

ADEMAR SPALLINI
MÉDICO VETERINÁRIO
F.M.V. - USP

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS DILUIDORES
CITRATO-GEMA DE ÔVO DE GALINHA E CITRATO-GEMA DE
ÔVO DE CODORNA NA CONSERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor.

PIRACICABA
Estado de São Paulo
1971

AGRADECIMENTOS

Orientador - Prof. Dr. Aristeu Mendes Peixoto

Análises Estatísticas - Prof. Dr. Roland Vencovsky

nossos mais sinceros agradecimentos, extensivos também aos amigos que, com dedicação e amizade, apresentaram contribuição de inestimável valor para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DAS TABELAS	IV
LISTA DOS QUADROS	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Coleta de Sêmen	14
3.2. Exame do Sêmen Puro	15
3.3. Preparo dos Diluidores	15
3.4. Diluição e Conservação do Sêmen	16
3.5. Delineamento Experimental	17
3.6. Análise Estatística	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. RESUMO E CONCLUSÕES	31
6. SUMMARY AND CONCLUSIONS	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DAS TABELAS

	Pág.
1. Estimativas de $\hat{\beta}$ dos tratamentos A e B nos 80 blocos	22
2. Estimativas de $\hat{\alpha}$ dos tratamentos A e B nos 80 blocos	23
3. Notas médias de motilidade dos oitenta blocos para os dois tratamentos nas diferentes horas	25

LISTA DOS QUADROS

	Pág.
1. Análise ponderada da variância das estimativas $\hat{\alpha}$	24
2. Análise ponderada da variância das estimativas $\hat{\beta}$	24
3. Composição química dos constituintes maiores das ge- mas de ovo de galinha (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949) e de codorna (MORAES, 1970)	27
4. Aminoácidos contidos nas proteínas das gemas de ovo de galinha, segundo SCOTT, HESHEBIN e YOUNG (1969) e de codorna, segundo ARZOLLA, (1968)	28

1. INTRODUÇÃO

Estudos relativos ao valor da gema do ovo de galinha, como meio de diluição para sêmen bovino, desempenharam um papel transcendental na difusão do processo de inseminação artificial em todo o mundo, nos últimos trinta anos. Isso veio permitir a execução de um programa de melhoramento no rebanho bovino, em larga escala e a prazo curto, sobretudo em países zootènicamente mais evoluidos.

Inúmeros experimentos realizados em tórno da adição da gema do ovo de galinha aos diluidores de sêmen bovino, permitem afirmar que ela mantém uma efetiva ação protetora sôbre os espermatozóides, resguardando-os dos efeitos nocivos das mudanças de temperatura pelo resfriamento e do choque ocasionado pela diluição, garantindo assim a sua conservação.

A codorna doméstica tem sido, desde vários anos, intensamente criada em vários países em bases econômicas para produção de carne e

ovos. Seu ciclo de vida curto, sua elevada resistência à moléstias, as sim como seu baixo custo de manutenção, tornaram-na também, largamente aceita como animal de laboratório.

A importância que passou, então, a receber a criação desta ave, aliada à sua alta capacidade de postura, atraiu nossa atenção sô- bre a possibilidade do emprêgo da gema do seu ovo como componente de meio diluidor de sêmen. Além disso, sua composição quantitativa em determinados componentes difere das demais gemas até agora utilizadas nos diluidores de sêmen. (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949 e SCOTT, NESHEIM e YOUNG, 1969).

A finalidade do presente trabalho é realizar estudo compara- tivo do diluidor citrato de sódio-gema de ovo de galinha com um dilui- dor citrato de sódio-gema de ovo de codorna, na conservação de sêmen bo- vino.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Foi provavelmente Spalanzani, em 1700 (BONADONA, 1957) que pela primeira vez realizou estudos da conservação de sêmen, utilizando extratos orgânicos, líquidos orgânicos e clara de ovo. Embora tenha sido este pesquisador o precursor na tentativa da utilização de ovo na conservação do sêmen, os seus resultados não lograram êxito desde que sua atenção estava dirigida apenas à clara e não à gema, a qual posteriormente mostrou ser elemento essencial nos meios diluidores de sêmen.

Duzentos anos depois, Ivanov (BRAVO, 1944) com a finalidade de inseminar maior número de fêmeas, se propôs à diluição do material espermático, em soluções salinas e solução fisiológica, aumentando, dessa maneira, o volume do líquido seminal. Por ter este autor conseguido estender o período de sobrevivência dos espermatozoides diluídos nessas soluções, muitos outros autores se propuzeram, em seguida, a estudar a diluição do sêmen em soluções semelhantes, até que POYARKOFF (1916)

verificando que a adição de glicose favorecia a vitalidade dos espermatozóides, adicionou-a às soluções de cloreto de sódio, estabelecendo as melhores proporções entre a concentração deste açúcar e a da solução salina.

Os diluidores utilizados a partir deste período continuaram a servir apenas para aumentar o volume do sêmen, porém, não eram ainda eficazes em relação à conservação de sua capacidade fecundante, apesar de Milovanov e Selivanova, em 1932, terem apontado os efeitos benéficos da adição da lecitina contida na gema de ovo ao meio diluidor. A observação da conservação da capacidade fecundante dos espermatozóides neste meio não mereceu, entretanto, maior atenção dos próprios autores.

SCHERSTEN (1936) por haver determinado ácido cítrico na composição do esperma humano e de animais, adicionou citrato a um diluente Ringer-fosfato. Obteve desta forma uma maior vitalidade dos espermatozóides conservados nesse novo meio.

Com a finalidade de evitar a produção de ácido láctico pelos espermatozóides, o qual determina sua própria intoxicação, MILOVANOV e cols. (1939) tentaram reduzir a sua atividade metabólica por imobilização. Para isso utilizaram-se para conservação de sêmen, de um meio diluente fosfato adicionado de 1% de gelatina. O sêmen assim tratado, que era mantido em cápsula de gelatina, a qual se fundia por ocasião da inseminação sob ação da temperatura do corpo da fêmea, apresentou um índice de fertilidade igual àquele obtido pela conservação em apenas diluente fosfato.

Baseando-se nos trabalhos de MILOVANOV e SELIVANOVA (1932), que haviam verificado a ação protetora exercida pela lecitina da gema de ovo sobre a bainha protéica dos espermatozóides, PHILLIPS (1939) e PHILLIPS e LARDY (1940) prepararam um novo diluidor para sêmen de touro, composto de uma solução aquosa de fosfatos de sódio e de potássio, adicionado de gema de ovo de galinha. A partir desse momento, a gema de ovo de galinha passou a receber grande atenção dos pesquisadores como componente de diluidores de sêmen, pois, pela sua referida ação protetora sobre os espermatozóides, tornava-os mais resistentes tanto aos efeitos nocivos de mudanças de temperatura pelo resfriamento, como ao choque provocado pela diluição, e determinando, assim, um prolongamento de sua vitalidade.

KNOOP (1941) observou que o período de sobrevivência dos espermatozóides de touro que era de 14 a 18 dias nas amostras testemunhas, seria estendido para um período de 18 a 30 dias pela adição de 1% de gelatina a um meio diluente fosfato-gema.

Em 1941, SALISBURY, FULLER e WILLET apresentaram um novo diluidor no qual substituíram a solução tampão de fosfatos adicionada à gema de ovo, por uma solução de citrato de sódio, baseados na observação de SCHERSTEN, (1936); pela substituição resultou melhor visibilidade dos espermatozóides ao microscópio, devido a dispersão das gotas de gordura e a fixação dos ions cálcio e outros ions metálicos da gema de ovo. Este novo diluidor, o citrato de sódio-gema de ovo, é universalmente empregado, servindo como padrão de comparação nos trabalhos de diluição do sêmen.

