

Inseminação artificial de éguas Percheron e Bretão com sêmen fresco diluído em água de côco e leite em pó desnatado

Carlos Eduardo Furtado*, Gentil Vanini de Moraes, Luiz Paulo Rigolon e Marcos Roberto da Silva

Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil.
*Author for correspondence.

RESUMO. O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal e no Setor de Eqüideocultura da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, no período de setembro/97 a março/98, com o objetivo de testar os efeitos de dois diluidores na inseminação artificial de éguas das raças Percheron e Bretão. Foi utilizado um garanhão da raça *Percheron* e dezesseis éguas, as quais foram inseminadas com sêmen fresco, diluído em meios formulados à base de leite de vaca em pó desnatado (LD) e à base de água de côco (AC). As inseminações foram realizadas quando se observaram folículos ovarianos com 3,5 cm de diâmetro. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com oito éguas em cada tratamento. Para as análises utilizou-se o teste do qui-quadrado e análise de variância. A análise dos dados mostrou que não houve diferença ($P>0,05$) dos tratamentos sobre o índice de prenhez das éguas no primeiro, segundo e terceiro ciclos estrais, no número de inseminações artificiais fecundas e não-fecundas, na prenhez/inseminação artificial (IA), no índice de prenhez total, na IA/prenhez e entre a motilidade progressiva e o vigor dos espermatozoides após diluição. Com base nos resultados, pode-se concluir que os dois meios foram eficientes na inseminação artificial dessas raças de éguas, utilizando-se o sêmen fresco.

Palavras-chave: água de côco, éguas, inseminação artificial, leite em pó, prenhez, sêmen.

ABSTRACT. Artificial insemination of Percheron and Breton breed mares with fresh semen diluted in extenders with skimmed powder milk and coconut water.

This experiment was carried out at Animal Reproduction Laboratory and Equine Section of the Experimental Farm of *Universidade Estadual de Maringá*, in the period of September 97 through March 98. The objective was to study the effects of two extenders on artificial insemination (AI) of Percheron and Breton breeding mares. One Percheron stallion and sixteen mares were used. The mares were inseminated with fresh semen diluted in two extenders formulated with skimmed powder cow milk (LS) and coconut water (AW) on the day ovarian follicles with 3.5 cm of diameter were observed. They were allotted in a completely randomized design with eight animals in each treatments. The data were analyzed utilizing chi-square test and variance analyses. The analysis of the data showed there were no difference ($P>0.05$) between the treatments regarding pregnancy rate of the mares in first, second and third estrous cycles, number of fecund and not fecund artificial inseminations, pregnancy/AI, total pregnancy rate, number of AI/pregnancy, progressive motility and vigor of spermatozoa of semen. The result led to the conclusion that both extenders were efficient in the AI of these breed mares, utilizing fresh semen.

Key words: artificial insemination, coconut water, mares, pregnancy rate, skimmed powder milk, semen.

Os fatores que afetam o comportamento reprodutivo na espécie eqüina são responsáveis, em parte, pela baixa produtividade. O desempenho reprodutivo dos eqüinos é baixo (50%), sendo afetado pela alimentação, qualidade do sêmen, fotoperíodo, duração do cio, momento da cobertura e causas

patológicas do aparelho reprodutivo. Nota-se que existe correlação entre a baixa qualidade do sêmen e os baixos índices de fertilidade, fator que se soma aos problemas observados em fêmeas (Corteel, 1981).

O aprimoramento da inseminação artificial, com sêmen resfriado ou congelado, depende do diluidor

utilizado. Cada diluidor apresenta variações no que concerne à composição físico-química, apresentando pontos favoráveis ou desfavoráveis à sua utilização. A inseminação artificial com sêmen fresco, resfriado ou congelado tem mostrado grandes possibilidades de melhoramento genético e reprodutivo nas explorações de equinos que a utilizam (Legaut, 1974). Os diluentes até agora testados têm apresentado resultados variados que dependeram da temperatura e do tempo de conservação (Fuentes et al., 1989).

Encontram-se várias pesquisas avaliando a água de côco como diluente para sêmen de suínos, bovinos, caprinos, ovinos, mas não existe informação para a espécie equina. A água de côco é uma solução ácida natural e estéril composta de sais minerais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além dos indutores de divisão celular e eletrólitos diversos (Blume e Marques Júnior, 1994). Lethan (1974) observou que a água de côco contém outros princípios ativos como as propriedades semelhantes às auxinas e citocininas, que regulam o crescimento e causam divisão celular nas plantas, fungos e alguns protozoários.

