

## USO DA ÁGUA DE COCO EM PÓ NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO: I. CONTROLE DURANTE O ABAIXAMENTO DA TEMPERATURA ENTRE 30 E 15 °C

(The coconut water powdered use in the swine semen freezing process:

I. Controls during the temperature fall)

TONIOLLI, R.<sup>1\*</sup>; TONIOLLO, G.H.<sup>2</sup>; FRANCESCHINI, P.H.<sup>2</sup>; MORATO, F.M.A.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; <sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista-Campus de Jaboticabal

### RESUMO

O sêmen de oito reprodutores foi coletado utilizando a técnica da mão enluvada sendo utilizado o ejaculado total. De cada ejaculado foi retirado  $10,2 \times 10^9$  spz para cada tratamento. A qualidade do sêmen foi avaliada pela concentração ( $\times 10^6$  spz/mL), volume (mL), total de espermatozoides ( $\times 10^9$  spz), vigor espermático (0 a 5), porcentagem de células móveis (%), morfologia espermática (%) e integridade de membrana (%). O sêmen foi diluído no Beltsville Thawing Solution (BTS) e na água de coco em pó (ACP). O ejaculado foi diluído em partes iguais (1:1) e incubado entre 30 °C e 15 °C. Os exames da integridade do acrossoma e vitalidade foram feitos no sêmen puro e diluído pela técnica do azul de bromo-fenol em aumento de 1000x. A integridade da membrana plasmática foi avaliada pela coloração fluorescente em microscopia óptica de campo escuro. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, utilizando-se os testes de Mann Whitney, Tukey e Student, com análise das diferenças entre médias feita por variância multifatorial com o *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (SAS 6.03), a um intervalo de confiança de  $p < 0,05$ . As avaliações do sêmen *in natura*, apresentaram valores médios de vigor espermático (4,2) e de porcentagem de espermatozoides móveis (92%) acima dos parâmetros mínimos exigidos (3,0 e 70%) para sua utilização em programas de inseminação artificial. Na característica porcentagem de células móveis, o ACP (74%) foi significativamente melhor que o BTS (67%) a 15 °C. Os melhores resultados foram obtidos com o uso do diluente ACP: acrossoma intacto (49,2%); células vivas (62,5%) e membrana íntegra (65,6%). O diluente ACP proporcionou um meio de conservação que manteve maior número de espermatozoides vivos com membranas íntegras, podendo ser recomendado para uso rotineiro em laboratórios reprodução. O diluente ACP demonstrou ser um bom meio de conservação do espermatozoide suíno em temperaturas entre 17 e 15 °C, podendo ser indicado para uso em programas de inseminação artificial.

Palavras-Chave: Água de coco, sêmen, suíno, conservação, varrão.

### ABSTRACT

The semen of eight swine males was collected by the glove handled technique, being used the total ejaculated. It was retired from each ejaculated a total of  $10.2 \times 10^9$  spz, distributed among the treatments. The semen quality was evaluated by the concentration ( $\times 10^6$  spz/mL), volume (mL), total of spermatozoa ( $\times 10^9$  spz), spermatic vigour (0 to 5), movable cells (%), spermatic

---

\* Endereço para correspondência:  
E-mail: toniulli@roadnet.com.br

morphology (%) and membrane integrity (%). The semen was diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS) and the coconut water powdered extender (ACP), in the same parts (1:1) and incubated between 30 °C and 15 °C. The exams of acrossome integrity and vitality, were made in the pure and diluted semen, by the bromophenol blue technique in increase at 1000x. The integrity of plasmatic membranes was evaluated by the fluorescent coloration in optical microscopy of dark field. The experimental statistic test used was the maybe blocks, with the Mann Whitney, Tukey and Student analysis, in the Lineal General Models of Statistical Analysis System Program (SAS 6.03), with a trust interval of  $p < 0.05$ . The *in nature* semen evaluations, presented medium values of spermatic vigour (4.2) and the movable spermatozoa (92%) above the minimum demanded parameters (3.0 and 70%) for your use in artificial insemination programs. In the percentage of movable cells characteristic, the ACP extender (74%) it was significantly better than BTS (67%) at 15 °C. The best results were obtained with use of the ACP extender: intact acrossome (49.2%); alive cells (62.5%) and complete membrane (65.6%). The coconut water extender provided a conservation middle that maintained a larger number of alive spermatozoids with integrate membranes and could be recommended for routine use in reproduction laboratories. The ACP extender demonstrated to be a good middle of swine spermatozoa conservation in temperatures between 17 and 15 °C, and may be indicated for use in artificial insemination programs.