UNDERBJERG, DAVIS e SPANGLER (1942) tentaram comparar as fertilidades de sêmen bovino diluído em meio de fosfato-gema e em leite esterilizado, com a fertilidade do sêmen sem diluir. Os resultados, entretanto, não puderam ser confrontados desde que o quociente de diluição não foi o mesmo para os três meios.

Investigando as razões do aumento de vitalidade de espermatozoides, obtido no meio diluidor de Phillips adicionado de 1% de gelatina, KNOOP e KRAUSS (1944) estudaram a ação individual de cada um dos aminoácidos contidos na gelatina. Concluíram que a presença de um dos dois aminoácidos, glicina ou prolina era responsável por aquele efeito. Por outro lado, trabalhos realizados por FLIPSE e ALMQUIST (1956), STROM (1956) e HEIROSE, STEWART e BRUCE (1958), adicionando glicina em várias proporções a meios diluentes à base de leite e fosfato-gema, não confirmaram aquela observação.

SALISBURY, ZELAYA e VANDEMARK (1945), evidenciaram, que nem todos os extratos orgânicos constituem-se em bons diluentes para sêmen, quando ensaiando extratos de embriões de pintos adicionados ao diluidor citrato-gema não obtiveram êxito, não obstante os resultados favoráveis anteriormente obtidos com este mesmo material por FRANK, SMITH e EICHORN (1941).

WILCZINSKA e LAURANS (1947), TOSIC e WALTON (1947), KAMPSCHMIDT e cols. (1951) e KOK (1953), reafirmaram o valor da gema de ovo de galinha como componente dos meios de conservação do sêmen, devido ao seu conteúdo em lecitina, lipoproteínas, sais minerais, açúcares,

vitaminas e ao índice de viscosidade que ela comunica ao diluente, o qual é benéfico às células espermáticas.

BASU e BERRY (1948), VENKATASWAMI, RAO e HANUMANTHA (1961), procurando substituir gema de ovo de galinha por gemas de ovos de peru e pata como constituintes de meios diluidores de sêmen, observaram que, sem qualquer desvantagem, as gemas de ovos daquelas aves poderiam substituir a de galinha nos diluentes contendo citrato.

Foi objeto de investigação dos pesquisadores SWANSON (1949), STEWART, NEIROSE e WILSON (1950), OLDS e cols. (1951), ALMQUIST (1951, b), BLACKSHAW e EMMENS (1953), a proporção de gema de ovo a ser acrescentada às soluções bases dos diluidores. Como resultado dessas pesquisas, concluíram que a redução dessa proporção de 1:1 a 1:7, não traria prejuízo à conservação do sêmen.

A influência da adição de substâncias energéticas tais como glicose, frutose, galactose e sacarose aos meios diluidores contendo gema de ovo, foi atentamente estudada por vários autores, como PURSLEY e cols. (1950), KAMPSCHMIDT e cols. (1951), KOK (1952), NEIROSE e STEWART (1956), KOK e VANDIERTEN (1957) e OHMS e WILLET (1958). Os resultados dessas pesquisas levaram porém, às mais variadas conclusões, as quais ora negavam, ora afirmavam a vantagem de inclusão dos referidos açúcares aos diluidores.

Tentativas foram feitas para reduzir o custo dos diluentes seminais pelo uso do ovo total (gema e albumen) pelos pesquisadores DUNN e BRATTON (1950), HENDRIKSE e JOLING (1954). Estes autores verificaram neste caso que a taxa de fertilidade se apresentava ligeiramente

inferior àquela obtida em diluentes contendo apenas gema.

HURST (1951) realizou estudos comparativos entre o diluidor citrato-gema preparado no momento do uso e o citrato-gema conservado em geladeira (4 a 7°C) durante 5 a 7 dias, não notando qualquer inconveniente no uso do diluidor conservado para a preservação do sêmen.

SANFILE (1952) e WEISS (1952) conseguiram uma média de concepção mais alta com o diluidor citrato-gema do que com o leite desnatado em pó. Entretanto, os resultados de observações comparativas feitas por VIACHOS (1953) e FIORENTINO (1952), no mesmo sentido, foram mais favoráveis ao leite.

VOICANI e BERMAN (1953) relataram a eficácia de sangue desidratado, plasma e sêro de sangue como componentes do diluidor citrato-gema quando estes materiais provinham do próprio animal doador do sêmen. Assim também, os resultados obtidos por VEITENHEIMER (1953) permitiram-lhe concluir que o sangue do próprio doador elevou o índice de fertilidade de seu sêmen quando adicionado ao diluidor citrato-gema.

THACKER e AIMQUIST (1953), FLERCHINGER, ERB e EHLERS (1953), AIMQUIST, FLIPSE e THACKER (1954) e BOLTON e DURRIL (1954) indicaram que melhores resultados na conservação do sêmen foram conseguidos com o uso do diluidor citrato-gema do que com o leite desnatado em pó. Porém, BONADONIA (1954) encontrou mais vantagens no emprêgo do leite desnatado, em pó.

WILLIAMS, GREEN e BALTZER (1954) relataram que sêmen diluído em leite em pó desnatado apresentava uma média de longevidade maior

do que em meio citrato-gema; SIMUNIC (1956) e KERRUISH (1956) indicaram melhores resultados para o diluidor citrato-gema; SZUMOWSKY, MARKOVIC e CANO (1956) encontraram maior longevidade quando empregaram leite em pó como diluente; e, MELROSE (1956) encontrou resultado equivalente na conservação do sêmen com qualquer um dos dois diluidores.

Para estudar a influência do tempo de armazenamento da gema sobre a vitalidade dos espermatozoides conservados em meio citrato-gema, NEGLIOGLI, POZZI e OLGIATI (1955), utilizaram na composição de meios diluentes, gemas provenientes de ovos armazenados por períodos de tempo desde um até setenta dias. Concluíram de seu trabalho que um armazenamento tão longo quanto 25 dias não alterava as características favoráveis da gema como componente do meio diluente.

CHIEFFI e MASOTTI (1959,a) estudando novas técnicas para dilução de sêmen bovino, indicaram um diluidor composto de três partes de suco de tomate e uma parte de gema de ovo além de antibióticos, denominado "GETO", que proporcionou excelente índice de atividade cinética após cinco dias de conservação em geladeira.

CHIEFFI e MASOTTI (1959,b) apresentaram um novo diluidor de nominado "GECO", constituído de três partes de água de côco, uma parte de gema de ovo e antibióticos. Este novo meio proporcionou aos espermatozoides um nível de motilidade superior ao diluente citrato-gema.

CHIEFFI e REIS (1960) prepararam um diluidor denominado "NOVO GETO", constituído de 100 partes de suco de tomate, 10 partes de sêro de leite e 20 partes de gema de ovo, antibióticos e glicerol (10%)

do volume total). Comparando "GECO" com "NOVO GECO" obtiveram os autores melhores resultados com êsse último, revelados pelos exames da motilidade e do índice de fertilidade.

VENKATASWAMI, RAO e HANUMANTHA (1961) estudando o efeito da adição de água de côco verde ao diluente citrato-gema, verificaram maior motilidade dos espermatozóides neste diluente quando confrontado com o testemunha. Neste mesmo trabalho verificaram que água de côco verde sem adição de outros compostos não se constitui em diluente satisfatório para sêmen.

MOLINARI (1961) assinalou a superioridade dos diluidores preparados com suco de tomate (GECO e NOVO GECO) sôbre o diluidor citrato-gema, com relação ao nível de motilidade dos espermatozóides, principalmente a partir do quarto dia de conservação.

BONADONA, FORNAROLI e POZZI (1961) acrescentaram água mineral gasosa, comercial, a um diluidor contendo suco de tomate e gema de ovo preconizado por CHIEFFI e MASOTTI (1959,a), não verificando nenhuma vantagem em função dessa adição.

