado no presente estudo, e isto ocorre devido ao fato de que os AGPI diminuem a digestão das fibras.



Entretanto, segundo Duckett (2003), as sementes oleaginosas são fisicamente protegidas da biohidrogenação ruminal pelas cascas de suas sementes, como é o caso das sementes de girassol. Neste estudo, a semente de girassol foi fornecida inteira. Portanto, usando gordura de sementes oleaginosas inteiras, sem quebrá-las, como as utilizadas no presente estudo, esta pode ser administrada em níveis mais altos do que óleos livres, pois a mastigação incompleta não libera simultaneamente todo o óleo das sementes, sendo este liberado no rúmen mais lentamente. Devido à ausência de ligações duplas, os ácidos graxos saturados passam pelo rúmen sem sofrerem degradação. Coppock e Wilks (1991) afirmaram que o fornecimento de lipídios provenientes de sementes oleaginosas compreende uma liberação lenta do óleo no decorrer do dia, decorrente da regurgitação e remastigação das sementes, permitindo a ação dos microrganismos ruminais em hidrogenar as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados, impedindo o efeito inibidor do óleo sobre a digestibilidade da fibra.

Neste estudo, constatou-se que as concentrações de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos de tratamento, ou seja, foram semelhantes entre os animais que receberam (Grupo Girassol) ou não (Grupo Controle) a suplementação. Sendo assim, deve-se salientar que a falta de aumento dos lipídios plasmáticos pode não ter favorecido modificações nos folículos e oócitos.

## VIII. CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com semente de girassol em doadoras de oócitos não incrementou o número e a qualidade de oócitos, as taxas de clivagem e o número e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* em fêmeas Nelore (*Bos taurus taurus*).

## **IX. IMPLICAÇÃO**

A utilização do ácido linoleico como fonte de gordura empregada na alimentação de fêmeas bovinas Nelore pode ter comprometido o consumo do suplemento, comprometendo assim o seu efeito.

Os efeitos positivos da suplementação com semente de girassol observada em estudos anteriores, como o aumento das taxas de concepção em novilhas Nelore suplementadas durante 22 dias a partir da IATF, parecem ser decorrentes de efeitos no microambiente uterino, e não somente nos oócitos, como testado neste experimento.

## REFERÊNCIAS

ADAMIAK, S. J. et al. Inclusion of bovine serum from different dietary backgrounds influences embryo viability in vitro. **Reproduction Abstract Series**, v. 31, p. 19, 2004.

ALLAIN, C.C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n.4, p. 470-475, 1974.

ALVIM, M.J. et al. Avaliação sob pastejo do potencial forrageiro de gramíneas do gênero *Cynodon*, sob dois níveis de nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.47-54, 2003.

ANDRADE, F. M. E. **Produção de forragem e valor alimentício do capim-marandu submetido a regimes de lotação contínua por bovinos de corte**. 2003. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens) - *Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, ESALQ/USP*, Piracicaba, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11139/tde-25032004-164248/>>. Acesso em: 17 out. 2015.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**, 2015. São Paulo: FNP, 2015.

ARM & HAMMER. Animal Nutrition Group. Megalac®- E: gordura protegida ruminal. **QGN Química Geral do Nordeste S. A.**, p.10, 2008.

ARMSTRONG, D.G. et al. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v.123, n. 3, p. 371-378, 2002.

BADER, J. F. et al. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 61-70, 2005.

BARUSELLI, P. S. et al. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., Londrina, 2006. Anais eletrônicos. Disponível em: [http://www.cemtralbelavista.com.br/adm/Filemanager/ckeditor/arquivos/Baruselli\\_e\\_col.\\_IATF.pdf](http://www.cemtralbelavista.com.br/adm/Filemanager/ckeditor/arquivos/Baruselli_e_col._IATF.pdf). Acesso em: 18 out. 2015.

BILBY, T. R. et al. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n.10, p. 3891–3903, 2006.

BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n.9, p. 1451-1463, 2001.

CERRI, R. L. A. et al. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n.4, p. 1520-1531, 2009b.

CERRI, R. L. A. et al. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 297, 2004.