Keywords: cocconut water, semen, swine, conservation, boar.

## INTRODUÇÃO

O uso do sêmen suíno congelado em todo o mundo representa ainda uma porcentagem muito baixa se comparado a aplicação do sêmen refrigerado em programas de inseminação artificial (Saraiva *et al.*, 2005), estando limitado praticamente ao uso por empresas na difusão de material genético (Scheid e Silveira, 2002). Os protocolos de criopreservação do sêmen do varrão, ainda se caracterizam pela maior sensibilidade a ação do frio durante a queda da temperatura, bem como ao choque térmico durante o processo de descongelação, trazendo ainda grandes desafios para o desenvolvimento de uma técnica economicamente viável para o sêmen desta espécie (Antunes, 2007).

O desenvolvimento de uma tecnologia que estenda o poder fecundante do espermatozoide, pode facilitar sua aplicação, permitindo uma utilização mais racional de reprodutores e a obtenção de

melhores resultados de fertilidade com o uso da inseminação artificial (Paquignon *et al.*, 1982).

Diversas pesquisas utilizando o sêmen suíno congelado, tem apontado como vantagem competitiva a seu favor, a possibilidade de um maior controle sanitário, devido ao fato de se poder, com antecedência, avaliar os doadores de sêmen antes da sua efetiva utilização (Smith, 2006). No desenvolvimento de novos protocolos para o sêmen do varrão, um importante fator a ser considerado é a curva de resfriamento do sêmen (Johnson *et al.*, 2000), visando a obtenção de uma maior porcentagem de células viáveis que serão em seguida congeladas.

Vários estudos tem sido realizados, com a finalidade de se desenvolver um diluente capaz de manter a motilidade espermática no ejaculado de diferentes machos domésticos, em níveis compatíveis com a possibilidade de fertilização. Substâncias como o cálcio (Robertson *et al.*, 1988), o leite desnatado (Scobey *et al.*,

1995) e a gema de ovo (Phillips, 1939; Salisbury *et al.*, 1941) foram adicionadas ao sêmen do touro, carneiro e do homem, respectivamente, visando uma melhor qualidade espermática durante sua conservação. Por outro lado, a busca de novos diluentes, também levou diversos autores a trabalharem com a água de coco em pó na conservação do sêmen do gato doméstico (Silva *et al.*, 2007), do cão (Barbosa *et al.*, 2007), do carneiro (Salgueiro *et al.*, 2007), do bode (Nunes *et al.*, 1999) e do macaco-prego (Araújo *et al.*, 2007). O presente trabalho teve como objetivo obter um maior número de espermatozoides viáveis a baixas temperaturas, utilizando-se o diluente água de coco em pó durante o abaixamento da temperatura em um protocolo de criopreservação do sêmen do varrão.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reprodutores, Coleta E Manipulação Do Sêmen *In Natura*

O sêmen de 07 (sete) reprodutores foi coletado uma vez por semana durante dez semanas, empregando a técnica da mão enluvada, em copo de coleta com capacidade de 500 mL, coberto por gaze e protegido por copo térmico e contra choques, perfazendo um total de 70 ejaculados. Todos os reprodutores utilizados no experimento pertenciam ao Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS) e encontravam-se em sistema rotineiro de coleta, sendo utilizado o ejaculado total após separação da parte gelatinosa através de filtro de coleta. Após a coleta, o ejaculado era identificado e levado em seguida ao laboratório para o seu

processamento. A fração gelatinosa retida pela gaze era desprezada. Após estas primeiras avaliações, o sêmen será diluído dentro da primeira meia hora após a coleta, de acordo com os tratamentos experimentais da primeira meia hora após a coleta: sêmen e diluente se encontravam sempre na mesma temperatura (30 °C).

A qualidade do ejaculado *in natura* foi avaliada através das seguintes características: volume (mL), concentração ( $\times 10^6$  spz/mL), total de espermatozoides ( $\times 10^9$  spz), vigor espermático (0 a 5), motilidade espermática (% células móveis). As análises do vigor e motilidade foram feitas colocando-se uma gota de sêmen de 15  $\mu$ L entre lâmina e lamínula e com leitura em microscopia óptica a um aumento de 200 vezes. Foram avaliados, para cada característica, ao menos três campos de microscópio. De cada ejaculado foi retirado um total de  $10,2 \times 10^9$  spz para cada tratamento do sêmen e testes *in vitro*.

