

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
Diretor: Prof. Dr. João Soares Veiga

## DILUIÇÃO DO SÊMEN DE BOVINO EM LEITE DESNATADO EM PÓ

POWDERED SKIMMILK AS A DILUTER FOR BOVINE SEMEN

JOÃO SOARES VEIGA

Professor

NOÉ MASOTTI

Assistente

ARMANDO CHIEFFI

Assistente, D.L.

JOSÉ DE ASSIS RIBEIRO

Assistente

Desde que se vislumbaram as imensas possibilidades oferecidas pelo método de inseminação artificial, intensificaram-se os estudos sobre os diluidores de sêmen, como meio não só necessário para aumentar o número de doses para inseminação, como para preservação e aumento da fertilidade do material fecundante. Da numerosa variedade de meios diluidores preconizados, restou, para os serviços de rotina, como o mais recomendável, quer pela eficiência, quer pela simplicidade de seu preparo, o meio diluidor ideado por PHILLIPS e LARDY, composto de uma solução de citrato de sódio, misturada com gema de ovo fresco. Esses mesmos autores experimentaram diluir o sêmen de bovino em leite evaporado, mas obtiveram resultados inferiores aos obtidos com diluidor gema-citrato.

O interesse em se descobrirem novos meios diluidores prosseguiu, e continua, dadas as dificuldades por vezes encontradas, nos centros de inseminação artificial, em se obterem ovos rigorosamente frescos, no preparo e na esterilização do material.

Os estudos sobre o emprêgo do leite de vaca como diluidor foram, ao que parece, iniciados por Hoffmann ("in" CARBONERO), logo a seguir inexplicavelmente abandonados. Em 1950, MICHAJILOV, na Checoslováquia, oferece indicações precisas sobre o emprêgo desse produto como diluidor do sêmen de animais, utilizando-o depois de fervido, filtrado e resfriado.

De acôrdo com as observações de THACKER e ALMQUIST, os leites homogeneizado e desnatado, uma vez fervidos, evidenciaram manter, em condições satisfatórias, a motilidade dos espermatozóides do sêmen diluído, ao mesmo tempo que, nesses mesmos leites não fervidos, a conservação se fazia em condições bem inferiores.

Esses mesmos autores verificaram que o sêmen diluído em leite homogeneizado fervido, sem adição de antibióticos, apresentava porcentagens de fertilização

ligeiramente superiores às do sêmen diluído em gema-citrato, nas experiências de campo.

Dentre as conclusões a que chegaram, ressaltam aquêles AA., as que se referem à necessidade de se elevar a temperatura do leite a 95°C de 1 a 10 minutos, de preferência lentamente, a fim de que, com esta temperatura, se pudessem modificar quimicamente ou fisicamente no leite, modificações essas que permitem aos espermatozoides sobreviverem até 16 dias nesse meio. A diluição do sêmen em leite não fervido, embora pasteurizado, evidenciou péssimos resultados, visto que os espermatozoides apresentavam fraca motilidade, já com dois dias de conservação.

Outros pesquisadores se dedicaram ao mesmo assunto (STRASSBURG, 1952; JACQUET e CASSOU, 1952; SANFILE, 1952).

JACQUET e CASSOU voltaram suas atenções para o leite desnatado em pó, em face das dificuldades encontradas na falta de padronização dos leites comuns desnatados, líquidos encontrados no comércio. Esses AA. juntam, ao leite em pó, antibióticos em doses convenientes e assim o remetem aos centros de inseminação. Para preparar o diluidor leite em pó com antibióticos, é este diluído em 10 partes de seu volume em água bidistilada, para depois ser incluído na proporção de 10% em gema de ovo.

A técnica de JACQUET e CASSOU, pois, não indica a fervura do leite e recomenda ainda a inclusão de gema de ovo. Todos os AA. citados são unânimes em evidenciar a vantagem do emprêgo do leite desnatado sobre o leite integral, em vista das dificuldades que este último demonstra, ao exame microscópico, em virtude dos glóbulos de gordura que contém.