MASOTTI e BARNABE (1962,a, 1962,b) empregaram infusões de fêlhas fenadas de alfafa ou de guandú e gema de ovo, como diluidor para sêmen de touros. Em material conservado durante 240 horas os autores encontraram espermatozóides vivos na proporção de 30% (alfafa) e 40% (guandú).

NORMAN e cols. (1962) confrontando diversos diluidores à base de citrato-gema com diluidores à base de água de côco e leite

desnatado observaram que os primeiros mantinham a capacidade fecundante dos espermatozóides, durante uma semana de conservação à temperatura ambiente, tão bem quanto os segundos à temperatura de 4 a 7°C.

BONADONA (1963) substituiu por água mineral com e sem gás a água destilada do diluidor citrato-gema, conservando-o a 4°C, o que não alterou a conservação do sêmen e o seu índice de fertilidade.

SAMALA, TUANQUI e IU (1964) tentaram a conservação do sêmen pela sua inoculação em gema de ovos não fertilizados. A conservação por esse processo não foi favorecida à temperatura ambiente, porém, foi eficiente até 12 dias em condições de refrigeração, apresentando 70% de motilidade.

NASOTTI (1964) preparou um novo diluidor para sêmen de touro: gema de ovo-sêro de leite de soja, e comparou-o com o diluidor citrato-gema, conservando ambos em geladeira por períodos variando de 24 a 127 horas. Observou uma superioridade do diluente sêro de soja-gema sobre o diluente citrato-gema revelada por índice de fertilidade 10% mais elevado.

Com a finalidade de prolongar a longevidade dos espermatozóides, melhorar a capacidade fecundante do sêmen ou impedir contaminação bacteriana, várias substâncias têm sido adicionadas aos meios diluidores de sêmen.

A partir da observação de SHETTLES (1940) de que sulfamidas apresentavam-se inócuas ao sêmen humano, vários autores pesquisaram o efeito destes quimioterápicos em sêmen bovino.

DUNN e cols. (1942) adicionando sulfanilamida em diluente de sêmen de touro, verificaram a sua ação favorável sobre a vitalidade dos espermatozóides.

KNODT e SALISBURY (1946) e SALISBURY e KNODT (1947) adicionando sulfanilamida ao diluidor citrato-gema, na conservação de sêmen de touros, obtiveram uma taxa de fertilidade mais alta em relação ao mesmo diluidor sem sulfanilamida.

ALMQUIST e cols. (1946) foram os primeiros a relatar os efeitos dos antibióticos adicionados aos diluidores de sêmen de touro. Verificaram que, embora estes produtos não apresentassem influência favorável sobre a motilidade e poder fecundante dos espermatozóides, impediam a multiplicação bacteriana, o que conseqüentemente favorecia a conservação do sêmen. Embora houvessem observado que níveis superiores a 750 unidades de penicilina por ml de diluidor fossem prejudiciais à vitalidade espermática sua observação não foi confirmada nos trabalhos posteriores de ALMQUIST (1949,a) e MIXNER (1949,a), que relataram uma ação favorável de 1000 unidades de penicilina por ml de diluidor citrato-gema sobre o índice de fertilidade do sêmen de touros de baixa fertilidade. Estas observações foram posteriormente confirmadas pelos resultados obtidos por FOOTE e BRATTON (1950) com o diluidor citrato-gema adicionado de 1000 unidades de penicilina por ml de diluente. Estes autores observaram também um aumento do índice de fertilidade pela adição do diluidor citado de 1000 ug de estreptomicina por ml. resultado este anteriormente obtido por ALMQUIST (1949,b) e EASTERBROOKS e cols.(1949), mas não acusado por MIXNER (1949,b).

Com relação à eficiência de antibióticos sobre organismos patógenos específicos, AINQUIST (1954) constatou que a ação de estreptomina é independente da concentração dos microrganismos presentes no material espermático enquanto que a ação da penicilina está diretamente relacionada com essa concentração. Em ambos os casos, entretanto, estes antibióticos inibem a população de Vibrio fetus presente no sêmen diluído de maneira usual. Estes mesmos antibióticos de acordo com RHOADES e VANDEMARK (1958) mostraram-se eficazes em relação a Brucella abortus, Leptospira pomona e Vibrio fetus quando adicionados ao diluidor IVT (Illinois Variable Temperatura) utilizado na conservação de sêmen, à temperatura ambiente.

Para evitar a intoxicação dos espermatozoides, pela água oxigenada formada em meio contendo gema de ovo, pela desaminação de seus aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina, VANDEMARK, SALISBURY e BRATTON (1949), TOSIC e WALTON (1950), e HAPS (1961), adicionaram catalase aos diluidores de sêmen bovino sem ter, contudo, obtido resultados satisfatórios.

A utilização de tranquilizantes com a finalidade de estender a sobrevivência de espermatozoides foi sugerida pela primeira vez por Milykovic e col. (NISS FILHO, 1970) com base em resultados obtidos pela adição de clorpromazina a diluidores de sêmen.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de Sêmen

As amostras de sêmen utilizadas na presente investigação foram obtidas pelo método da vagina artificial (modelo dinamarquês), de acôrdo com a técnica convencional.

O sêmen foi coletado duas vezes por semana, sempre pela manhã, num total de oitenta coletas, ou seja, durante dez meses. Imediatamente após a ejaculação, o tubo coletor era retirado e a seguir mergulhado em recipiente contendo água à temperatura de 30 a 35°C.

No presente trabalho, usou-se como doador de sêmen um único animal, da raça Flamengo, com sete anos de idade, pertencente ao rebanho do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, mantido em regime de estabulação, alimentando-se de forragens verdes com suplementação de concentrados, e com exercícios normais em piquete anexo. Durante o tempo em

que esteve submetido à coleta, o animal não revelou problemas de saúde, e manteve atividade reprodutiva normal em serviços de cobertura junto ao rebanho.

3.2. Exame do Sêmen Puro

Após a coleta, o material era imediatamente submetido aos exames de rotina e os caracteres físico-químicos, compreendendo determinação do volume, da cor, da densidade, do movimento e do pH. do ejaculado, eram devidamente anotados. Os exames microscópicos para avaliação da densidade e motilidade massal, foram realizados em gota pendente, em espermotermo.

3.3. Preparo dos Diluidores

O diluidor citrato-gema de ovo de codorna foi preparado de acordo com SALISBURY, FULLER e WILLET (1941), pela adição de 20 ml de gema de ovo de codorna em 100 ml de uma solução aquosa de citrato de sódio dihidratado a 2,9% (p/v), cujo pH foi corrigido a 6,8 - 7,0 com uma solução de ácido cítrico a 40%. A água utilizada nesta solução foi previamente bidestilada e esterilizada. O diluidor assim obtido foi adicionado de 1.000 U de penicilina sódica e 1.000 mg de sulfato estreptomicina por mililitro, procedendo-se, em seguida, a homogenização em agitador elétrico.

O diluidor citrato de sódio-gema de ovo de galinha foi preparado da mesma forma.

Ambos os diluidores foram assim obtidos com algumas horas de antecedência à utilização, para facilitar a eliminação dos sólidos das gemas por decantação.

As gemas utilizadas eram sempre de ovos com 10-15 horas. Antes de romper a casca, os ovos eram lavados com água de sabão neutro e escovados e, em seguida, friccionados com algodão embebido em álcool 95°.

Os ovos de codorna provieram de quatro codornas, com dois meses de idade, da variedade asiática Coturnix Coturnix japônica, adquiridas na chácara Cordobras. As codornas permaneceram durante todo o tempo do experimento no laboratório de Inseminação Artificial do Departamento de Zootecnia da ESALQ, em gaiolas metálicas individuais, mantidas em condições de higiene, a mais perfeita possível. A alimentação, fornecida à vontade, foi a mesma ração balanceada usada para pintos, acrescida de verde, geralmente almeirão.