CERRI, R. L. A. et al. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 137, n.5, p. 813–823, 2009a.

CHEVA-ISARAKUL, B.; TANGATAWEEWIPAT, S. Effect of different levels of sunflower seed in broiler rations. **Poultry Science**, v. 70, n.11, p. 2284-2294, 1991.

CHILDS, S. et al. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers. **Animal**, v. 2, n.6, p. 883-893, 2008b.

CHILDS, S. et al. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v. 70, n.6, p. 992-1003, 2008a.

COPPOCK, C.E.; WILKS, D.L. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. **Journal of Animal Science**, v. 69, n.9, p. 3826-3837, 1991.

CORDEIRO, M. B. et al. Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. **Theriogenology**, v. 83, n.9, p.1461-1468, 2015.

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; WATERS, S.M. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation on bovine uteroendometrial and hepatic gene expression of the insulin-like growth factor system. **Theriogenology**, v. 75, n.3, p.500-512, 2011.

DAGHIR, N. J.; RAZ, M. A; UWAYJAN, M. Studies the utilization of full fat sunflower seed in broiler rations. **Poultry Science**, v. 59, N.10, p. 2273-2278, 1980.

DOBSON, H. et al. Is stress really all that important? **Theriogenology**, v.55, n.1, p.65-73, 2001.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, v. 60–61, p. 743–752, 2000.

DUCKETT, S.K. **Effect of nutrition and management practices on marbling deposition and composition**, 2003. Disponível em: <<http://www.cabprogram.com/cabprogram/sd/articles/duckett.html>>. Acesso em: 24 out. 2015.

EZEQUIEL J. M. B. Uso de caroço de algodão na alimentação animal. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 3., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001. p. 307-328.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PUCUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Porteiras abertas para o futuro**. 2013. Disponível em: <<http://www.sistemafaemg.org.br/Noticia.aspx?Code=1765&Portal=1&PortalNews=1&ParentCode=139&ParentPath=None&ContentVersion=R>>. Acesso em: 16 out. 2013.

FEDOROFF, N.V. et al. Radically rethinking agriculture for the 21st century. **Science**, v. 327, n.5967, p. 833-834, 2010.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. A potencial role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, n.9, p.1195-1201, 2006.

FERGUSON, J.D. Nutrition and reproduction in dairy cows. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.7, n.2, p.483-507, 1991.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with a enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, n.10, p. 2077-2080, 1982.

FOULADI-NASHTA, A. A. et al. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 77, n.1, p. 9–17, 2007.

FOULADI-NASHTA, A. A. et al. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v. 138, n.5, p. 771–781, 2009.

FUNSTON, R. N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v. 82, sup., p. 154-161, 2004.

GRUMMER, R.R.; CARROLL, D.J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**., v. 69, n.9, p. 3838-3852, 1991.

GUARDIEIRO, M. M. et al. A diet enriched in linoleic acid compromises the cryotolerance of embryos from superovulated beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n.4, p. 511–520, 2014.

HAGGARTY, P. et al. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 766-773, 2006.



HAWKINS, D.E. et al. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, v.73, n.2, p. 541-545, 1995.

HENDERSON, C.R. Sire evaluation and genetic trends. **Journal of Animal Science**, p. 10-41, 1973.

HIGHTSHOE, R.B. et al. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.69, n.10, p.4097-4103, 1991.

HOUGHTON, P. L. et al. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Journal of Animal Science**, v. 68, n.5, p. 1428-1437, 1990.

JUCHEM, S.O. et al. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n.1, p. 55–62, 2010.

KARUNOJEEWA, H.; THAM, S.H.; ABU - SEREWA, S. Sunflower seed meal, sunflower oil and full-fat sunflower seeds, hulls and kernels for laying hens. **Animal Feed Science Technology**, v. 26, n. 1/2, p. 45-54, 1989.

KENNEDY, L. G.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. **Theriogenology**, v. 19, n.6, p. 823-832, 1983.

KIM, J. Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n.1, p. 131–138, 2001.

KOJIMA, T. et al. Dietary administration of fatty acids-enriched mold dried cell containing  $\alpha$ -linolenic acid to female pigs improves ovulation rate and embryo quality in summer. **Journal of Reproduction and Development**, v. 43, p. 121-127, 1997.

