

REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN CANINO EM MEIO DILUENTE À BASE DE ÁGUA DE COCO (*Cocos nucifera*) NATURAL

Alexsandra Francisco Santos¹
Júlio César Oliveira Dias²
Ana Carolina Leite Albeny³

RESUMO

A inseminação artificial em cadelas contribui para o melhoramento genético da espécie, previne algumas doenças sexualmente transmissíveis a partir da cópula e possibilita a reprodução de animais que não poderiam copular de forma natural, seja por motivos anatômicos, geográficos ou comportamentais. Todavia, nem sempre é possível utilizar o sêmen fresco, sendo assim necessário um diluente para resfriar e mantê-lo viável por determinado período. Diante disso, o objetivo com este trabalho foi analisar o sêmen canino diluído em água de coco e refrigerado, à 5 °C em diferentes tempos. Foram utilizados cinco cães da raça Hounds do Brasil, realizando três colheitas de sêmen de cada animal, com intervalos de sete dias. Os ejaculados foram mantidos a temperatura de 37 °C e realizado análises macroscópicas (volume, cor, aspecto e odor) e microscópicas (motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática). Em seguida, os ejaculados foram diluídos em água de coco natural a uma concentração de 200 milhões de espermatozoides/mL, e mantidos à temperatura de 5 °C, por até 72 horas. Nos intervalos de seis, doze, vinte e quatro, trinta e seis, quarenta e oito, e setenta e duas horas, as amostras foram avaliadas quanto a motilidade e vigor espermático. Os ejaculados frescos apresentaram em média volume de 6,2 mL, cor branca, aspecto aquoso a leitoso, odor “sui generis”, motilidade espermática de 89,5 %, vigor espermático 4,3, concentração média de 418 x10⁶ espermatozoides/mL e 7,3% de alterações patológicas. Após o início do resfriamento à 5 °C, os valores de motilidade e vigor diminuíram com o passar do tempo, sendo os menores valores encontrados após 48 e 72 horas. O diluente a água de coco *in natura* mostrou-se eficiente para refrigeração de sêmen canino, à 5 °C, conservando-o por um período de até 36h após a colheita, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

Palavras-chave: análise seminal; cão; inseminação artificial; reprodução animal.

CANINE SEMEN REFRIGERATION IN A NATURAL COCONUT WATER (COCOS NUCIFERA)-BASED EXTENDER.

ABSTRACT

Artificial insemination in bitches contributes to the genetic improvement of the species, prevents some sexually transmitted diseases through copulation and allows the reproduction of animals that could not copulate naturally, either for anatomical, geographic or behavioral reasons. However, it is not always possible to use fresh semen, thus requiring a diluent to cool and keep it viable for a certain period. Therefore, the objective of this work was to analyze canine semen diluted in coconut water and refrigerated at 5 °C at different times. Five Brazilian Hounds were used, performing three semen collections from each animal, with intervals of seven days. The ejaculates were kept at a temperature of 37 °C and macroscopic (volume, color, appearance and odor) and microscopic (motility, vigor, concentration and sperm morphology)

¹ IFNMG - Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas. Correspondência: afs3@aluno.ifnmg.edu.br

² Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas. julio.dias@ifnmg.edu.br

³ Instituto Federal do Norte de Minas Gerais - Campus Salinas. carolina.leite@ifnmg.edu.br

analyses were performed. Then, the ejaculates were diluted in natural coconut water at a concentration of 200 million sperm/mL, and kept at a temperature of 5 °C for up to 72 hours. At intervals of six, twelve, twenty-four, thirty-six, forty-eight, and seventy-two hours, samples were evaluated for sperm motility and vigor. Fresh ejaculates had an average volume of 6.2 mL, white color, watery to milky appearance, “sui generis” odor, 89.5% sperm motility, 4.3 sperm vigor, average concentration of 418 x10⁶ spermatozoa/mL and 7.3% pathological changes. After the beginning of cooling at 5 °C, the values of motility and vigor decreased over time, with the lowest values found after 48 and 72 hours. The in natura coconut water extender proved to be efficient for cooling canine semen at 5 °C, keeping it for a period of up to 36 hours after harvest, as recommended by the Brazilian College of Animal Reproduction.