### Diluição, Abaixamento Da Temperatura E Avaliação

O resfriamento do ejaculado, foi feito da seguinte forma: após a coleta, a amostra de sêmen ( $10,2 \times 10^9$  spz) foi diluída em partes iguais com os diluentes (1:1) a serem testados: Beltsville Thawing Solution (BTS = controle) e água de coco em pó (ACP-103<sup>®</sup> - UECE / FAVET, Núcleo Integrado de Biotecnologia - NIB). O diluente ACP, oriundo da desidratação da água de coco *in natura*, pela técnica do “spray dry”, sendo reconstituída com água destilada nas seguintes proporções: 24g de ACP + 100mL de água destilada + sulfato de gentamicina a 80 mg/100mL, com 300 de osmolaridade e 6,7 de pH. A diluição foi feita a temperatura à temperatura de 30

°C, a partir da qual a solução ficou em incubação durante 2 horas, antes de ser colocada a 15 °C, permanecendo por mais 2 horas. Em seguida à coleta, diluição e resfriamento do sêmen, a qualidade espermática foi avaliada através do vigor espermático (0 a 5), motilidade espermática (% células móveis), integridade acrossomal e integridade de membrana plasmática (%).

### **Vigor E Motilidade Espermática (% Células Móveis)**

Cada amostra foi avaliada observando as seguintes características: vigor espermático (Tonioli, 1996) e motilidade espermática (%). Durante o processo de abaixamento da temperatura, estas análises foram feitas em dois momentos precisos após sua diluição no BTS e ACP: à temperatura de 30 °C (**Exame 1**) e à temperatura de 15 °C (**Exame 2**). Em ambos os momentos, o sêmen diluído foi reaquecido a uma temperatura de 37 °C sendo as análises feitas após 10 minutos de incubação.

### **Integridade Acrossomal E Vitalidade Espermática**

Os exames morfológicos foram feitos pela: a) morfologia do acrossoma e vitalidade espermática (% de células vivas). Foi feito um esfregaço de sêmen, corado pela solução de azul de bromo-fenol, contando-se 200 células/esfregaço em microscopia óptica com lente de imersão, com aumento de 1000x. A solução corante foi formada por: azul de bromo-fenol = 0,1 g; citrato de sódio = 0,4 g; água destilada = 10 mL. Juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante sendo homogeneizada em seguida. Após 30

segundos procedeu-se o esfregaço sendo secado a temperatura ambiente. Na morfologia acrossômica, os espermatozoides foram classificados em 3 categorias: 1) vivos com acrossoma intacto; 2) vivos com acrossoma danificado e 3) mortos. De cada ejaculado, para cada tratamento, foi realizado um esfregaço de sêmen após diluição nos diluentes testados. Os exames foram feitos utilizando microscopia óptica com lente de imersão, a um aumento de 1000x.

### **Integridade Da Membrana Plasmática**

Avaliada pela coloração fluorescente em microscopia óptica de campo escuro, com uma mistura de corantes biológicos. Para o meio de coloração, adicionou-se 20µL da solução de formaldeído, 20µL da solução de diacetato de carboxi fluoresceína (DIC) e 10µL da solução de iodeto de propídio (IP) para cada mililitro (mL) da solução salina estoque. Um total de 10µL da suspensão de sêmen, contendo  $10 \times 10^6$  sptz/mL foi diluída em 40µL de meio de coloração. Uma alíquota de 5µL da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula sob aumento de 1000x com iluminação epifluorescente, com filtros de fluoresceína padrão (luz azul) e rodamina padrão (cor verde), alternadamente para os corantes DC e IP, respectivamente. Foram contadas 200 células por alíquota corada/tratamento. Os espermatozoides foram classificados em 3 categorias: 1) I = Membrana íntegra. Toda a célula que acumula a DIC (fluorescência verde) ao longo de sua cabeça e flagelo, sem acúmulo da IP (fluorescência vermelha); 2) II = Membrana parcialmente danificada acúmulo de DIC na peça intermediária

e/ou região acrossomal, enquanto que a cabeça e cauda se coram com IP; 3) III = Membrana danificada. Acúmulo apenas de IP ao longo da célula.

Obs.: As análises de integridade acrossomal, vitalidade espermática e integridade de membrana plasmática foram feitas no sêmen *in natura* e diluído à temperatura de 30 °C.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com as análises paramétricas das diferenças entre médias feitas por variância multifatorial usando-se o *General Linear Models* do programa *Statistical Analysis System* (SAS 6.03, 1988), com um intervalo de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ) e as médias comparadas entre os grupos por meio dos testes de Tukey ou T de Student. As variáveis não paramétricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney (Sampaio, 2002), utilizando o procedimento NPAR1WAY com a opção WILCOXON do SAS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Vigor E Motilidade Espermática

Os resultados das análises do ejaculado, referentes à característica vigor espermático, durante o período de abaixamento da temperatura até 15 °C, mostraram que após diluição do sêmen a 30 °C, as diferenças encontradas em relação ao ejaculado *in natura*, foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), nas duas temperaturas de conservação e

nos dois diluentes testados. Por outro lado, entre os diluentes ACP e BTS, não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em ambas as temperaturas. Durante este período (30 a 15 °C), verificou-se também que a queda dos valores desta característica, foi um pouco mais acentuada nos espermatozoides conservados no BTS (3,5 e 2,8, respectivamente) em relação ao ACP (3,7 e 3,1, respectivamente) (**Figura 1**).