Para nossas pesquisas empregamos leite desnatado em pó, encontrado no comércio para fins dietéticos, com as seguintes características: produto obtido do leite fresco, previamente pasteurizado e pulverizado pelo "spray-drying", apresentando a seguinte composição:

Gordura .....	0,8%
Proteínas .....	38,0%
Lactose .....	50,7%
Sais minerais .....	7,5%
Umidade .....	3,0%

#### MATERIAL E MÉTODO

As amostras de sêmen estudadas provieram de três touros da raça Holandesa, variedade preta e branca, que servem no Posto de Inseminação Artificial

da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (PIArt.). O método empregado para a obtenção do material foi o da vagina artificial, cuja técnica é bem conhecida, tomando-se todos os cuidados comuns. Após a obtenção, o material foi examinado em gôta pendente, recebendo classificações de acôrdo com a densidade e a motilidade, devidamente anotadas em fichas. A prova de redução do azul de metileno foi sempre efetuada, nas diferentes fases da experiência em que se tornou necessária.

O diluidor foi preparado, em linhas gerais, segundo a técnica de MICHAJLOV. O leite desnatado em pó foi pesado e submetido à reconstituição em água bidistilada esterilizada, na razão de 1:8. Depois de perfeitamente homogeneizado, foi filtrado e fervido, por quatro vezes, em chama de lâmpada de álcool. O produto, novamente filtrado, recebeu antibióticos em dosagem adequada (até mil unidades de penicilina e estreptomicina por  $\text{cm}^3$ ). Após a reconstituição do leite, verificamos o pH com indicador universal, assinalando-se um valor entre 5 a 6. O leite foi conservado em geladeira à temperatura de 5°C. Amostras submetidas à prova de identificação de número de germens revelaram-se estéreis em caldo simples e em agar simples.

#### RESULTADOS NO LABORATÓRIO

Colhido, examinado e julgado o sêmen pelas provas acima citadas, foram feitas as diluições lentamente, mantendo a temperatura a 37°C, na base de 1:4, 1:3 e 1:10. As amostras, diluídas e mantidas em geladeira a 5°C, foram submetidas a exames periódicos em gôta pendente e pela redução do azul de metileno. Estas amostras foram comparadas com amostras de sêmen da mesma colheita diluído em gema-citrato, consideradas testemunhas. Pesquisamos, em algumas amostras, porcentagem de espermatozóides vivos e mortos, através a coloração vital pela eosina e nigrosina (SWANSON e BEARDEN), efetuando, também, o necessário contrôle com amostras testemunhas.

As amostras de sêmen-leite desnatado em pó e de sêmen-gema-citrato, sob o contrôle bacteriológico, demonstraram crescimento aproximado de 120 a 100 colônias de germens por  $\text{cm}^3$ , respectivamente.

Os primeiros resultados obtidos demonstraram ser possível a utilização do leite desnatado em pó, como diluidor para sêmen de bovino, pois o sêmen assim tratado se comportou, no laboratório, de maneira semelhante à do sêmen diluído em gema-citrato. As provas de conservação foram satisfatórias, tendo-se mantido uma amostra, nas condições usuais, até 288 horas, quando recebeu a nota 1 no exame para motilidade.

## RESULTADO DAS INSEMINAÇÕES

Sêmen diluído na proporção de 1:4 e 1:10 em leite em pó, reconstituído, foi distribuído a diversos criadores e Departamentos oficiais, para verificação do poder fecundante. O transporte deste material foi efetuado segundo a técnica normalmente utilizada pelo Posto de Inseminação Artificial da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, que consiste em se acondicionarem os tubos de sêmen diluído, de capacidade pouco superior a 3 cm<sup>3</sup>, ao redor de latas contendo água congelada; envolver essas latas em envelopes de papel grosso e, finalmente, mantê-las dentro de duas caixas de papelão, empregando como substância isolante, papel de jornal picado. Essas caixas são enviadas de São Paulo e atingem seu destino por meio de ônibus, caminhões, etc., num lapso de tempo que varia de 2 a 8 horas.