Foote et al. (1962), analisando o uso da água de côco na conservação dos espermatozoides de bovinos, relataram que o efeito benéfico deste diluente sobre os espermatozoides consistia em uma fração neutra que contém vários ânions e cátions, açúcar livre, sorbitol e inositol, verificando também que não existe nenhuma substância desconhecida com propriedades especiais. Trabalhando com búfalos, Bayacag (1988) utilizou sêmen da raça *carabao* para avaliar diversos diluidores como o citrato de sódio, gema de ovo e água de côco. O autor relatou não ter havido diferença estatística entre o tratamento à base de gema de ovo e água de côco quanto aos parâmetros de mobilidade dos espermatozoides.

A água de côco constitui-se em excelente diluidor do sêmen de caprinos e ovinos, apresentando-se como uma opção tecnológica prática; as altas taxas de parições possibilitam recomendar esse diluidor para a tecnologia do sêmen e seu emprego em programas de inseminação artificial. Este diluente não somente simplifica a técnica de beneficiamento do sêmen de caprino, como também dilui a relação custo/benefício da criopreservação do sêmen (Salles, 1989; Araújo, 1990). Carrazzoni e Bojanovich (1971), utilizando sêmen obtido de quatro touros brahman americano, diluído em meio à base de água de côco, obtiveram 65,9% de prenhez, ao inseminarem 2.306 vacas hereford, concluindo que este diluidor mostra-se eficaz e econômico.

Em suínos, Toniollo e Mesquita (1990) relataram que a água de côco contribuiu para a obtenção de valores favoráveis em relação aos parâmetros de repetição do cio, taxa de parição e tamanho da leitegada.

Toniollo et al. (1996) relataram o efeito positivo do ácido indolacético presente na água de côco, na sobrevivência dos espermatozoides de suínos para inseminação artificial, pois este ácido parece ser a principal substância protetora dos espermatozoides neste meio. Em camundongos, Blume e Marques Júnior (1994), avaliando o desempenho da água de côco *in natura* como meio de cultura de embriões, relataram que este diluente mostrou-se um meio eficiente de cultura por um período de até 48 horas.

Leipold et al. (1998), trabalhando com congelamento de sêmen de garanhão, obtiveram a média de 40% de prenhez ao utilizarem sêmen com 1.600×10^6 por mm^3 e 800×10^6 por dose inseminante, ao terem diluído o sêmen em meio à base de leite desnatado e glicerotizado. Silva Filho et al. (1998b), trabalhando com inseminação de 100 éguas, tendo efetuado 147 inseminações com sêmen diluído em meio à base de leite em pó desnatado glicosado com 400 milhões de espermatozoides por dose de 15ml, obtiveram 63,3% de prenhez no primeiro ciclo, 42,9% no segundo e 33,3% no terceiro, resultando na média geral de 54,8% de prenhez, inseminando 24 horas antes da ovulação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da inseminação artificial com sêmen fresco diluído em água de côco e leite em pó desnatado no índice de prenhez e outros parâmetros reprodutivos.

Materiais e métodos

Local, animais e manejo alimentar. O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal e no Setor de Equiideocultura da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, no período de setembro/97 a março/98, utilizando quatorze éguas da raça Percheron, duas da raça Bretão e um garanhão da raça Percheron. As éguas permaneceram em pastagens de estrela africana (*Cynodon plectostachyus* K. Schum Pilger) e tifton (*Cynodon dactylum* Pers, cv. Tifton), recebendo, diariamente em duas refeições (11 e 14 horas), 4 kg/cab./dia de concentrado (90,48% de MS, 14,68% de PB, 3,94% de FB, 3,21% de EE e 5,62 de MM). O garanhão permaneceu em piquete próprio, recebendo feno de capim de rodes (*Chloris gayana* Kunth) à vontade e 6kg/cab./dia de concentrado com os mesmos níveis nutricionais do citado anteriormente, em duas refeições diárias. Todos os animais foram pesados no início do experimento. As

éguas apresentaram um peso médio de 561,4kg e o ganhão de 780kg. Os animais foram vermifugados 90, 60 e 30 dias antes do início do período experimental.