Com relação a porcentagem de espermatozoides móveis, os valores no sêmen *in natura* (92%) foram melhor do que no diluído ( $p < 0,05$ ) (ACP = 88%; BTS = 84%) aos 30 °C. Nesta mesma temperatura, os resultados nos diluentes BTA e ACP se equivaleram, não apresentando diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Entretanto, durante a continuidade no abaixamento da temperatura até os 15 °C, o ACP proporcionou uma melhor condição de conservação ao sêmen mantendo valor melhor (74%) para esta característica ( $p < 0,05$ ) do que o BTS (67%), o qual apresentou uma queda dos valores da porcentagem de células móveis acentuada (**Figura 2**).

Esta queda dos valores, nas duas características, já era esperada devido a ação do frio e do tempo de conservação sobre o metabolismo celular espermático, uma vez que a temperatura do sêmen *in natura*, logo após sua colheita encontrou-se em valores que variaram entre 34 e 36 °C. Ainda assim, os valores espermáticos se encontraram dentro do padrão exigido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para sua utilização em programas de inseminação artificial. Necessário se faz entender que, a queda da

motilidade espermática vem normalmente acompanhada de uma diminuição concomitante do metabolismo celular, fato este que contribui para melhor preservação celular. Isto tudo é provocado pela diminuição da temperatura do meio de conservação.

Entretanto, necessário se faz encontrar um equilíbrio entre a conservação e a qualidade espermática. A queda mais acentuada dos valores aferidos encontrada no sêmen diluído no BTS, sugere uma possível melhor ação de conservação do ACP sobre os espermatozoides. Os resultados deste trabalho foram superiores aos encontrados por Moreira *et al.* (2000), com o uso da água de coco estabilizada, demonstrando desta forma uma evolução na concepção deste novo diluente. O diluente ACP, demonstrou ser capaz de manter uma melhor qualidade espermática após conservação, fato este que poderá favorecer ao ejaculado entrar em melhores condições na zona mais crítica de temperatura, abaixo dos 15 °C, permitindo desta forma uma recuperação pós descongelação de um número maior de espermatozoides viáveis.

### **Morfologia Acrossomal**

Analisando-se os resultados da morfologia durante o período de abaixamento da temperatura do ejaculado, para a categoria célula viva com acrossoma intacto não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os valores no sêmen puro (48,6%) e no diluído na água de coco (49,2%). Por outro lado, quando foi utilizado o diluente BTS, houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos dois outros tratamentos, caindo

para 37,6%. Para os resultados de células vivas com acrossoma danificado, apesar do maior valor médio com o uso do BTS, não houve diferenças significativas entre os dois diluentes testados (ACP = 13,3%; BTS = 16,3%), tendo sido o sêmen puro (12,3%) equivalente ao ACP. Na categoria espermatozoides mortos, os melhores resultados foram encontrados no sêmen puro (39,1%) e ACP (37,5%), diferindo significativamente dos valores encontrados no BTS (46,1%) ( $p < 0,05$ ) (**Figura 3**).

Estes resultados demonstraram que não houve queda no total de espermatozoides vivos com acrossoma intacto após abaixamento da temperatura para 30 °C e diluição do ejaculado no ACP, com o sêmen ainda preservando uma quantidade razoável (49,2%) de células vivas. Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por diferentes pesquisadores (Johnson e Larsson, 1985; Watson, 1995), confirmando a possibilidade de se utilizar este diluente alternativo na conservação do ejaculado do varrão. As grandes diferenças encontradas entre o sêmen do cachão e de machos de outras espécies domésticas (Antunes, 2007) fazem da sua congelação um desafio, principalmente quando mudanças estruturais e funcionais dos espermatozoides durante etapas do processo podem influenciar nos resultados posteriores de fertilidade (Ruvalcaba *et al.*, 2003). Baseado nas observações destes autores, os resultados deste trabalho, quando do sêmen diluído no ACP, poderão favorecer o ejaculado tratado desta maneira a obter melhores taxas de fertilidade pós descongelação quando utilizados em programas de inseminação artificial.