Os ovos de galinha provieram do Aviário do Departamento de Zootecnia da ESALQ.

3.4. Diluição e Conservação do Sêmen

As diluições foram feitas em cada diluente, imediatamente após os exames dos característicos físico-químicos e microscópicos do sêmen.

Cada diluidor foi juntado ao sêmen lentamente, ambos à mesma temperatura, de preferência entre 25 e 30°C. Com um cuidadoso e

delicado movimento de rotação, sêmen e diluidor eram inteiramente misturados.

Tôdas as diluições foram feitas na proporção de 1:4 (1 ml de sêmen para 4 ml de diluidor).

Concluída a diluição, o material era distribuído em tubos de ensaio de vidro de 45 mm. de comprimento e 10 mm. de diâmetro, previamente esterilizados, colocando-se em cada tubo 1,5 ml de sêmen diluído sob uma camada de vaselina líquida; os tubos foram fechados com rólha de cortiça parafinada e devidamente identificados. Assim acondicionado, o material era submetido a resfriamento lento e progressivo, e mantido em geladeira entre 4 e 7°C.

3.5. Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com parcelas subdivididas no tempo.

Cada uma das 80 amostras, coletas de sêmen, constituiu um bloco; cada bloco, por sua vez, ficou constituído de duas parcelas, uma para cada tratamento (citrato-gema ôvo de galinha e citrato-gema ôvo de codorna). Em cada parcela foram feitas 15 observações sôbre a motilidade dos espermatozóides em intervalos de 24 horas, sendo que essas 15 observações constituiram a subdivisão das parcelas, ou sub-parcelas.

Entretanto, várias vêzes, o número máximo de sub-parcelas não foi atingido, por não terem sido feitas observações em determinados períodos. Desta maneira, cada parcela ficou constituída de 10 a 13

sub-parcelas, número julgado suficiente para manter a sensibilidade do ensaio. A perda de sub-parcelas não ocorreu sempre no mesmo período em cada bloco.

As avaliações da motilidade, feitos sempre pelo autor, receberam notas de zero a cem, com intervalos de dez unidades, recebendo a nota zero a observação em que a motilidade foi nula, e nota cem à motilidade julgada ótima, critério esse mencionado por SALISBURY e VANDEMARK (1961) como sendo o que apresenta coeficiente de variação mais baixo, cerca de 15%, em 68 touros, garantindo, pois, boa precisão nas observações.

3.6. Análise Estatística

Pela falta de sub-parcelas nos diferentes blocos e pela sua ocorrência em períodos diferentes, não foi possível empregar o esquema padrão de análise da variância tal como mostrado por STEEL e TORRIE (1960). Portanto, para comparar os tratamentos foi conduzida uma análise da variância adaptada ao tipo de ensaio em questão.

Considerou-se que os dados de cada parcela poderiam ser definidos por uma linha de regressão a qual relaciona a motilidade com o tempo. Cada um dos dois tratamentos pode pois, ser representado por 80 linhas de regressão. Estabeleceu-se, então, que os dois tratamentos teriam o mesmo efeito sobre a motilidade se tivessem linhas de regressão iguais, ou seja, o mesmo ponto de inserção e os mesmos coeficientes de regressão.

Observações preliminares feitas por meio de gráficos levaram à conclusão de que a regressão entre motilidade e tempo foi linear, o que reduziu a dois, o número de parâmetros a estimar em cada parcela.

Empregou-se então o modelo $Y_i = \alpha + \beta X_i + \Sigma_i$ em cada parcela, sendo Y a nota dada e X o tempo correspondente a zero, 24, 48, ... 336 horas.

Para a estimação dos parâmetros α e β os dados obtidos (notas dadas) foram transformados pelo processo da raiz quadrada e os valores de X (tempo) divididos por 24. Dessa forma, cada parcela ficou representada por duas estimativas ou seja $\hat{\alpha}$ e $\hat{\beta}$, as quais foram submetidas à análise.

Tais análises foram conduzidas ponderando-se as estimativas devido às falhas de sub-parcelas. A ponderação se fez pelo processo recomendado por STEEL e TORRIE (1960), em que os pesos vêm a ser o inverso da variância das estimativas. Admitiu-se ainda que a variância devida aos desvios da regressão foi homogênea de uma parcela para outra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas $\hat{\beta}$ e $\hat{\alpha}$ relativas aos tratamentos A e B nos 80 blocos são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

As análises da variância das estimativas $\hat{\beta}$ e $\hat{\alpha}$ estão contidas nos Quadros 1 e 2.

Em virtude da não significância estatística dos valores de F para tratamentos nas análises realizadas, verificou-se que os dois tratamentos podem ser considerados como tendo efeito semelhante sobre a motilidade dos espermatozoides.

Para melhor visualização da semelhança entre o efeito dos dois tratamentos são apresentadas, na Tabela 3, as notas médias de motilidade dos oitenta blocos, para os dois tratamentos nas diferentes horas. Essas notas médias estão representadas no Gráfico 1, onde pode-se observar que as médias iniciais da motilidade das 80 amostras de sêmen para os dois tratamentos foram praticamente iguais, isto é, 78,0% para

o diluidor citrato-gema de ovo de galinha e 78,2% para o diluidor citrato-gema ovo de codorna. Durante todo período de conservação, a motilidade decresceu igualmente para ambos os diluidores, alcançando ao final de 336 horas, os valores médios de 14,5% e 14,6% respectivamente para os diluentes com o ovo de galinha e o de codorna.

Tais resultados são comparáveis com os de SAMARA, TUANQUI e IJ (1964), que obtiveram 70% de motilidade.

Segundo ROMANOFF e ROMANOFF (1949), as lecitinas constituem diferentes proporções dos fosfolipídeos totais contidos nos ovos de várias espécies de aves. Com relação aos ovos de galinha e codorna, a análise das gemas desidratadas revelou que a lecitina apresenta 69% dos fosfolipídeos para a galinha e 54% para a codorna.

Os dados obtidos sugerem, no caso, não ter havido influência dos fosfolipídeos, em maior porcentagem na gema de ovos de galinha. Portanto, embora com menor porcentagem de lecitina o de codorna, manteve ainda o seu efeito protetor sobre a bainha protéica dos espermatozóides conforme MILOVANOV e SELIVANOVA (1952).

Tabela 1. Estimativas de $\hat{\beta}$ dos tratamentos A e B nos 80 blocos.