Manejo reprodutivo, avaliação do sêmen e preparo das doses inseminantes. As éguas foram rufiadas, diariamente, a partir do início do período experimental (Estação de Monta) para detecção do cio; após o início deste, foram realizadas palpações retais diárias para acompanhamento do crescimento folicular. A inseminação ocorreu quando a égua apresentou folículo ovariano com 3,5cm de diâmetro.

O sêmen foi colhido utilizando-se vagina artificial e uma égua em cio peada. Após a colheita, o sêmen foi transportado imediatamente ao Laboratório de Reprodução Animal para em seguida, processarem-se as análises para efetuar-se a diluição. Analisaram-se os seguintes parâmetros do sêmen: motilidade espermática progressiva, concentração espermática, vigor espermático, pH, volume total ejaculado e livre da porção gelatinosa e avaliações morfológicas dos espermatozóides, de acordo com Sorensen Junior (1979). A dose inseminante foi de 20ml e cada dose continha 500.000.000 de espermatozóides vivos, com vigor mínimo de 3 pontos, acondicionada em seringas plásticas de 20ml. A inseminação artificial foi efetuada utilizando-se pipetas de inseminação de bovinos, sendo afixadas a elas as seringas contendo a dose inseminante. O sêmen foi depositado intracervicalmente.

Após a inseminação, a égua foi conduzida ao piquete de origem e no dia seguinte, realizou-se nova palpação retal para verificar se havia ocorrido a ovulação. Decorridos 25 dias, efetuou-se a primeira palpação para verificar a prenhez. Setenta dias após a data da inseminação, realizou-se a segunda palpação retal para confirmar prenhez. Quando não se verificou prenhez aos 25 dias, a égua retornava ao rebanho de rufiação para reiniciar o manejo reprodutivo e nova inseminação.

Tratamentos. Os tratamentos consistiram na utilização de dois diluidores de sêmen na inseminação artificial. Os tratamentos foram: 1 - à base de leite de vaca em pó desnatado (LD); tratamento 2- à base de água de côco (AC). O meio do tratamento AC foi assim constituído: 25ml de citrato de sódio a 5% (1,25g de citrato) + 25ml de água destilada + 50ml de água de côco + 0,1g de estreptomicina + 0,5g de penicilina. O meio do tratamento LD consistiu em 10g de leite em pó desnatado aquecido/10min./90°C + 194mg de

glicose + 0,1g de estreptomicina + 0,5g de penicilina, para cada 100ml.

Delineamento experimental. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com oito éguas em cada tratamento. Para as análises estatísticas, utilizaram-se o teste do qui-quadrado na avaliação da taxa de prenhez ao primeiro, segundo e terceiro ciclos estrais, prenhez/IA, número de inseminações artificiais fecundas e não-fecundas, índice de prenhez total e a análise de variância para a motilidade progressiva e o vigor dos espermatozóides.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 são apresentados os resultados sobre as características médias do sêmen, os quais podem ser considerados satisfatórios, pois os valores obtidos utilizando meio à base de leite em pó foram 75% e com o meio à base de água de côco de 75% também, valores estes superiores ao valor médio de 54,7% obtido por Silva Filho *et al.* (1998 a) ou de 65,9% de prenhez obtido por Carrazoni e Bojanovich (1971), utilizando meio à base de água de côco. Contudo, deve ser destacado que no cio do potro (primeiro cio pós-parto) o sêmen diluído em meio à base de leite em pó desnatado proporcionou, após as inseminações, 66,6% de prenhez contra 50% daquele diluído em meio à base de água de côco. Esses resultados podem ser considerados economicamente importantes, pois inseminações em eqüinos com mais de 70% de prenhez são consideradas satisfatórias.

Tabela 1. Avaliação das características do sêmen do ganhão utilizado no experimento como volume total, volume filtrado, pH, motilidade progressiva, índice de anormalidades totais, índice de normalidade, índice de anormalidades leves e índice de anormalidades graves

Parâmetros	Médias*
Volume (ml)	114,32
Volume Filtrado (ml)	103,64
PH	7,31
Motilidade Progressiva (%)	67,50
Índice de Anormalidades totais (%)	31,85
Índice de Normalidade (%)	68,22
Índice de Anormalidades leves (%)	25,84
Índice de Anormalidades graves (%)	6,43

*As análises são resultados médios de 22 colheitas

Na Tabela 2 são mostrados os valores da motilidade espermática progressiva e o vigor espermático após as diluições. Não foi constatada influência ($P>0,05$) dos diluidores sobre esses parâmetros.