Nos pontos de recepção, os tubos de sêmen são retirados das caixas e mantidos em geladeira entre 5 e 10°C até o momento da inseminação. Os postos redistribuidores enviam amostras às fazendas, acondicionando-as nas mesmas caixas.

O sistema de controle das porcentagens de fecundação obtidas pelo PIArt da Faculdade de Medicina Veterinária encontra sérios obstáculos, pelos seguintes motivos:

- a) os criadores recebem o material do Posto e o utilizam, fazendo a necessária comunicação, mensalmente. Esses dados são anotados em fichas especiais;
- b) periodicamente, um encarregado do Serviço visita as fazendas para fazer os diagnósticos de gestação nas vacas inseminadas;
- c) entretanto, fogem ao controle do Posto, o movimento de vendas de animais inseminados antes do diagnóstico; o estado sanitário do rebanho, principalmente no que se refere à esfera genital; a conservação do sêmen depois da expedição e a inseminação propriamente dita.

Qualquer tentativa, portanto, para se calcular o índice de fecundação sobre as vacas que não retornam à inseminação, considerando-as fecundadas, como normalmente se faz, é suscetível de resultados falsos.

Por tal motivo, resolvemos incluir, nos nossos resultados, apenas as vacas que efetivamente produziram bezerras de inseminação artificial, nascimentos esses não só comunicados pelos criadores, como observados pelo Serviço. Esses dados, tomados após os nascimentos dos produtos, são os mais corretos e, naturalmente, oferecem porcentagens menores do que quando se consideram os "não retornos" à inseminação, após 40 ou 60 dias.

A fim de não lançar um produto no meio criador, abruptamente, sem conhecê-lo suficientemente, embora as provas de laboratório fôsem as mais satis-

fatórias possíveis, enviamos, no período de 9 de abril a 12 de novembro de 1953, apenas algumas doses de sêmen diluído em leite desnatado em pó, sêmen esse que foi aplicado puramente ao acaso, sem seleção ou escolha de vacas a inseminar.

Nessas circunstâncias foram efetuadas, em propriedades diferentes, 84 inseminações com sêmen diluído em leite desnatado em pó, das quais se verificaram 51 nascimentos. Tais resultados oferecem a porcentagem de 60,71% de fecundação, ou seja 1,64 inseminações por produto nascido.

Para 503 nascimentos provenientes de inseminações com sêmen diluído em gema-citrato foram necessárias 1.094 inseminações, ou sejam 45,97% ou ainda 2,17 inseminações por produto nascido.

Essa diferença é bem superior à verificada por THACKER e ALMQUIST que, calculando as porcentagens na base do "não retorno" dentro de 60 a 90 dias, encontraram 72,7% e 71,4%, respectivamente, para sêmen diluído em leite homogeneizado e sêmen diluído em gema-citrato.

Os resultados, portanto, parecem favorecer francamente o sêmen diluído em leite em pó desnatado devidamente reconstituído.

O PIAIt da Faculdade de Medicina Veterinária está iniciando a remessa sistemática do novo material para verificação mais ampla.

De qualquer maneira, o simples fato de não se terem verificado resultados inferiores aos conseguidos pelo sêmen diluído em gema-citrato, parece recomendar a diluição do sêmen em leite em pó desnatado, pelas vantagens que oferece no seu preparo e que podem ser assim resumidas:

- a) utilização de um material padronizado em sua composição;
- b) facilidade de esterilização;
- c) conservação quase indefinida do leite em pó devidamente acondicionado;
- d) possibilidade de conservação do diluidor reconstituído, em geladeira, durante longo tempo;
- e) rapidez no preparo;
- f) baixo custo de obtenção;
- g) facilidade de aquisição.

#### RESUMO

A fim de verificar a possibilidade de se empregar o leite desnatado em pó como meio diluidor para sêmen de bovino, foram realizados estudos de labora-

tório e de campo. Os primeiros, para avaliar a capacidade do diluidor em manter vivos os espermatozoides por tempo considerado satisfatório. Os segundos, para julgar a capacidade fertilizante do material.