### **Viabilidade Espermática**

Com relação aos resultados do total de espermatozoides vivos, uma mesma tendência foi observada, ou seja, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre o sêmen puro (60,9%) e no diluído no ACP (62,5%), sendo os resultados encontrados no sêmen diluído no BTS (56,1%) significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ). Separando-se as células que realmente apresentam um potencial real para a fecundação, ou seja, os espermatozoides vivos com acrossoma intacto, o diluente ACP (49,2%) ( $p > 0,05$ ) mostrou ser mais adequado para a conservação do sêmen suíno do que o BTS (37,6%) (**Figura 4**).

Estes resultados indicam que a metodologia utilizada pelo protocolo experimental até este ponto da curva de abaixamento da temperatura, associada a um determinado tipo de diluente, mostrou-se adequada a conservação do ejaculado, visando sua posterior congelção. Este resultado abre novas perspectivas para o uso da técnica comercialmente em grande escala, pois com o desenvolvimento de novas tecnologias, produtos e equipamentos de criopreservação, associados a um maior número de reprodutores testados, permitirá o uso do sêmen suíno congelado em escala comercial (Romero, 2004; Wolders e Ten Napel, 2005).

### **Integridade Membrana Plasmática**

Na análise da integridade da membrana plasmática (**Figura 5**), verificou-se os seguintes valores: sêmen puro (75,0%); sêmen diluído no ACP (65,6%) e sêmen diluído no BTS (58,0%). Para esta característica, não houve

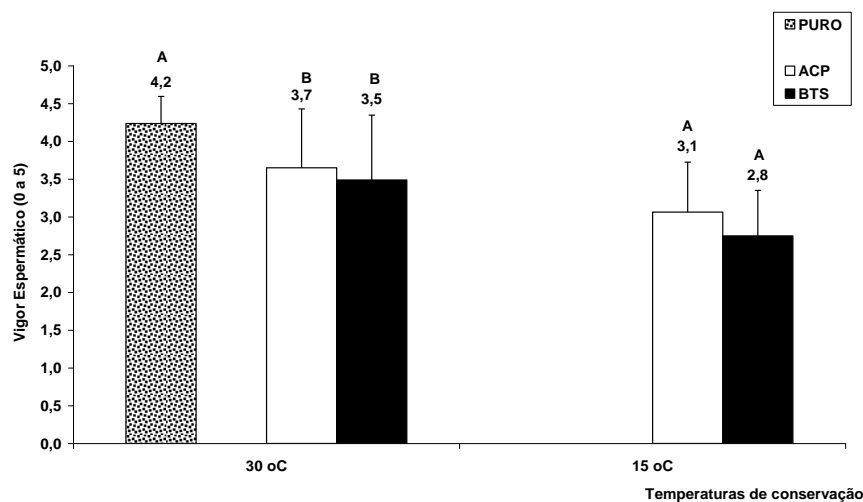
diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores encontrados no sêmen *in natura* e o diluído no ACP, fato este que poderá favorecer uma melhor manutenção da qualidade espermática em temperaturas mais baixas de conservação. É fato a variabilidade da capacidade de congelção do sêmen entre diferentes machos de uma mesma espécie (Gosden e Nagano 2002), que associadas a diferenças estruturais podem explicar a alta sensibilidade do espermatozoide suíno (Jonhson *et al.*, 2000), levando a diferentes resultados com o uso do sêmen assim conservado. Desta forma, mesmo pequenas diferenças entre resultados, podem significar o sucesso ou não ao final do processo de criopreservação.

O estudo da membrana plasmática permite uma análise da qualidade do ejaculado através da verificação do número total de células com membrana íntegra. Desta forma pode-se projetar, mesmo que parcialmente, a potencialidade fecundante do espermatozoide, uma vez que é de conhecimento que danos na membrana reduzem esta capacidade (Maxwell e Johnson, 1997). Analisando-se os resultados verificou-se que um maior número de células com membrana íntegra foi encontrado no ACP (65,6%) em relação com o BTS (58,0%), com diferença significativa entre esses dois tratamentos ( $p < 0,05$ ). Estes valores estão bem acima do mínimo de 37,2% de membranas intactas para ser classificado como um ejaculado com boa congelabilidade (Holt *et al.*, 2005), o que traz uma vantagem ainda maior para o ejaculado diluído no ACP pelo seu valor significativamente melhor. Na característica total de células com membranas danificadas, o melhor resultado