O número médio de inseminações artificiais por égua, o número médio de prenhez por égua, o

número médio de inseminações artificiais por égua vazia, os índices de prenhez no primeiro, segundo e terceiro ciclos estrais e o índice de prenhez total são apresentados na Tabela 3, não tendo havido, entretanto, influência de tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 2. Características do sêmen eqüino após a diluição em meios à base de água de côco e leite em pó desnatado em relação à motilidade progressiva e o vigor, observados em microscopia de contraste de fase de 40 aumentos

Parâmetros	Tratamento*	
	Água de côco (AC)	Leite em pó (LT)
Motilidade Progressiva (%)	65,42%	75,00%
Vigor (Pontos)**	2,92	3,00

Valores não diferem significativamente ($P>0,05$); * valores médios de 22 diluições; ** escala de 1 a 5 pontos

Tabela 3. Influência da diluição do sêmen de eqüino em meios à base de água de côco e leite em pó desnatado na performance reprodutiva de éguas inseminadas, considerando três ciclos estrais e doses inseminantes de 500×10^6 espermatozoides

Parâmetros	Tratamento	
	Água de côco	Leite em pó
Número de Fêmeas	8	8
Número de IA/Égua	1,63	1,88
Prenhez/IA.	0,75	0,60
Número de IA/Égua Prenhe	1,33	1,67
Número de IA/Égua Vazia	2,50	2,50
Índice Prenhez/1º Ciclo	50%	66,6%
Índice Prenhez/2º Ciclo	33,3%	33,3%
Índice Prenhez/3º Ciclo	0,0%	16,6%
Índice Prenhez Total	75,0%	75,0%

IA - Inseminação Artificial; ($P>0,05$)

Pode-se observar que o índice de prenhez na primeira inseminação artificial foi de 66,6% no sêmen diluído em leite em pó desnatado contra 50,0% naquele diluído em água de côco, embora o resultado final tenha mostrado o mesmo índice de prenhez de 75,0%, valor que pode ser considerado bom.

O presente trabalho é único a relatar o uso do diluidor à base de água de côco na inseminação artificial de eqüinos. Neste estudo, ao comparar-se meio à base de água de côco ao leite em pó desnatado, não se observaram diferenças quanto aos resultados da inseminação artificial. Todavia, trabalhando com inseminação de cabras, Nunes (1985), Melo (1990) e Salles (1989) obtiveram índice de fertilidade mais elevado nas inseminações em que o sêmen foi diluído em água de côco ao compararem as mesmas com inseminações efetuadas com sêmen diluído em leite, além de ter proporcionado o nascimento de maior número de fêmeas em relação a machos. Diferentemente dos resultados aqui observados, Pickett *et al.* (1975) e Palmer (1984) observaram, em vários experimentos, que o índice de prenhez de éguas inseminadas com sêmen

diluído em meio à base de leite foi superior a outros diluidores, mas Witte (1989), ao estudar inseminações com sêmen diluído em meio à base de leite e à base de gema de ovos, não observou qualquer diferença.

Carrazoni e Bojanovich (1971), utilizando diluidor à base de água de côco para o sêmen de bovino, obtiveram 65,9% de prenhez, valor um pouco abaixo dos 75,0% obtidos nesse estudo (Tabela 3).

Na espécie eqüina, sob condições de monta natural, aceitam-se como normais os índices de prenhez de 65% (Barbosa e Abreu, 1986), valor um pouco abaixo dos 75% observados neste estudo com inseminação artificial. Em relação aos demais parâmetros estudados (índices de fecundidade no primeiro, segundo e terceiro ciclos estrais; número de inseminações/égua, número de inseminações/égua gestante e número de inseminações/égua vazia), por não ser possível tecer considerações em relação à inseminação e diluidores, far-se-á contraste com inseminações ou montas naturais sem estudos do efeito de diluidores. Nessa linha de estudos, Palhares *et al.* (1997) obtiveram índices de 72,53% de fecundidade no primeiro estro, 75,0% no segundo e 25,0% no terceiro ciclo estral; 2,25 inseminações/égua, 2,16 inseminações/égua gestante e 2,61 inseminações por égua vazia, valores superiores aos deste estudo (Tabela 3); porém, o índice médio de prenhez total foi de 72,86%, no caso desses autores contra 75,0% observados neste estudo (Tabela 3). Silva Filho *et al.* (1998a), trabalhando com sêmen diluído em diversos diluidores (glicina-gema de ovo e Nagase modificado) observaram 58,41% de prenhez no primeiro, 48,34% no segundo e 50,0% no terceiro ciclo estral; 2,39 inseminações/égua, 2,47 inseminações/égua gestante. No presente trabalho, obteve-se 50,0% de prenhez no primeiro ciclo estral com inseminações provenientes do sêmen diluído em meio à base de água de côco e 66,6% com aquelas provenientes de sêmen diluído em meio à base de leite em pó desnatado (Tabela 3).