O leite desnatado em pó foi adquirido no comércio com as seguintes características: produto obtido do leite fresco, previamente pasteurizado e pulverizado pelo "spray-drying", apresentando a seguinte composição:

Gordura .....	0,8%
Proteínas .....	38,0%
Lactose .....	50,7%
Sais minerais .....	7,5%
Umidade .....	3,0%

A técnica de preparo seguida foi a seguinte:

- a) diluição do leite em pó na proporção de 1 para 8 de água bidistilada esterilizada;
- b) filtração em papel de filtro;
- c) aquecimento até levantamento da fervura por quatro vezes;
- d) nova filtração;
- e) resfriamento;
- f) adição de antibióticos;
- g) diluição do sêmen à temperatura de 37°C.

Os resultados de laboratório obtidos foram considerados plenamente satisfatórios, quando comparados com os do diluidor gema-citrato.

De 84 inseminações realizadas com sêmen diluído em leite desnatado em pó verificaram-se 51 nascimentos (60,71%). Para 503 nascimentos provenientes de sêmen diluído em gema-citrato, foram necessárias 1.094 inseminações (45,97%). Tais resultados parecem indicar possibilidades para o diluidor leite em pó desnatado, especialmente quando se consideram os seguintes pontos:

- a) utilização de um material padronizado em sua composição;
- b) facilidade de esterilização;
- c) conservação quase indefinida do leite em pó devidamente acondicionado;
- d) possibilidade de conservação do diluidor reconstituído, em geladeira, durante longo tempo;

- e) rapidez no preparo;
- f) baixo custo de obtenção;
- g) facilidade de aquisição.

#### ABSTRACT

Laboratory and field experiments were conducted to study the use of powdered skim milk as a diluter for bovine semen.

Commercial powdered skim milk used in these experiments had the specifications as follows: The technique carried out to prepare the skim milk diluter was: a) dilution of powdered skim milk in bi-distilled water (1:8); b) filtration after sitting; c) heating till boiling four times; d) filtration; e) cooling; f) addition of antibiotics (penicillin and streptomycin); g) dilution of semen at 37°C of temperature.

In laboratory test the skim milk diluter compared as satisfactory as yolk-citrate diluter.

On the basis of 84 inseminations with diluted semen on skim milk diluter 51 calves were born (60.71%). For semen diluter in yolk-citrate 503 calves resulted from 1.094 inseminations (45.97%).

Based upon satisfactory results it appears that the powdered skim milk offers a convenient diluter for semen mainly due: a) a even composition; b) facility to sterilize; c) the powdered skim milk can be kept for long time without damage; d) the diluter can be preserved at low temperature for long time; e) it is easy to prepare and there are facilities to buy for low prices.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARRONERO, D. — 1944 — Fecundación Artificial: 223, Madrid, J. Pucyo
- JACQUET, J. — CASBOU, R. — 1952 — Nouvelles recherches sur un milieu à base de lait écrémé en vue de la dilution et de la conservation du sperme de taureaux. *Bull. Acad. Vet. France*, 25(4):149/56
- MICHAILOV, N. N. — 1950 — Sperm dilution in the milk. *The Czechoslovak Vet. Mag.*, "in" *J.A.V.M.A.*, 117(833):387
- PHILLIPS, P. H. — LARDY, H. A. — 1940 — A yolk buffer Pabulum for the preservation of bull Semen. *J. Dairy Sci.*, 23:399/404
- SANFILE, V. — 1952 — Il latte como diluitoro del liquido seminale. *Zooprofilassi*, Milano, 6(11):523/5

- STRASSBURG, H. — 1952 — Die Aufbewahrung von Bullensperma in Milch. *Tierzucht*, **6** (6):188
- SWANSON, E. W. — BEARDEN, H. J. — 1951 — An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J. Animal Sci.*, **10**(4):981/7
- THACKER, D. L. — ALMQUIST, J. O. — 1951 — Milk and milk-products as diluters for bovine semen. "in" *J. Animal Sci.*, **10**(4):1082
- THACKER, D. L. — ALMQUIST, J. O. — 1953 — Diluters for bovine semen. I: Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. *J. Dairy Sci.*, **36**(2):173/80