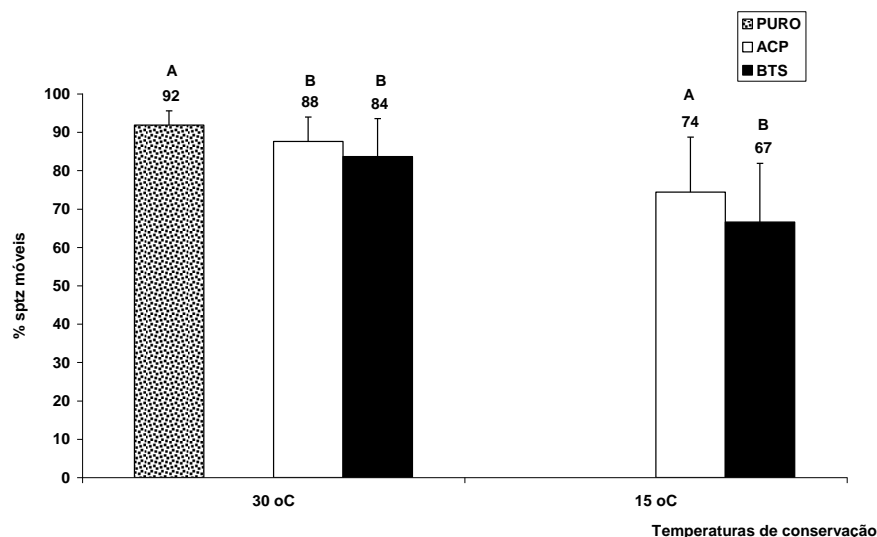
também foi encontrado no sêmen diluído no ACP (34,3%), com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao BTS (42,1%).

Desta forma, verificou-se que o sêmen diluído no ACP, apresentou uma maior porcentagem de células com membrana intacta e os menores valores de células com membrana danificada, o que poderá acarretar no decorrer do processo

uma maior recuperação de espermatozoides viáveis após a descongelação. Os resultados com o uso do ACP são animadores, entretanto pesquisas adicionais para verificação de outros parâmetros que previnem danos na membrana plasmática, tais como o aumento da polinsaturação do espermatozoide suíno (Maldjian *et al.*, 2005), são necessários.

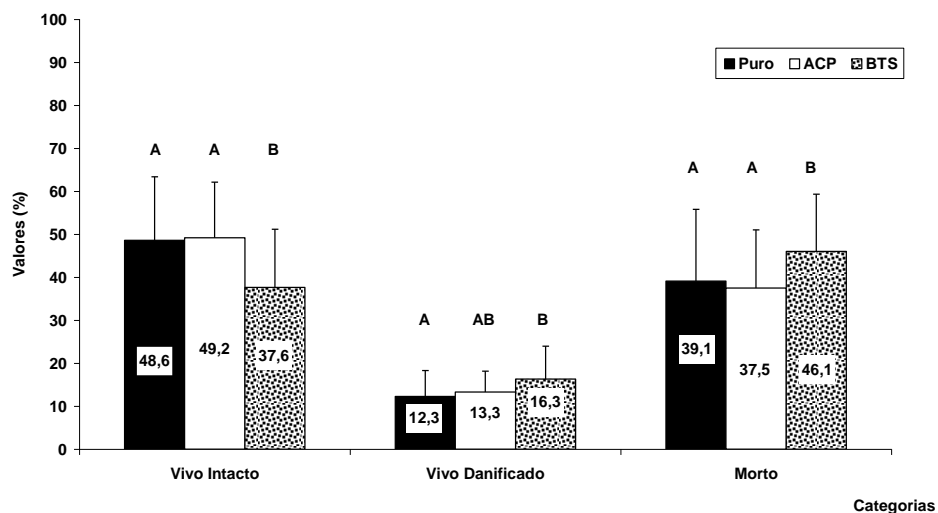


**Figura 1:** Valores médios do vigor espermático, durante o resfriamento a 30 e 15 °C, no sêmen suíno *in natura* e após diluição nos diluentes BTS e ACP.