Key words: seminal analysis; dog; artificial insemination; animal reproduction.

REFRIGERACIÓN DE SEMEN CANINO EN UN MEDIO DILUYENTE NATURAL A BASE DE AGUA DE COCO (COCOS NUCIFERA).

RESUMEN

La inseminación artificial en perras contribuye a la mejora genética de la especie, previene algunas enfermedades de transmisión sexual a través de la cópula y permite la reproducción de animales que no podrían copular de forma natural, ya sea por razones anatómicas, geográficas o de comportamiento. Sin embargo, no siempre es posible utilizar semen fresco, por lo que se requiere un diluyente para enfriarlo y mantenerlo viable durante un cierto período. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar semen canino diluido en agua de coco y refrigerado a 5 °C en diferentes tiempos. Se utilizaron cinco sabuesos brasileños, realizándose tres colectas de semen de cada animal, con intervalos de siete días. Los eyaculados se mantuvieron a una temperatura de 37 °C y se realizaron análisis macroscópicos (volumen, color, apariencia y olor) y microscópicos (motilidad, vigor, concentración y morfología espermática). Luego, los eyaculados se diluyeron en agua de coco natural a una concentración de 200 millones de espermatozoides/mL y se mantuvieron a una temperatura de 5 °C hasta por 72 horas. A intervalos de seis, doce, veinticuatro, treinta y seis, cuarenta y ocho y setenta y dos horas, se evaluó la motilidad y el vigor de los espermatozoides en las muestras. Los eyaculados frescos tuvieron un volumen promedio de 6,2 mL, color blanco, apariencia acuosa a lechosa, olor “sui generis”, motilidad espermática de 89,5%, vigor espermático de 4,3, concentración promedio de 418 x10⁶ espermatozoides/mL y cambios patológicos de 7,3%. Después del inicio del enfriamiento a 5 °C, los valores de motilidad y vigor disminuyeron con el tiempo, encontrándose los valores más bajos a las 48 y 72 horas. El diluyente de agua de coco in natura demostró ser eficaz para enfriar el semen canino a 5 °C, manteniéndolo por un período de hasta 36 horas después de la cosecha, según lo recomendado por el Colegio Brasileño de Reproducción Animal.

Palabras clave: análisis seminal; perro; inseminación artificial; reproducción de animales.

INTRODUÇÃO

Em meados do século XVIII, Lázaro Spallanzari desenvolveu a inseminação artificial em cadelas. Esta biotecnologia vem sendo utilizada como ferramenta para o melhoramento genético da espécie, para o desenvolvimento de raças estrangeiras no Brasil e a prevenção de doenças que são transmissíveis pelo contato sexual ou cópula de cães (1).

O uso da inseminação artificial na reprodução canina também oferece uma solução para uma série de situações que podem proibir ou dificultar a reprodução natural. Tais situações incluem impedimentos anatômicos (como vulva e/ou vagina estreita), alterações no comportamento reprodutivo (dominante/agressivo, comportamento da cadela ou submissão no sexo masculino), fraqueza ou afecções na coluna ou nos membros posteriores e distância geográfica (2).

No processo de inseminação artificial, nem sempre é possível utilizar o sêmen fresco, sendo necessário criopreservá-lo, utilizando assim, um diluente para conservação. Esta solução tem como função primordial manter a viabilidade da célula espermática por um período maior de tempo (3). Os diluentes de sêmen são fontes de energia, de eletrólitos, de substâncias que mantêm estável o pH, a osmolaridade, e protegem a membrana espermática dos danos causados pela modificação de temperatura (4).

Dentre os diluentes de sêmen, destaca-se a água de coco, a qual tem apresentado resultados positivos na manutenção da viabilidade e poder fecundante dos espermatozoides em diversas espécies: suínos (5), equinos (6) e pequenos ruminantes (7).

A água de coco é composta basicamente de 95,5% de água, sendo o restante constituída por 4% de carboidratos, 0,1% de gordura, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de aminoácidos, vitamina C, vitaminas do complexo B e sais minerais (8). Além disso, a auxina vegetal (hormônio) denominada ácido 3-indol acético (IAA), presente naturalmente na água de coco, pode estimular a motilidade e manter uma maior percentagem de espermatozoides moveis no sêmen, além de proteger a célula espermática, proporcionando maior número de espermatozoides com morfologia normal (9, 10).