Blocos	Tratamento A	Tratamento B	Blocos	Tratamento A	Tratamento B
1	- 0,1972	- 0,2170	41	- 0,3765	- 0,3765
2	- 0,2648	- 0,2824	42	- 0,4263	- 0,4263
3	- 0,3452	- 0,3520	43	- 0,3638	- 0,3638
4	- 0,2467	- 0,2685	44	- 0,4458	- 0,4458
5	- 0,1975	- 0,2124	45	- 0,4081	- 0,4081
6	- 0,2913	- 0,3018	46	- 0,3754	- 0,3754
7	- 0,2794	- 0,2887	47	- 0,3548	- 0,3391
8	- 0,2900	- 0,2996	48	- 0,4064	- 0,4064
9	- 0,3017	- 0,3017	49	- 0,3790	- 0,3790
10	- 0,3766	- 0,3766	50	- 0,3490	- 0,3490
11	- 0,3437	- 0,3437	51	- 0,3495	- 0,3495
12	- 0,3877	- 0,3877	52	- 0,3853	- 0,3853
13	- 0,2507	- 0,2649	53	- 0,3734	- 0,3734
14	- 0,4096	- 0,4075	54	- 0,4373	- 0,4373
15	- 0,3070	- 0,3345	55	- 0,4099	- 0,4188
16	- 0,4202	- 0,4053	56	- 0,3980	- 0,3980
17	- 0,3986	- 0,3986	57	- 0,3160	- 0,3275
18	- 0,3848	- 0,3848	58	- 0,3602	- 0,3602
19	- 0,3622	- 0,3488	59	- 0,2934	- 0,2934
20	- 0,3859	- 0,3859	60	- 0,2459	- 0,2459
21	- 0,3829	- 0,3822	61	- 0,2709	- 0,2709
22	- 0,3984	- 0,3984	62	- 0,3564	- 0,3564
23	- 0,2999	- 0,2999	63	- 0,3763	- 0,3763
24	- 0,3625	- 0,3635	64	- 0,3857	- 0,3762
25	- 0,2105	- 0,2105	65	- 0,3819	- 0,3819
26	- 0,3301	- 0,3301	66	- 0,4499	- 0,4499
27	- 0,3774	- 0,3774	67	- 0,3816	- 0,3816
28	- 0,3288	- 0,3288	68	- 0,3746	- 0,3746
29	- 0,2945	- 0,2945	69	- 0,3785	- 0,3344
30	- 0,3920	- 0,3920	70	- 0,4083	- 0,4083
31	- 0,3221	- 0,3221	71	- 0,3258	- 0,3287
32	- 0,4113	- 0,4113	72	- 0,4409	- 0,4409
33	- 0,3151	- 0,3151	73	- 0,2342	- 0,2342
34	- 0,3536	- 0,3536	74	- 0,2469	- 0,2469
35	- 0,3533	- 0,3533	75	- 0,2548	- 0,2548
36	- 0,4101	- 0,4101	76	- 0,3117	- 0,3117
37	- 0,3509	- 0,3509	77	- 0,2909	- 0,2909
38	- 0,3694	- 0,3694	78	- 0,3649	- 0,3649
39	- 0,3679	- 0,3679	79	- 0,2844	- 0,2844
40	- 0,3761	- 0,3761	80	- 0,3267	- 0,3267

Blocos= Coletas de Sêmen

Tratamento A = Citrato-gema ôvo de galinha

Tratamento B = Citrato-gema ôvo de codorna.

Tabela 2. Estimativas de $\hat{\alpha}$ dos tratamentos A e B nos 80 blocos.

Blocos	Tratamento A	Tratamento B	Blocos	Tratamento A	Tratamento B
1	9,7288	9,7990	41	9,2278	9,2278
2	9,8570	10,0398	42	9,7632	9,7632
3	9,2390	9,3327	43	8,9280	8,9280
4	9,2961	9,3283	44	9,3496	9,3496
5	9,1800	9,3231	45	9,1248	9,1248
6	8,7732	8,8968	46	8,4167	8,4167
7	9,3220	9,4327	47	8,3271	8,1685
8	9,4669	9,5801	48	8,8632	8,8632
9	9,4107	9,4107	49	9,2996	9,2996
10	9,6477	9,6477	50	7,8980	7,8980
11	8,7658	8,7658	51	8,5435	8,5435
12	9,3487	9,3487	52	9,0437	9,0437
13	8,8416	8,8731	53	8,8630	8,8630
14	10,1140	10,1611	54	9,4758	9,4758
15	9,5427	9,8135	55	9,4808	9,6411
16	9,2506	9,0383	56	8,5547	8,5547
17	8,9505	8,9505	57	9,3860	9,3469
18	9,2924	9,2924	58	9,2491	9,2491
19	9,5517	9,4463	59	8,6530	8,6530
20	9,1194	9,1194	60	9,1365	9,1365
21	8,8093	8,8093	61	9,0668	9,0668
22	8,7839	8,7839	62	9,1132	9,1132
23	8,9826	8,9826	63	9,6606	9,6606
24	8,9640	8,9640	64	9,3525	9,3544
25	9,2626	9,2626	65	9,2748	9,2748
26	9,2468	9,2468	66	9,9701	9,9701
27	9,2477	9,2477	67	9,2746	9,2746
28	9,4020	9,4020	68	9,5320	9,5320
29	8,8983	8,8983	69	9,3778	9,2408
30	9,3829	9,3829	70	9,0992	9,0992
31	8,9382	8,9382	71	9,1635	9,1216
32	9,0778	9,0778	72	9,1700	9,1700
33	9,6444	9,6444	73	9,6810	9,6810
34	9,2144	9,2144	74	9,6029	9,6029
35	8,8177	8,8177	75	9,0794	9,0794
36	8,9476	8,9476	76	9,4561	9,4561
37	8,9807	8,9807	77	9,2937	9,2937
38	8,9487	8,9487	78	9,6146	9,6146
39	9,4665	9,4665	79	9,1913	9,1913
40	9,1071	9,1071	80	8,9280	8,9280

Blocos = Coletas de Sêmen

Tratamento A = Citrato-gema ôvo de galinha

Tratamento B = Citrato-gema ôvo de codorna.

Quadro 1. Análise ponderada da variância das estimativas $\hat{\alpha}$

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	79	262,1538	3,3184	-
Tratamentos	1	0,0184	0,0184	1,05 n.s.
Erro	79	1,3840	0,0175	-
Total	159	263,5562	-	

Quadro 2. Análise ponderada da variância das estimativas $\hat{\beta}$

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	79	12,3751	0,1566	-
Tratamentos	1	0,0013	0,0013	1,08 n.s.
Erro	79	0,0917	0,0012	-
Total	159	12,4681	-	

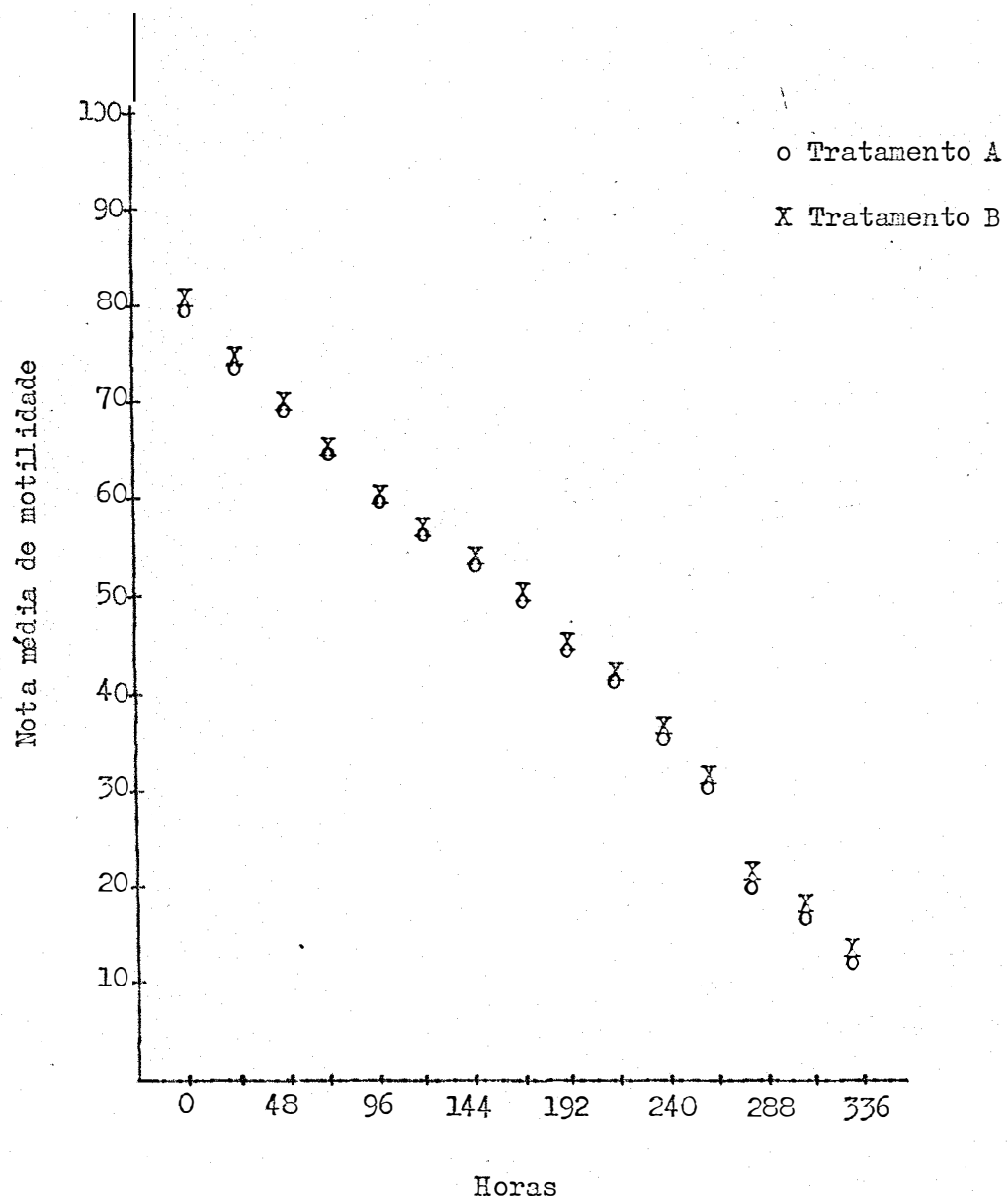
Tabela 3. Notas médias de motilidade dos oitenta blocos para os dois tratamentos nas diferentes horas.