Em outro trabalho realizado por Silva Filho *et al.* (1997), utilizando sêmen diluído em lactose/gema de ovo, encontraram índice de prenhez de 60,0% no primeiro, 62,5% no segundo e 100,0% no terceiro ciclo estral; 2,07 inseminações/égua, 2,08 inseminações/égua gestante. Carvalho *et al.* (1998), utilizando inseminações com doses contendo 350×10^6 espermatozoides e sêmen diluído em lactose/gema, constataram 54,76% de prenhez média total, 54,55% de prenhez no primeiro ciclo estral, 80,0% no segundo e 25,0% no terceiro.

Ao observar os resultados obtidos por Palhares *et al.* (1997), Silva Filho *et al.* (1997), Silva Filho *et al.* (1998a,b) e Carvalho *et al.* (1998), embora somente Silva Filho *et al.* (1998a) tenha utilizado meio à base de leite em pó desnatado, constata-se que os resultados de índices de prenhez são semelhantes aos encontrados no presente estudo. Por outro lado, os índices relacionados com inseminações/égua, inseminações/égua gestante e inseminações/égua vazia são inferiores aos obtidos nesta pesquisa, o que pode estar relacionado com o tamanho ou a qualidade dos animais utilizados. De qualquer forma, é possível observar que a performance das inseminações com sêmen diluído em meio à base de água de côco foi boa, constituindo-se em mais uma alternativa na inseminação artificial de eqüinos.

No presente trabalho não verificou-se influência ($P>0,05$) do número de inseminações sobre o índice de prenhez (Tabela 3), embora Voss *et al.* (1982) e Pickett *et al.* (1987) tenham observado que, à medida que aumenta o número de inseminações por égua, melhora-se o índice de fecundidade.

Em relação à motilidade progressiva e vigor (Tabela 1), Silva (1990) verificou, em sêmen de ovinos, 64,71% de motilidade espermática progressiva quando o sêmen foi diluído em água de côco e 71,37% quando diluído em meio à base de leite glicosado, que são valores semelhantes aos observados nesse estudo, com sêmen de garanhão. Vários trabalhos de pesquisa de sêmen têm revelado a existência de alta correlação entre a motilidade espermática progressiva e a capacidade fecundante do sêmen, pois esse fator é importante para a fecundação do óvulo (Corteel, 1974; Colas, 1980).

Com base nas condições em que o experimento foi realizado, pode-se concluir que os meios à base de leite em pó desnatado e à base de água de côco foram eficientes para conservar sêmen a fresco para ser utilizado na inseminação artificial de éguas, proporcionando os mesmos índices de prenhez ao final do terceiro ciclo estral.