Em muitas situações a criopreservação do sêmen canino fica impossibilitada, devido à dificuldade na aquisição e variabilidade de diluentes comerciais somado ao alto custo dos mesmos. Neste sentido, a utilização de água de coco natural como diluente seminal poderia ser uma alternativa de fácil e rápido preparo, de baixo custo e com grande disponibilidade em território nacional. Diante do exposto, o objetivo com este trabalho foi avaliar o sêmen canino diluído em água de coco (*Cocos nucifera*) natural e refrigerado em diferentes tempos (0, 6, 12, 24, 36, 48 e 72h), determinando a eficiência do mesmo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Canil Negreiros, município de Itaobim – MG, localizada no vale do Jequitinhonha, com 249 metros de altitude, latitude: 16° 34' 34" Sul, longitude: 41° 30' 14" Oeste, e área: 679 km².

Foram utilizados cinco cães da raça Hounds do Brasil, machos, com idade compreendida entre um ano e quatro meses a três anos e nove meses, de porte médio a grande, com peso entre 25 a 32Kg, os quais foram submetidos a anamnese, exame físico, clínico e reprodutivo (Figuras 1 e 2) de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).



Figura 1. Cães da raça Hounds do Brasil utilizados no experimento.

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 2. Exame físico dos animais; A - Aferição de temperatura; B - Auscultação cardíaca.

Fonte: Arquivo pessoal.

Anteriormente a colheita, o pênis foi higienizado com uma gaze ou compressa seca, para evitar contaminação das amostras. Foram realizadas três colheitas de sêmen em cada animal, com intervalos de sete dias entre as mesmas. A colheita de sêmen foi realizada em ambiente tranquilo, pelo método da manipulação digital (mão enluvada), utilizando um funil devidamente limpo, adaptado a tubo coletor cônico de 15 mL (tubo tipo *Falcon*) (Figura 3).

O ejaculado canino é dividido em três frações: a fração pré-espermática, que contém líquido prostático em baixa concentração de espermatozoides; a fração espermática, que é rica em espermatozoides; e a fração pós-espermática.

Em todas as coletas, os primeiros jatos do ejaculado (fração rica em líquido prostático e com baixa concentração de espermatozoides) foram descartados, sendo a segunda e terceira frações, ricas em espermatozoides colhidas juntas. Imediatamente após a colheita, o ejaculado

foi mantido a temperatura de 37 °C e analisado macroscopicamente e microscopicamente (Figura 4).



Figura 3. Colheita de sêmen; A, B e C - Colheita de sêmen pelo método de manipulação digital.
Fonte: Arquivo pessoal.

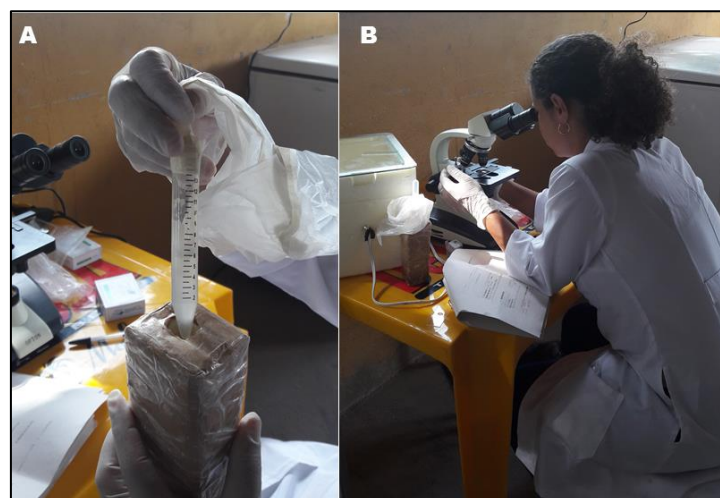


Figura 4. Avaliação seminal; A e B – Análise macro e microscópica do sêmen, respectivamente.
Fonte: Arquivo pessoal.