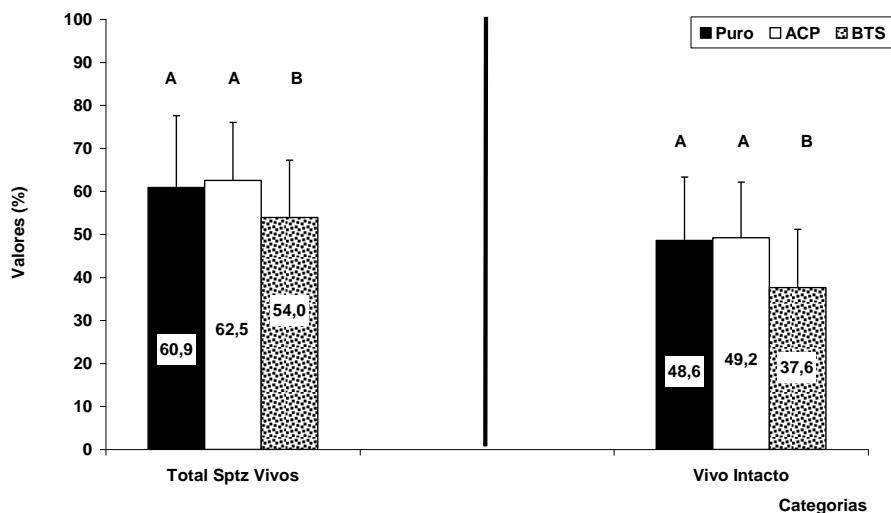


**Figura 2:** Valores médios da porcentagem de espermatozoides móveis, durante o resfriamento a 30 e 15 °C, no sêmen suíno *in natura* e após diluição nos diluentes BTS e ACP.

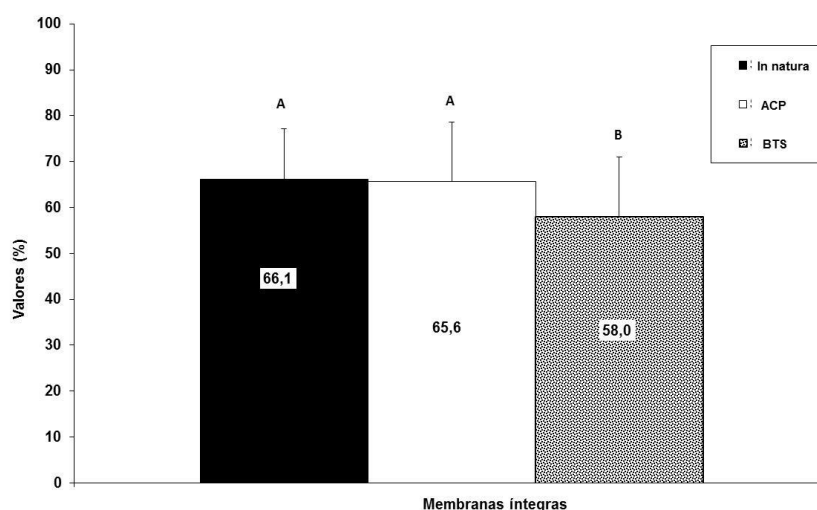




**Figura 3:** Integridade acrossomal e vitalidade espermática (% células vivas) a 30 °C, no sêmen suíno *in natura* e após diluição nos diluentes BTS e ACP.



**Figura 4:** Total de espermatozoides vivos à temperatura a 30 °C, no sêmen suíno *in natura* e após diluição nos diluentes BTS e ACP.



**Figura 5:** Total de membranas íntegras a 30 °C, no sêmen suíno *in natura* e após diluição nos diluentes BTS e ACP.

## CONCLUSÕES

Os ejaculados utilizados nos experimentos, mostraram-se de boa qualidade estando dentro dos parâmetros fisiológicos da espécie, não favorecendo a possíveis influências nos tratamentos propostos. Durante o período de abaixamento da temperatura, os dois diluentes testados mostraram-se eficazes, entretanto, com melhor perspectiva para o uso do ACP em processos de criopreservação, devido aos melhores resultados da motilidade em temperatura mais baixa (15 °C). Em diferentes aspectos analisados, o diluente água de coco em pó apresentou-se melhor do que o BTS, sugerindo apresentar uma melhor capacidade de conservação da célula espermática durante o processo de resfriamento do sêmen visando a congelamento. Analisando-se a qualidade acrossomal e integridade de membrana espermática, recomenda-se o uso do ACP para a diluição do sêmen, levando-se também em consideração o maior número

de espermatozoides vivos quando diluídos neste diluente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ajuda do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, da Granja Suinícola Estiva por ceder os animais e instalações e do Dr. José Ferreira Nunes do NIB/UECE pelo fornecimento do ACP-103<sup>®</sup>, sem as quais esta pesquisa não poderia ter sido realizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, R.C. Avanço tecnológico e aplicabilidade da técnica de congelamento de sêmen suíno, *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.1, p.60-63, 2007.
- ARAÚJO, L.L.; OLIVEIRA, K.G.; LIMA, J.S.; PANTOJA, P.S.P.; ARAÚJO, J.B.; DOMINGUES, S.F.S. 2007. Preservação

de sêmen de *Cebus apella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37 °C. In Abstract do 17<sup>th</sup> Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba, CBRA. 17. pp.192.