Horas	Tratamento A	Tratamento B
0	78,0	78,2
24	74,5	74,4
48	70,0	69,8
72	65,8	66,2
96	60,8	61,0
120	57,4	56,9
144	54,2	54,4
168	50,1	50,0
192	45,7	45,8
216	42,8	43,0
240	36,8	36,8
264	31,7	31,6
288	21,1	20,9
312	18,4	18,3
336	14,5	14,6

Tratamento A = Citrato-gema ovo de galinha

Tratamento B = Citrato-gema ovo de codorna

Gráfico 1. Notas médias de motilidade (referentes aos oitenta blocos) para os tratamentos A e B nas diferentes horas estudadas.



O Quadro 3 apresenta a composição química dos constituintes maiores das gemas de ovo de galinha, segundo ROMANOFF e ROMANOFF (1949), e de codorna, segundo MORAES (1970), onde se notam diferenças entre os diversos componentes.

Quadro 3. Composição química dos constituintes maiores das gemas de ovo de galinha (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949) e de codorna (MORAES, 1970).

Constituintes	ovo de galinha (%)	ovo de codorna (%)
Água	48,70	49,28
Proteína	16,60	15,51
Gordura	32,60	26,99
Minerais	1,10	1,61

Embora mais pobre em proteína e lipídeos, a gema de ovo de codorna não parece ser menos adequada para fins de conservação do sêmen.

É curioso salientar aqui, que o teor de minerais na gema de ovo de codorna chega a ser praticamente 1,5 vezes mais alto que na gema do de galinha.

No Quadro 4, podem ser comparadas as cifras médias de aminoácidos identificados nas proteínas das gemas de ovo de galinha e de codorna.

Quadro 4. Aminoácidos contidos nas proteínas das gemas de ovo de galinha, segundo SCOTT, NESHEIM e YOUNG (1969) e de codorna, segundo ARZOLLA*, (1968).

Aminoácidos	ovo de galinha (%)	ovo de codorna (%)
Alanina	4,45	2,35
Arginina	7,57	0,83
Ácido aspártico	8,75	3,48
Cistina	2,50	-
Ácido glutâmico	11,20	2,14
Glicina	2,70	0,97
Histidina	3,40	2,52
Hidroxiprolina	0	-
Isoleucina	4,90	-
Leucina	6,72	4,62
Lisina	6,97	1,75
Metionina	2,50	1,68
Fenilalanina	3,50	0,51
Prolina	4,15	1,07
Serina	15,27	4,33
Treonina	4,42	2,06
Triptofano	1,20	-
Tirosina	3,57	5,33
Valina	5,17	1,68

* Informação pessoal.

A observação dos resultados do conteúdo em aminoácidos não permite confirmar as conclusões de KNOOP e KRAUSS (1944) sobre a importância da prolina e da glicina, pois os seus teores foram bem mais baixos na gema de ovo de codorna, respectivamente, 0,97% e 1,07%. As médias obtidas de motilidade, como estimativa do grau de conservação do sêmen, estão pois corroborando os resultados de FLIPSE, ALMQUIST (1956), STROM (1956) e MEIROSE, STEWART e BRUCE (1958), citados na revisão da literatura.

Portanto, não obstante as diferenças encontradas na proporção dos vários constituintes químicos das gemas dos referidos ovos, verificou-se no presente estudo, que o emprêgo da gema de ovo de codorna no diluente de Salisbury é tão satisfatório quanto o da gema de ovo de galinha.

A resultados semelhantes chegaram BASU e BERRY (1948), VENKATASWAMI, RAO e HANULANTHA (1961), substituindo a gema de ovo de galinha por gemas de pata e de perua no diluente de Salisbury, muito embora estes ovos apresentem também composições diferentes.

É interessante observar ainda o alto teor de Tirosina da gema de ovo de codorna, aliás o único aminoácido em que é superior à gema de ovo de galinha. Este alto conteúdo também parece não ter produzido efeito prejudicial, e não confirmou, pois, o receio de sua desaminação produzindo intoxicação dos espermatozóides pela água oxigenada formada, segundo VanDEMARK, SALISBURY e BRATTON (1949), TOSIC e WALTON (1950) e HAPS (1961).

Esses resultados parecem pois, excluir a possibilidade de uma influência quantitativa dos vários constituintes químicos das gemas dos ovos das citadas aves, nos diluentes contendo citrato, que viessem alterar o período de sobrevivência dos espermatozóides ou mesmo favorecer a sua vitalidade.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, e teve por finalidade a comparação do diluidor citrato de só dio-gema de ovo de codorna com o diluidor citrato de sódio-gema de ovo de galinha, universalmente utilizado na preservação de sêmen de touros.

Para a coleta de sêmen empregou-se o método da vagina artificial (modelo dinamarquês). A coleta se fez duas vezes por semana, durante 10 meses num total de 80 amostras, de um único touro, mantido em regime de estabulação.

As diluições foram feitas em cada diluente, imediatamente após os exames macroscópicos e microscópicos do sêmen, na proporção de 1 ml de sêmen para 4 ml do diluidor.

O estudo comparativo da porcentagem de motilidade dos espermatozoides nos dois diluidores foi processado logo após à diluição e a

intervalos regulares de 24 horas, durante 14 dias (336 horas), para cada amostra.

A análise estatística dos dados obtidos permitiu a conclusão de que o diluidor citrato de sódio-gema de ovo de codorna apresentou resultados tão satisfatórios quanto o diluidor citrato de sódio-gema de ovo de galinha, podendo igualmente ser utilizado na preservação de sêmen de touros.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This work deals with a comparative study between the effect of two bovine semen diluters: hen egg yolk-citrate versus quail egg yolk-citrate, carried out in the Animal Husbandry Department of "Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", U.S.P., Piracicaba.

Eighty semen collections were done by artificial vagina (Danish model), two times a week, during ten months, from just one nature bull, raised under normal conditions of feeding and management.

After collection, semen samples were routinely examined through macroscopic and microscopic evaluation methods, and right away the dilution was completed for both diluters in a 1:4 proportion.

Observations on spermatozoa motility percentage were carried out just after the dilution, and at regular intervals of 24 hours during 14 days (336 hours), for each sample kept at low temperature (4 to 7°C).

Statistical analysis of data showed that quail egg yolk-citrate performed as well as hen egg yolk-citrate, and therefore it could be used in the practice of bovine semen preservation.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMQUIST, J.O. 1949,a., The effect of penicillin upon the fertility of semen from relatively infertile bulls. J. Dairy Sci., 32:950.