As avaliações macroscópicas (volume, aspecto e coloração) do sêmen foram realizadas visualmente. Primeiramente, foi observado o volume (em mL) diretamente do tubo de colheita (graduado). Em seguida, foram inferidos valores de acordo com escalas pré-definidas para aspecto (1= aquoso; 2= leitoso; e 3= cremoso) e coloração (1= branca; 2= branca-amarelada; e 3= amarelada). As avaliações microscópicas (motilidade espermática, vigor, concentração e morfologia) foram realizadas com materiais previamente aquecidos em mesa térmica.

Em uma lâmina de vidro foi adicionado uma alíquota de 10 μ L do sêmen para realizar a avaliação da motilidade espermática e do vigor. A observação foi feita em microscópio biológico binocular, no aumento de 200X. Para o parâmetro motilidade, foram atribuídas notas percentuais de 0 a 100% em relação à quantidade de espermatozoides móveis totais, enquanto

para o vigor, os valores de 0 a 5 foram atribuídos conforme a intensidade e velocidade de movimentação CBRA (11).

Para avaliação da concentração espermática, uma alíquota de 10 μL do sêmen foi diluída em 1 mL de água (diluição 1:100) e, posteriormente, uma alíquota de 10 μL da mistura sêmen: água foi colocada em uma câmara de Neubauer (IMPROVED®). O número de células espermáticas foi quantificado em microscópio biológico binocular, no aumento de 400X, conforme preconizado pelo CBRA (11) (Figura 5).

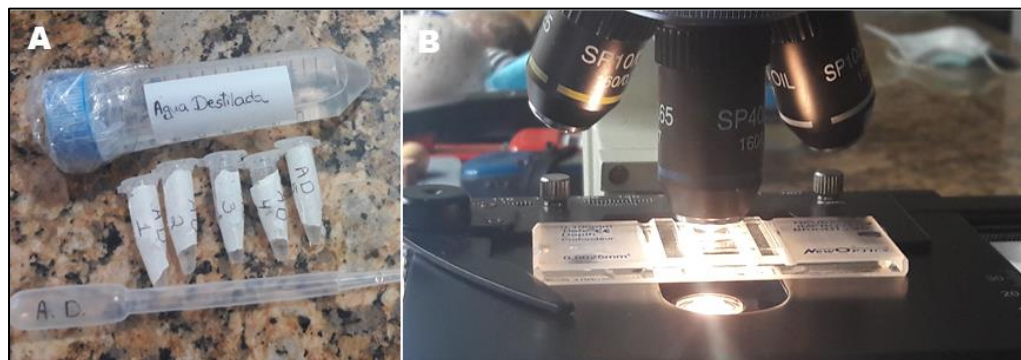


Figura 5. Processo para análise da concentração espermática; A – Sêmen diluído em água destilada e B – Quantificação de células espermáticas na câmara de Neubauer observadas em microscópio óptico.

Fonte: Arquivo pessoal.

Para a análise morfológica, uma alíquota de 50 μL do sêmen foi colocado em microtubo tipo *ependorf* contendo 1 mL de formol-salino tamponado e pré-aquecido à 37°C para fixação da amostra. O material foi submetido a uma raspagem, corado em um Panótico Tipo Rápido e reservado para posterior análise em microscópio biológico binocular em aumento de 1.000X. Nesta análise, foram contabilizadas 200 células de cada ejaculado, verificando-se os percentuais de defeitos espermáticos segundo os critérios adotados por Blom (1973) (Figura 6).