BARBOSA, C.C.; LOPES-NETO, B.E.; MADEIRA, V.L.H.; LIMA, A.H.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. 2007. Criopreservação de sêmen canino com diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106®): Efeito da concentração de gema de ovo. In Abstract do 17<sup>th</sup> Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba, CBRA. 17. pp.177.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3<sup>th</sup> ed., Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 104p., 2013.

GOSDEN, R.; NAGANO, M. Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction*, v.123, p.3-11, 2002.

HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M.; WATSON, P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.370-382, 2005.

JOHNSON, L.A.; LARSSON, K. Fertility results using frozen boar spermatozoa. In: Johnson, L.A. & Larsson, K. 1985. Editors, Deep freezing of boar semen, Swedish University Agricultural Science, Uppsalla, p.199-222.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, n.1, p.143-172, 2000.

MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryoreservation of boar semen. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.411-421, 2005.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryoreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.

MOREIRA, F.R.C.; TONIOLLI, R.; JATAHY, P.C.; SANTOS, B.S. Diferentes diluidores na conservação do sêmen do varrão. *Revista Ciências e Tecnologia*, v.2, n.2, p.63-67, 2000.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal*, v.1, n.1, p.17-26, 1999.

PAQUIGNON, M.; BUSSIERE, J.; BARITEAU, J.; DACHEUX, J.L.; COUROT, M. Effet du dilueur, du taux de dilution et du plasma séminal sur la fertilité des truies après une longue conservation de la semence. *Journée de Recherche Porcine en France*, v.14, p.85-90, 1982.

PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. *Journal of Biologie and Chemistry*, v.130, p.415, 1939.

ROBERTSON, L.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. 1988. The effect of incubation on membrane injury and

calcium movement in ram spermatozoa subjected to cold shock. In Abstract of the 11<sup>th</sup> International Congress in Animal Science and Artificial Inseminations, Dublin, 1. pp.290.

ROMERO, C.; ALBA, C.; MARTINEZ, P.C.; Pascual, M.A.H. Situação atual de novas tecnologias na reprodução de suínos. *Suínos & Cia*, v.2, n.6, p.28-33, 2004.

RUVALCABA, G.; ALBA, C.; CORCUERA, B.D.; CONDE, P.; HIGUERA, M.; CASANOVA, B.; MARTIN, C. Avanços nas técnicas de descongelamento e aplicação do sêmen suíno congelado. *Suínos & Cia*, v.1, n.3, p.2-44, 2003.

SALGUEIRO, C.C.M; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, R.V.; PARENTE, J.C.B.; CAVALCANTE, J.M.M.; MELLO, M.M.C.; BRASIL, O.O.; FAUSTINO, L.R.; GONÇALVES, R.F.B.; BATISTA, C.A.P.M.; SOUZA, D.F.R.; ACCIOLY, M.P. 2007. Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102<sup>®</sup>) ou TRIS, resfriado e mantido a 4 °C por 24 horas. In Abstract do 17<sup>th</sup> Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba, CBRA. 17:149.

SALISBURY, G.W.; FULLER, H.K.; WILLET, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field from its use. *Journal of Dairy Science*, v.24, p.905-910, 1941.

SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUES-MARTINES, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine

insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, p.1320-1333, 2005.

SAS 1988. Statistical Analysis System. v.6.03 Cary: SAS Institute, 1028p.

SCHEID, I.R.; SILVEIRA, P.R.S. Uma análise da IA na suinocultura brasileira. *Suínos & Cia*, v.1, n.1, p.25-28, 2002.

SCOBAY, M.J.; BIELFELD, J.S.; KRUSSEL, J.S.; JEYENDRAN, R.S. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. *Andrology*, v.27, p.229-231, 1995.

SILVA, T.F.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; SILVA, L.D.M. 2007. Uso da água de coco em pó (ACP-117<sup>®</sup>) na criopreservação de gato doméstico. In Abstract do 17<sup>th</sup> Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba, CBRA. 17:191.

SMITH, H. O futuro da inseminação artificial. *Suínos & Cia*, v.4, n.17, p.54-56, 2006.

TONIOLLI, R. Pouvoir fecondant des spermatozoides de verrat: amélioration des conditions de conservation. 1996, 91p. These (Doctorat) - Université Francois Rabelais de Tours - France, 1996. Resumo disponível em <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=182303>.

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

WOLDERS, H.; TEN NAPEL, J. Semen in straws. *Pig International*, v.35, n.4, p.10-14, 2005.