_____. 1949,b., A comparison of penicillin, streptomycin and sulfanilamide for improving the fertility of semen from relatively infertile bulls. J. Dairy Sci., 32:722.

_____. 1951,b., The fertility of bovine semen in diluters containing varying amounts of egg yolk. J. Dairy Sci., 34(8):763.

_____. 1954., Diluters for bovine semen.V.A comparison of heated milk and egg yolk-citrate as diluters for semen from bulls of high and low fertility. J. Dairy Sci., 37:1308.

ALMQUIST, J.O., THORP, W.T.S. e KNODT, C.B., 1946., The effect of penicillin upon the livability, fertility and bacterial content of bull semen. J. Animal Sci., 5:400.

- AINQUIST, J.O., FLIPSE, R.J. e THACHER, D.L., 1954., Diluters for bovine semen. IV. Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skim milk. J. Dairy Sci., 37(11):1303.
- BASU, P.T. e BERRY, R.O., 1948., Comparative study of hen egg yolk citrate and turkey egg yolk citrate diluter in the preservation of bull spermatozoa. J. Animal Sci., 7(4):447.
- BLACKSTAW, A.W. e EMMENS, C.W., 1953., Survival of deep-frozen mammalian spermatozoa. Vet. Rec., 65(48):872.
- BOLTON, W.D. e DURRILL, W.B., 1954. Pasteurized skim milk as a bovine semen diluent. J. Amer. Vet. Med. Ass., 124(922):24.
- BONADONNA, T., 1954., L'uso del latte scremato e del tuorlo d'uovo nella diluizione del materiale seminale di toro. Vet. Ital., 5(6):491.
- _____. 1957., Nozioni di fisiopatologia della riproduzione e di fecondazione artificiale degli animali domestici. Milano, Collana Técnico-Scientifica "L. Spallanzani", 2 v.
- _____. 1963., Osservazioni sulla preparazione dei mestruai per la diluizione del materiale spermatico di "Bos taurus" con l'impiego dell'acqua minerale naturale. Zootec. e Vet., 18(5-6):173.
- BONADONNA, T., FORMAROLI, D. e POZZI, G.C., 1961. Utilizzazione di determinati succhi vegetali come mestruai per la diluizione del materiale seminale. Zootec. e Vet., 16(5-6):116.
- BRAVO, D.C., 1944., Recientes avances en veterinaria. Tomo III. Fecundacion artificial. Ed. Juan Pueyo, Madrid, 375 pp.

- CHIEFFI, A. e MASOTTI, N., 1959,a., Ricerche con nuovi mestruai per la conservazione dello sperma dei bovini. III. Spremuta dipomodori come base per la preparazione di liquido diluente dello sperma bovino. Zootec. e Vet., 14(5-6):174.
- _____. 1959,b., Ricerche sperimentali sopra nuovi mestruai per la diluizione, del materiale seminale dei bovini. II. L'utilizzazione dell'acqua di cocco come mestruo diluente. Zootec. e Vet., 14(3):95.
- CHIEFFI, A. e REIS, J.M., 1960., Ricerche su nuovi mestruai diluitori del materiale seminale di toro. IV. Modificazioni della tecnica di preparazione del mestruo tuorvo d'uovo-succo di pomodoro(Geto). Zootec. e Vet., 15(3-4):61.
- DUNN, H.O. e BRATTON, R.W., 1950., Motility of bovine spermatozoa in buffered whole egg. J. Dairy Sci., 33(6):430.
- DUNN, H.O., LEPARD, O.L., MURPHY, J.H. e GARRET, O.F., 1942., The effect of amphyl on motility and longevity of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 25:1015.
- EASTERBROOKS, H.L., HELLER, P., PLASTERIDGE, W.M., JUNGHERR, E.L. e ELLIOT, F.I., 1949., Fertility studies with streptomycin in bovine semen J. Animal Sci., 9:639.
- FIorentino, A., 1952., L'emploi du lait écrémé dans la dilution du sperme di taureau. Anim. Breed. Abstz., 20(4):344.
- FLERCHINGER, F.H., ERB, R.E. e EHLERS, M.H., 1953., The use of heated homogenized milk as a diluter for bull semen. J. Dairy Sci., 36(9):1016.

- FLIPSE, R.J. e ALMQUIST, J.O., 1956., Diluters for bovine semen. IX. Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. J. Dairy Sci., 39:1690.
- FOOTE, R.H. e BRATTON, R.W., 1950., The fertility of bovine semen in extenders containing sulfanilamide, penicillin, streptomycin and polymyxin. J. Dairy Sci., 33:544.
- FRANK, A.H., SMITH, C.A. e BICHORN, A., 1941., Preliminary report on prolonging the viability of spermatozoa in vitro. J. Amer. Vet. Med. Ass., 99(775):287.
- HAFS, H.D., 1961., Fertility of bull sperm with added catalase. J. Dairy Sci., 44(8):1529.
- HENDRIKSE, J. e JOLING, K.F., 1954., The whole-egg-citrate diluent. Anin. Breed. Abstr., 22(3):214.
- HURST, V., 1951. The storage of egg yolk-sodium citrate semen diluter. J. Dairy Sci., 34(6):490.
- KAMPSCHEIDT, R.F., MAYER, D.T., HERLIAN, H.A. e DICKERSON, G.H., 1951., Viability of bull spermatozoa as influenced by eletrolyte concentration, buffer efficiency and added glucose in storage media. J. Dairy Sci., 34(1):45.
- KERRUSH, B.H., 1956., A field-trial comparison of milk and egg-yolk citrate as semen diluters. Proc. 3rd. Int. Congr. Anin. Reprod., Cambridge, 65.
- KNOTT, G.B. e SALISBURY, G.W., 1946., The effect of sulfanilamide upon the livability and metabolism of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 29(5):285.

KNOOP, C.E., 1941., A new diluent for bovine semen. J. Dairy Sci., 24 (10):891.

KNOOP, C.E. e KRAUSS, W.E., 1944., Storage of bovine spermatozoa in diluents containing certain amino acids. J. Dairy Sci., 27(8): 657.

KOK, J.C.N., 1952., The duration of life bull sperm "in vitro". I. The effect of sperm concentration and diluent. Anin. Breed. Abstr., 21 (3):260(1953).

_____, 1953., The duration of life of bull sperm "in vitro". III. Some factors having a bearing on the use of egg yolk in the diluent. Anin. Breed. Abstr., 22(1):44(1954).

KOK, J.C.N. e VAN DIETEN, S.W.J., 1957. Motility and non-return percentage as influenced by fructose in the diluent of bull semen. Anin. Breed. Abstr., 25(2):159.

MASOTTI, N., 1964., Estudo da conservação e fecundação de sêmen de touros diluído em sêro de leite de soja. Tese para livre-docência. Faculdade de Medicina Veterinária da U.S.P. 57 pp. (mimeografado).

MASOTTI, N. e BARIABE, R.C., 1962,a., Diluidores vegetais para sêmen dos animais domésticos. I. Emprêgo do chá de fôlhas fenadas de alfafa (Medicago sativa) como diluidor do sêmen de bovinos. An. VIII Congr. Brasil. Vet., Belo Horizonte, 274.

_____, 1962,b., Diluidores vegetais para sêmen dos animais domésticos. II. Emprêgo do chá de fôlhas fenadas de guandú (Cajanus sp.) como diluidor do sêmen de bovinos. An. VIII Congr. Brasil. Vet., Belo Horizonte: 275.

MEGLIOLI, O., POZZI, G.C. e OLCIATI, L., 1955. Prove di diluizione del materiale spermatico di "Bos taurus" con l'utilizzazione di uova di gallina deposte da più o meno lungo tempo. Zootec. Vet., 10 (1):25.