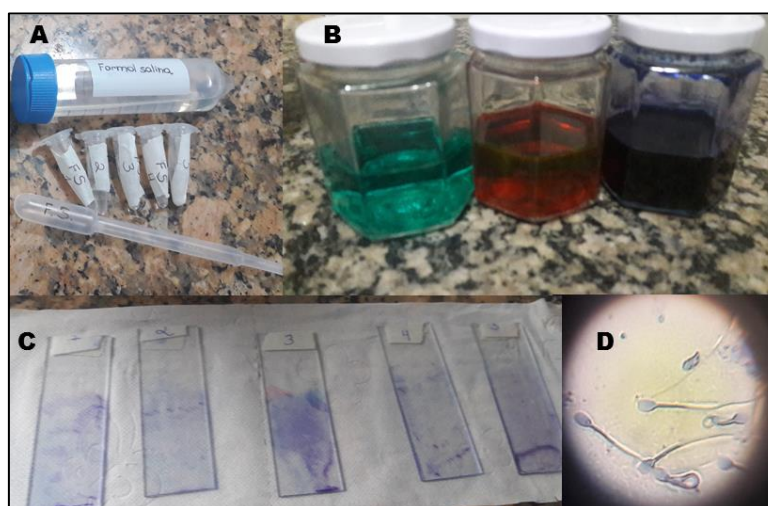


Figura 6. Processo para análise da morfologia espermática; A – Sêmen em microtubo tipo *ependorf* diluído em formol-salino; B – Soluções do Panótico Tipo Rápido; C – Lâminas coradas com o Panótico Tipo Rápido e; D – Visualização de defeitos espermáticos em microscópio óptico

Fonte: Arquivo pessoal.

Após as análises microscópicas e macroscópicas do sêmen, este foi diluído em água de coco natural em uma concentração de 200 milhões de espermatozoides/mL em um tubo tipo Falcon de 15 mL. As amostras seminais mantidas em refrigerador, na posição vertical à temperatura de 5 °C, por até 72 horas. Nos intervalos de seis, doze, vinte e quatro, trinta e seis, quarenta e oito, e setenta e duas horas, as amostras foram avaliadas quanto a motilidade, vigor e morfologia espermática, conforme realizado no sêmen fresco.

Para análise estatística, as variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (teste de Lilliefors) e homocedasticidade (teste de Cochram & Bartlett) e, posteriormente, à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste de Tukey a 5 % de probabilidade para aquelas que apresentarem significância.

Todos os procedimentos de manuseio foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (processo nº 001.2/2021) e foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e com a legislação vigente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos parâmetros seminais encontrados nos ejaculados frescos podem ser observados na Tabela 1. É possível verificar que as características seminais estão dentro da faixa fisiológica para cães, e também, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal CBRA (11), diferindo apenas a concentração espermática.

Tabela 1. Características dos ejaculados frescos (média) coletados pelo método da manipulação digital.

Parâmetros seminais	Valores médios encontrados	CBRA (2013)
Volume (segunda e terceira frações)	6,2 mL	de 1,0 à 80,0 mL
Cor	Branca	Branca acizentada
Aspecto	Aquoso a leitoso	aquoso; seroso; leitoso
Odor	“sui generis”	“sui generis”
Concentração Espermatozoides	418 x 10 ⁶ espermatozoides/mL	20x10 ⁶ /mL a 300x10 ⁶ /mL
morfologicamente normais	92,7 %	≥ 70%

A média dos valores de motilidade total e vigor espermático no sêmen resfriado à 5°C (6 horas) dos cães foi de 86,3 % e 4,1, respectivamente (Tabela 2). Gunawan et al. (12) utilizaram a água de coco natural como meio de conservação para o sêmen canino, mantendo a taxa de motilidade espermática, em quantidades favoráveis à sua utilização em inseminação artificial com o sêmen conservado por até três (76,8 %) e seis horas (74,6 %), a 5 °C. Neste trabalho, após o início do resfriamento à 5°C, os valores de motilidade e vigor diminuíram com o passar do tempo, sendo os menores valores encontrados após 48 e 72 horas.

Os valores encontrados às 6, 12, 24 e 36 horas estão de acordo com as características desejáveis para a dose de espermatozoides refrigerados de acordo com o recomendado pelo CBRA (11), ou seja, motilidade ≥ 50% e vigor ≥ 3. Assim, as amostras seminais analisadas e diluídas em água de coco natural poderiam ser consideradas viáveis para inseminação artificial no período de até 36 horas.

Tabela 2. Motilidade espermática (0-100%) e vigor (0-5) de espermatozoides de cães após o resfriamento, à 5 °C, em água de coco em diferentes momentos ($\chi \pm \text{EMP}$).