LAMMOGLIA, M. A. et al. Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and and hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular pattern pattern, and postpartum reproduction in Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 74, n.9, p. 2253-2262, 1996.

LAPA, M. et al. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n.5, p. 904-910, 2011.

LEÃO B. C. S. **Efeitos da suplementação lipídica sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/98171>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 641p.

LEROY, J.L.M.R. et al. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. **Human Reproduction**, v. 25, p. 768-778, 2010.

LIM, J.M. et al. Development of in vitro-derived bovine embryos cultured in 5% de CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Human Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 458-464, 1999.

LINDNER, G. M.; WRIGHT JUNIOR., R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, n.4, p. 407-416, 1983.

LONERGAN, P. **Studies in the in vitro maturation, fertilization and cultive of bovine follicular oocytes**. 1992, 157f. Thesis (PhD) - National University of Ireland, Dublin, 1992.

LOPES, C. N. et al. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of Bos indicus beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 87, n.12, p. 3935-3943, 2009.

LOPES, C. N. **Suplementação de gordura protegida na produção de progesterona, momento da luteólise e prenhez em vacas Nelore**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

LUCY, M. C. et al. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F<sub>2α</sub>, luteinizing hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n.2, p. 483-489, 1991.

MANDARINO, J. M. G. **Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1992. 25p.

MAREI, W. F.; WATHES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction Research**, v. 139, n.6, p. 979– 988, 2010.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v. 81, n.6, p.1064-1072, 2009.

MARQUES, L. T. et al. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n.12, n.12, p. 2724- 2730, 2010.

MATTOS, R. et al. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , milk composition, and metabolic status os periparturient Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n.8, p. 921-932, 2004.

MATTOS, R. et al. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.4, p. 755-764, 2002.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n.1, p. 38-45, 2000.

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

NOGUEIRA, M. Globalização na XXII Reunião Anual da SBTE. **Jornal O Embrião**, 2008b. Espaço Aberto, p.17-18. Disponível em:  
<<http://www.sbte.org.br/?op=paginas&tipo=secao&secao=19&pagina=103>>  
Acesso em: 06 mar. 2015.

PEREIRA, R.M. et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n.3/4, p. 322-332, 2008.

PETIT, H. V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n.8, p. 2637-2646, 2003.

PETIT, H. V. et al. Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed and the sucesso f embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n.12, p. 1786-1790, 2008.

PETIT, H. V., TWAGIRAMUNGU, H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed diferente fat sources. **Theriogenology**, v. 66, n.5, p. 1316-1324, 2006.

PETIT, H. V.; GERMIQUET, C.; LEBEL, D. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seed and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 87, n.11, p. 3889-3898, 2004.

PONTES, J. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n.4, p. 690-697, 2009.

PONTES, J. H. F. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donos. **Theriogenology**, v. 75, n.9, p. 1640-1646, 2011.

QUEIROGA, V. P.; DURÁN, J. M. Determinação da composição química em sementes e em ácidos graxos do óleo de seis genótipos de girassol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Inclusão Social e Energia: Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 2021-2024.

RAES, K.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 113, n.1-4, p. 199-221, 2004.

REDDY, P.V.; MORRILL, I.L.; NAGARAJA, T.G. Release of free fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n.11, p. 3410-3416, 1994.

RHEINGANTZ, M. G. T. **Utilização da fecundação in vitro para a produção de embriões bovinos**, 2005. Disponível em: <[http://minerva.ufpel.tche.br/~mgrheing/art\\_uso\\_fiv.hym](http://minerva.ufpel.tche.br/~mgrheing/art_uso_fiv.hym)>. Acesso em: 10 out. 2015.

ROBINSON, R. S. et al. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 124, n.1, p. 119-131, 2002.

RYAN, D. P.; SPOON, R.A.; WILLIAMS, G.L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **Journal of Animal Science**, v. 70, n.11, p. 3505-3513, 1992.

SANTOS J. E. P. et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, sup. 2, p. 23–30, 2008a.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, n.1, p.88-97, 2008b.