Referências bibliográficas

- Araújo, A.A. Utilização de água de côco *in natura* com adição de gema de ovo como diluente de congelamento de sêmen caprino. Fortaleza, 1990. (Monografia) - Universidade Federal do Ceará.
- Barbosa, M.J.F.; Abreu, J.V. Alguns parâmetros reprodutivos em cavalos lusitanos e árabes. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, 81(478):147-169, 1986.
- Bayacag, J.C. Availability of carabull semen stored at different temperatures with and without extender. *J. Anim. Sci.*, 1(1):59-73, 1988.
- Blume, H.; Junior Marques, A.P. Avaliação da água de côco no cultivo e criopreservação de embriões de murídeos. *Rev. Brasil. Reprod. Anim.*, 3-4(18):97-104, 1994.
- Carrazzoni, J.A.; Bojanovich, O. Inseminacion artificial con sêmen diluido con água de côco y conservado a temperatura ambiente. *Gaceta Vet.*, 35:72-76, 1971.
- Carvalho, G.R.; Filho, J.M.S.; Lima, M.C.C.; Oliveira, H.N.; Palhares, M.S. Efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20°C e transportado. *Rev. Brasil. Zootec.*, 27(4):695-699, 1998.
- Colas, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le belier Ile-de-france. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20(6):1789-1799, 1980.
- Corteel, J.M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effect du glicose. *Ann. Biol. Bioch. Biophys.*, 14(4B):741-745, 1974.
- Corteel, J.M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: Gall, C. *Goat Production*, London: Academic Press, 1981. p.171-91.
- Foot, R.A.; Bratton, R.W.; Henderson, C.R.; Shantz, E.M.; Pollard, J.K. Survival of bovine spermatozoa at room temperature in citrate and cornell university and tris extenders containing whole and fractionated coconut milk. *J. Anim. Sci.*, 45(11):1383-1391, 1962.
- Fuentes, A.; Serrano, G.; Regueiro, C.; Rodriguez, A.M. Uso de um diluyente experimental en la conservación del sêmen de verraco bajo refrigeración. *Bul. Soc. Vet.*, 4:79, 1989.
- Legaut, G. La inseminación artificial de los porcinos en los países interesantes. *Zootecnia*, 23:11-18, 1974.
- Leipold, S.D.; Graham, J.K.; Squires, E.L.; McCue, P.M.; Brinsko, S.P.; Vanderwall, D.K. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*, 49:1537-1543.
- Lethan, D.S. Cytokinins. *Physiol. Plant.*, 32:66, 1974.
- Nunes, J.F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. Niterói: Epeal, 1985.15p. (Boletim Técnico).
- Melo, A.C.M. Utilização da água de côco e do leite glicosado como diluente para congelação do sêmen caprino. Fortaleza, 1990. (Monografia) - Universidade Estadual do Ceará.
- Palhares, M. S.; Silva Filho, J.M.; Fonseca, F.A.; Oliveira, H.N.; Resende, H.H.C. Efeito de diluidores na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 49(1):39-51, 1997.
- Palmer, E. Factor affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, 1984, Urbana. *Proceedings...* Urbana, University of Illinois, 1984. p.377-379.
- Pickett, B.W.; Burwash, L.D.; Voss, J.L.; Back, D.G. Effect of seminal extenders on equine fertility. *J. Anim. Sci.*, 40:1136-1143, 1975.
- Pickett, B.W.; Squires, E.L.; McKinnon, A.O. Procedures

- for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Fort Collins. Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory. 1987. 37p. (Bulletin, 3)
- Salles, M.G. Água de côco (*Cocus nucifera L.*) in natura e sob a forma de gel estabilizada, com diluidor do sêmen caprino. Porto Alegre, 1989. (Master's Thesis in Animal Reproduction) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Silva Filho, J.M.; Fonseca, F.A.; Palhares, M.S.; Oliveira, H.N. Fertilidade do sêmen eqüino diluído, resfriado e transportado. *Rev. Brasil. Zootec.*, 26(6):1134-1141, 1997.
- Silva Filho, J.M.; Fonseca, FA.; Palhares, M.S.; Valle Filho, V.R.; Oliveira, H.N.; Resende, H.H.C. Efeito de diferentes diluidores na fertilidade de éguas de diferentes haras inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado em container especial, *Rev. Bras. Zootec.*, 27(1):75-86, 1998a.
- Silva Filho, J.M.; Valle, G.R.; Saturnino, H.M.; Palhares, M.S. Influência do intervalo entre a inseminação artificial com sêmen diluído resfriado e transportado e a ovulação sobre a fertilidade de éguas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 50(5):563-568, 1998.
- Silva, I.S.A. Utilização de água de côco e do leite glicosado como diluente do sêmen ovino. Fortaleza, 1990. (Monografia) - Universidade Federal do Ceará.
- Sorensen, A.M, Jr. *A Laboratory manual for animal reproduction*. 4.ed. Boston, Massachusetts: American Press, 1979. 154 p.
- Toniolli, R.; Bussère J.; Courot, M.; Magistrini, M.; Combasnous, Y. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36:503-511, 1996.
- Toniollo, R.; Mesquita, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de côco estabilizada e com BTS. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 14(4):249-254, 1990.
- Voss, J.L.; Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Burwash, L.D. Effect of number and frequency of inseminations on fertility of mares. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 3, 1982, Sydney. *Proceedings...* Sydney: Naab, 1982. p. 53-57.
- Witte, A. Untersuchungen zur Flüssig Konservierung von prdesperma unter veruwendung Verschiedever Verdünungsmethoden Labor-und Felduntersuchungen. Hannover, 1989. (Thesis-DMV) - Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Received on June 29, 1999.

Accepted on September 02, 1999.