Tempos	Parâmetros Seminais	
	Motilidade espermática	Vigor
0 horas	89,5 ± 6,9 ^a	4,3 ± 0,4 ^a
6 horas	86,3 ± 6,9 ^a	4,1 ± 0,3 ^a
12 horas	81,9 ± 8,2 ^a	3,9 ± 0,3 ^a
24 horas	75,1 ± 13,2 ^a	3,5 ± 0,6 ^b
36 horas	66,7 ± 20,8 ^b	3,2 ± 0,9 ^b
48 horas	41,5 ± 23,1 ^c	2,0 ± 0,8 ^c
72 horas	14,7 ± 11,3 ^d	1,1 ± 0,7 ^d

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Lima (13) utilizando na refrigeração de sêmen canino, também à 5 °C, um diluidor à base de água de coco encontrou valores abaixo do preconizado pelo CBRA (11), após as 24 horas, para motilidade (56,7%, 20,0%, 10,0%, 5,6% e 0%) e vigor (2,8; 1,0; 0,4; 0,2; e 0), respectivamente, nos tempos de 12, 24, 36, 48 e 72 horas. Por outro lado, Cardoso et al. (14) encontraram na refrigeração de sêmen canino, à 5 °C, valores superiores para motilidade (82,0%, 72,0% e 64,0%) e vigor (3,8, 3,5 e 2,9), respectivamente, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. No entanto, destaca-se que nesses trabalhos foram utilizados um diluidor industrializado à base de água coco na forma de pó (ACP-[®] ACP Tecnologia, Brasil) que apresenta os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in natura*, mas de forma padronizada para facilitar a comercialização.

Puja et al. (15) utilizaram água de coco natural encontraram valores de motilidade maiores nos tempos de 24 h (83,0% - 84,2%), 48 h (78,7% - 78,8%) e 72 h (67,5% - 64,7%), quando mantidos à 4 °C, porém foram acrescentados alguns crioprotetores externos ao diluente como, carboidratos (frutose - glicose), Tris e ácido cítrico. Melo (16) trabalhou com sêmen refrigerado de cão, à 5 °C, com água de coco em pó (ACP-106[®]) acrescido de 5% de *Aloe vera* (rica em vitamina C, catalase e frutose) e encontrou valor de motilidade menor que o encontrado neste trabalho às 24 h pós-refrigeração (62,1%) e maiores para os tempos de 48 h (58,1%) e 72 h (38,7%) pós-refrigeração. Todavia, no presente trabalho não foi acrescentada nenhuma substância à água de coco para que o diluente ficasse o mais próximo do natural e do encontrado diariamente.

Assim, com este trabalho pode-se observar que o resfriamento à 5 °C em água de coco natural foi um método adequado de armazenamento do sêmen canino (considerando sobrevivência dos espermatozoides) por até 36h após sua coleta, conforme recomendado pelo CBRA (11), sem adição de nenhum crioprotetor.

Neste sentido, a utilização da água de coco *in natura* como diluente seminal poderia ser considerada na rotina técnica de criopreservação de sêmen canino por ser tratar de um produto de fácil aquisição no mercado, ter baixo custo e permitir a conservação das células espermáticas, nos padrões exigidos, refrigeradas à 5°C por até 36h. No entanto, são necessários novos estudos e pesquisas para maior comprovação da eficiência deste diluente e identificar possíveis variações em relação às raças de cães.

CONCLUSÃO

Conclui-se, diante dos resultados obtidos que o diluente a água de coco *in natura* mostrou-se eficiente para refrigeração de sêmen canino, conservando-o, à 5° C, por um período de até 36h após a colheita.