SARTORI, R.; GUARDIERO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, sup. spec, p. 422-432, 2010.

SENEDA M. M. et al. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained *in vitro*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., Stockholm, Sweden 2000. **Anais...** 2000, p.62.

SILVA, D. J.; QUEIROZ A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. Ed. Viçosa: UFV, 2002. 166p.

SILVA, M. N. **A cultura do girassol**. Jaboticabal: FUNEP, 1990. 67p.

SIMAS, J. M. C. Como utilizar gordura em dieta de vacas leiteiras. **Revista Balde Branco**, v. 401, p. 26-30, 1998.

SOARES, S. R. V. **Metabolismo e digestão de lipídios em vacas leiteiras**. 2009. 43 f. Monografia (Especialização) - REHAGRO/NEWTON PAIVA, Belo Horizonte-MG, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. **Jornal O Embrião**, 2015. Disponível em: <<http://itarget.com.br/newclients/sbte.org.br/2015/extras/embriao55.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2015.

SOLLENBERGER, L. E.; CHERNEY D. J. R. Evaluating forage production and quality. In: THE SCIENCE of grassland agriculture. Ames: Iowa State University Press, 1995. P. 97-110.

STAPLES, C. R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n.3, p. 856-871, 1998.

STAPLES, C.R. Aumento da taxa de prenhez em vacas leiteiras através da suplementação com gordura. **Anais**. Uberlândia, MG, p.91-103, 2009.

STUBINGS, R. B.; WALTON J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. **Theriogenology**, v. 43, n.4, p. 705-712, 1995.



STURMEY, R. G. et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, sup. 3, p. 50–58, 2009.

TELLES, M. M. **Caracterização dos grãos, torta e óleo de três variedades de girassol (*Helianthus annuus L.*) e estabilidade do óleo bruto**. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias- UFSC, Florianópolis- SC, 2006.

THANGAVELU, G. M. et al. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 68, n.7, p. 949-957, 2007.

THATCHER, W. W. et al. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, n.1, p. 131-140, 1997.

THOMAS, M.G.; BAO, B.; WILLIAMS, G.L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. **Journal of Animal Science**, v.75, n.9, p.2512-2519, 1997.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminants**. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D.R.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 77, n.2, p. 190-201, 2007.

WEBB, R. et. al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**, v.82, p.E63-E74, 2004.

WILKINS, J. F. et al. Protected lipid/protein supplement improves synchrony of oestrus and conception rate in beef cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL REPRODUCTION, 13,1996, Sydney, Australia. **Anais...** 1996. p.19-29.

WILLIAMS, G. L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 3, p. 785-793, 1989.

WILLIAMS, G. L.; STANKO R. L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1999.

WILLIAMS, G.L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.68, n.3, p.831-852, 1990.

ZERON, Y. et al. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n.2, p. 271–278, 2002.

ZERON, Y.A. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, n.3, p. 447-454, 2001.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A