MEIROSE, D.R., 1956., Skim milk powder as a semen diluent. Proc. 5rd Int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge:68.

MEIROSE, D.R. e STEWART, D.L., 1956., The effect on fertility of changes in the composition of the normal egg-yolk citrate semen diluent. Brith Vet. J., 112(12):536.

MEIROSE, D.R., STEWART, D.L. e BRUCE, W., 1958., Comparative fertility studies of bovine semen diluents containing powdered skim milk, fresh skim milk, glycine and egg yolk. Vet. Rec. 70:433.

MIES FO, A., 1970., Reprodução dos animais e inseminação artificial. 2ª ed., Porto Alegre, Livraria Sulina Editôra, 545 pp.

MILOVANOV, V.K. e SELIVANOVA, O.A., 1932., Dilutors for sperm of livestock. Anim. Breed. Abstr., 1(3):153(1933).

MILOVANOV, V.K., MAGORNYI, E.P., SIVONON, J.V.G. e MALACHOV, K.I., 1939. An attempt to inseminate sheep by gelatinised sperm. Anim. Breed. Abstr., 7(4):322.

MIXNER, J.P., 1949,a., Penicillin and sulfanilamide in semen dilutors and their effect on fertility of semen from relatively fertile bulls. J. Dairy Sci., 32:722.

_____, 1949,b., The effect of a combination of penicillin and streptomycin in semen dilutors on the fertility of dairy bulls. J. Animal Sci., 8:642.

- MOLINARI, G., 1961., Prime ricerche sull'impiego di strati vegetali nella diluizione del materiale seminale. Atti Soc. Ital. Sci.Vet., 15:290.
- MORAES, C.L., 1970., Constituintes químicos da gema do ovo de codorna. (No prelo).
- NORMAN, C., JOHNSON, C.E., PORTERFIELD, I.D., GOLDBERG, E., DUNBAR Jr., R. S. e MEI, H.S., 1962., Survival and fertility of bovine sperm Kept. at variable temperatures in coconut milk extender. J.Agric. Sci., 59(1):33.
- OHMS, J.I. e WILLET, E.L., 1958., Fertility of bull spermatozoa in yolk-citrate partially replaced by glucose. J. Dairy Sci., 41(12):1800.
- OLDS, D., OLIVER, L., SEATH, D.M. e CARPENTER, M.C., 1951., The fertility of bull semen extended with yolk-citrate containing varying proportions of egg yolk. J. Dairy Sci., 34(11):1081.
- PHILLIPS, P.H., 1939., The preservation of bull semen. J.Biol. Chem., 130:415.
- PHILLIPS, P.H. e LARDY, H.A., 1940., A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. J. Dairy Sci., 23(5):399.
- POYARKOFF, E., 1916., Influence de la viscosité sur la vitesse d'action de la spermatoxine. C. R. Soc. Biol. Paris, 79:1151.
- PURSLEY, G.R., HERMAN, H.A., DICKENSHEET, M. e WATERS, R.E., 1950., A comparison of various semen diluters in maintaining motility of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 33(4):216.

- RHOADES, H.E. e VanDEMARM, N.L., 1958., Survival of Brucella abortus, Leptospira pomona, and Vibrio fetus in the IVT semen extender at 29°C. Am. J. Vet. Res. 19:976.
- ROMANOFF, A.L. e ROMANOFF, A.J., 1949. The avian egg. New York. John Willey & Sons, Inc. 918 pp.
- SALISBURY, G.W., FULLER, H.K. e WILLET, E.L., 1941. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. J. Dairy Sci., 24(11):905.
- SALISBURY, G.W. e KNOTE, C.B., 1947., The effect of sulfanilamide in the diluent upon fertility of bull semen. J. Dairy Sci., 30(6):361.
- SALISBURY, G.W. e VanDEMARM, N.L., 1961. Physiology of reproduction and artificial insenination of cattle. San Francisco, W.H.Freeman & Company, 707 pp.
- SALISBURY, G.W., ZELAYA, J.A. e VanDEMARM, N.L., 1945., Livability and glycolysis of bull spermatozoa in yolk-citrate, incubated eggs or chick-embryo diluters. J.Anin. Sci., 4(3):270.
- SAMALA, B.J., TUANQUI, R.C. e LU, T., 1964., A preliminary study on the preservation of bull semen in the yolk of infertile fresh chicken egg. Fifth Intern. Congr. An. Reprod. and A. I. Trento IV, 458.
- SANFILE, V., 1952., Il latte come diluitore del liquido seminale. Zoonofilassi 7(11):523.
- SCHERSTEN, B., 1956., Studies on the occurrence and biological importance of citrate in the sexual gland secretions of mand and various animals. Stand Arch. Physiol. 74(3):144.

- SCOTT, M.L., NESHEIM, M.C. e YOUNG, R.J., 1969., Nutrition of the chicken, Ithaca, New York, pp. 511.
- SHETTLES, L.B. 1940., Resistance of human spermatozoa in vitro to sulfanilamide and sulfapyridine. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 44: 392.
- SIMUNIC, B., 1956., A new milk yolk diluent for bull semen. Anim. Breed. Abstr., 24(3):258.
- STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H., 1960., Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York. pp. 481.
- STEWART, D.L., MEIROSE, D.R. e WILSON, W.R., 1950., The effect of reducing the quantity of egg yolk in semen diluents. Vet. Rec., 62(44):617.
- STROM, S., 1956. Comparison of the effects of egg-yolk-citrate and egg-yolk-glycine diluents on the fertilizing ability of bovine semen. 3rd Intern. Cong. Animal Reprod. Cambridge, pp. 71.
- SWANSON, E.W., 1949., The effect of varying proportions of egg yolk and sodium citrate buffer in bull semen diluters upon sperm motility. J. Dairy Sci., 32(4):345.
- SZUMOWSKI, P., MARKOVIC, B. e CANO, A., 1956., Le lait écrémé en poudre pour la dilution et la congélation du sperme de Bélier. Rec. Méd. Vét., 132(2):124.
- THACKER, D.I. e ALMQUIST, J.O., 1953., Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. J. Dairy Sci., 36(2):173.

- TOSIC, J. e WALTON, A., 1947., Effect of egg-yolk and its constituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. J. Agric. Sci., 37(1):69.
- _____, 1950., Metabolism of sperm. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. Biochem. J. 47:199.
- UNDERBJERG, G.K.L., DAVIS, H.P. e SPANGLER, R.E., 1942., Effect of diluters and storage upon fecundity of bovine semen. J. Anim. Sci., 1(2):149.
- VANDEMARK, N.L., SALISBURY, G.W. e BRATTON, R.W., 1949. Oxygen damage to bull spermatozoa and its prevention by catalase. J. Dairy Sci., 32:353.
- VEITENHEIMER, P., 1953. Capacidade fecundativa do sêmen do touro que contenha sangue fresco. Bol. Dir. Prod. Anim., Porto Alegre, 9 (15):32.
- VENKATASWAMI, V., RAO, H.C. e HANUMANTHA, V., 1961., A preliminary report on duck's yolk and cocconut water as semen diluents. Indian vet. J., 38(2):84.
- VLACHOS, C., 1953., Cows milk as a diluent for bull semen. Vet. Bull. 23(3):122.
- VOLCANI, R. e BERMAN, A., 1953., The influence of whole blood, serum or plasma on bull semen. Vet. Bull. 24(10):588.
- WEISS, K., 1952. Semen dilution with milk. Anim. Breed. Abstr., 21 (3):262.

WILCZYNSKA, H. e LAURANS, R., 1947. The protection of spermatozoa with egg yolk. Anim. Breed. Abstr., 16(3):252.

WILLIAMS, J.A., GREEN, R.W. e BALTZER, A.C., 1954., Heated homogenized milk vs. egg-yolk citrate as a bull semen extender. J. Anim. Sci., 13(4):1035.