REFERÊNCIAS

- 1- Dutra T, Costa KA, Dias BCV, Marabeli J, Arnone B. Inseminação artificial em cadelas. Rev Cient Eletronica Cienc Apl FAIT [Internet]. 2015 [citado 3 Jul 2022]:1-14. Disponível em: http://fait.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/oRCP2HLFvalFTgW_2015-2-3-15-45-34.pdf
- 2- Diniz P. Reprodução canina [Internet]. São Paulo: Projeto Criador; 2012 [citado 3 Jul 2022]. Disponível em: <https://vdocuments.site/paulo-diniz-reproducao-canina.html>
- 3- Barros TB, Toniolli R. Uso potencial da água de coco na tecnologia do sêmen. Rev Bras Reprod Anim [Internet]. 2011 [citado 23 Jul 2022];35(4):400-7. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n4/pag%20400-407.pdf>
- 4- Silva AR. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. Rev Bras Reprod Anim [Internet]. 2007 [citado 20 Jul 2022];31(1):119-27. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB088%20Silva%20pag%20119-127.pdf>
- 5- Guimarães DB, Barros TB, Cantanhêde LF, Feugang JMN, Souza LP, Toniolli R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação. Rev Cienc Anim Bras [Internet]. 2018 [citado 23 Jul 2022];19:e-38250. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cab/a/9tQHtm7H96mPn4Tk95DQVyP/abstract/?lang=pt>
- 6- Brasileiro LS, Segabinazzi LGTM, Menezes E, Salgueiro CC, Novello G, Scheeren VFC, et al. Coconut water as an extender component for cooled equine sperm. J Equine Vet Sci [Internet]. 2019 [citado 23 Jul 2022];78:69-73. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080619300371>
- 7- Santos BMB, Brito BF, Maia CP, Pires RSC, Salgueiro CCM, Nunes JF. Congelação do sêmen de pequenos ruminantes sem uso de gema de ovo utilizando bases vegetais em substituição à gema de ovo [Internet]. In: Anais do 9o Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal - CONERA; 2018; Belém (PA). Belém: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 2018 [citado 7 Jul 2022]. p. 96-100. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p096-100%20\(RB735\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p096-100%20(RB735).pdf)
- 8- Aragão WM. A importância do coqueiro anão verde [Internet]. Viçosa: Universidade Online de Viçosa; 2000 [citado 7 Jul 2022]. Disponível em: <https://www.uov.com.br/cursos-online-cultivo-e-processamento-de-coco/artigos/a-importancia-do-coqueiro-anao-verde2>
- 9- Nunes JF, Salgueiro CCM. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. Rev Cient Prod Anim [Internet]. 1999 [citado 7 Jul 2022];1(1):17-26. Disponível em: <https://periodicos.ufpb.br/index.php/rcpa/article/view/42608>
- 10- Toniolli R. Morfologia dos espermatozoides de suíno, diluídos no diluidor de Beltsville (BTS) adicionados do ácido 3-indol acético. Cienc Anim [Internet]. 1999 [citado 7 Jul 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cab/a/9tQHtm7H96mPn4Tk95DQVyP/abstract/?lang=pt>

- 2022];9(2):61-5. Disponível em:
<http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo2.1999.2.pdf>
- 11- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.
- 12- Gunawan WNF, Kardena M, Suatha K, Puja K. Coconut water based extender effects on motility, viability, and DNA integrity of chilled kintamani dog semen. *Vet Sci Med J* [Internet]. 2016 [citado 23 Jul 2022];4(1):17-21. Disponível em: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jikh/article/view/26527/16844>
- 13- Lima IRF. Utilização da água de coco em pó, diluidor de Kenney, leite UHT e Tris-gema de ovo na criopreservação de sêmen de cães [trabalho de conclusão de curso] [Internet]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2020 [citado 3 Jul 2022]. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/17419>
- 14- Cardoso JFS, Paula NRO, Uchoa DC, Silva LDM. Diferentes concentrações de gema de ovo na qualidade do sêmen canino diluído em ACP®-106 e resfriado a 4 °C. *Comunicata Scientiae* [Internet]. 2010 [citado 3 Jul 2022];1(2):146-52. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/327127598.pdf>
- 15- Puja K, Sawitri NM, Maharani N, Gunawan WNF, Heryani LGSS. A comparative study on the effects of coconut water based extenders on the quality of kintamani dog semen preserved at 4°C. *Adv Anim Vet Sci*. 2018;6(5):192-6. doi: 10.17582/journal.aavs/2018/6.5.192.196.
- 16- Melo CCS. Avaliação da eficácia dos diluidores tris ou água de coco em pó (ACP-106®), associado a aloe vera (*Aloe barbadensis miller*), na conservação de sêmen canino [tese] [Internet]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2015 [citado 3 Jul 2022]. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/bitstream/tede2/4694/2/Cibele%20Cavalcanti%20Souza%20de%20Melo.pdf>

Recebido em: 05/12/2022

Aceito em: 05/04/2023