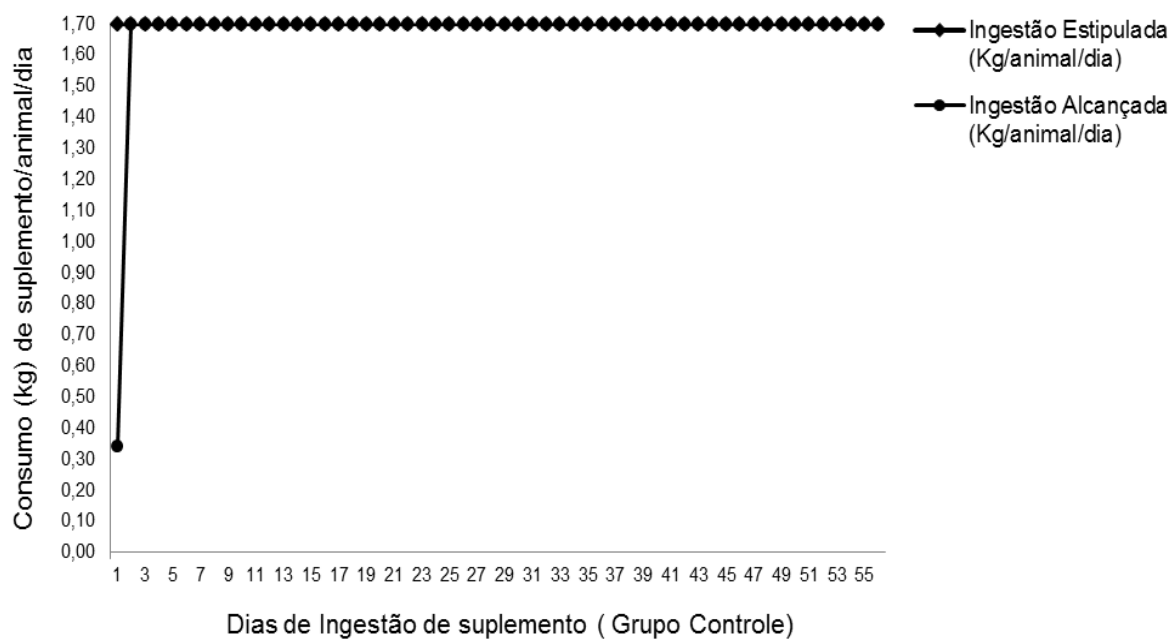


FIGURA 1A – Consumo dos suplementos/animal/dia em relação aos dias de ingestão do suplemento, demonstrando a ingestão estipulada e a ingestão alcançada para o Grupo Controle.

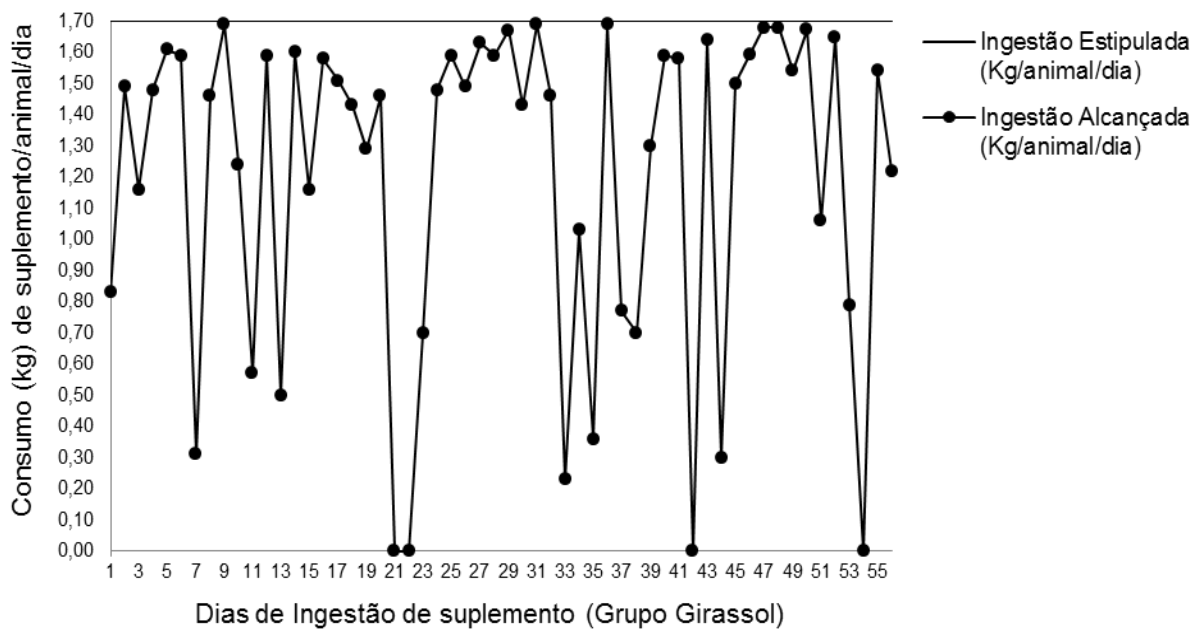


FIGURA 2A – Consumo dos suplementos/animal/dia em relação aos dias de ingestão do suplemento, demonstrando a ingestão estipulada e a ingestão alcançada para o Grupo Girassol.