

EL AGUA DE COCO (*Cocos nucifera* L) "IN NATURA" INTEGRAL Y ADICIONADA CON CITOQUININAS, COMO DILUTOR DE SEMEN CAPRINO

The coconut water (*Cocos nucifera* L) "in natura" and added of cytokinins as a caprine semen extender

José Ferreira Nunes
María Gorete Flores Salles

Universidade Estadual Do Ceará
Faculdade de Medicina Veterinária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (CE) Brasil

RESUMEN

Este trabajo busca conocer el efecto de la adición de citoquininas en el agua de coco utilizada como dilutor del semen caprino. Se evaluó "in vitro" el comportamiento de los espermatozoides colectados con vagina artificial de cuatro machos caprinos, diluidos en agua de coco "in natura" integral y adicionada con 5 o 100 µg de zeatina, una citoquinina natural. Se aplicó una prueba de termorresistencia, incubando los espermatozoides a 37 °C entre 0 y 120 minutos. Se observó un considerable incremento de la motilidad individual progresiva y del porcentaje de los espermatozoides móviles a los 60 minutos, especialmente con la menor dilución. Estos resultados deberán ser correlacionados con la fertilidad "in vivo" luego de la inseminación artificial.

Palabras Claves: Agua de coco, citoquininas, dilutor, semen caprino.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the addition of cytokinins in coconut water to be used as a caprine semen extender. A "in vitro" sperm evaluate collected with artificial vagina from four bucks diluted in coconut water "in natura" and added with 5 or 100 µg of zeatin, a natura cytokinin, was performed. A heat incubation sperm test at 37 °C between 0 and 120 minutes was conducted. At 60 minutes and with the minor dilution, progressive individual motility and total motility percentage was significantly increased. The fertility results are to be studied "in vivo" after artificial insemination.

Key words: coconut water, cytokinins, extender, buck semen.

INTRODUCCIÓN

La caprinocultura en el Brasil ha venido despertando gran interés tanto por parte de las autoridades gubernamentales como de particulares, debido a que la cabra aprovecha cualquier tipo de vegetación y ocupa espacios mínimos, además de su expresionalidad económica, representada por la calidad de los productos que ofrece al hombre para su alimentación y vestuario.

El desarrollo de la caprinocultura brasileña se inició en la región del Nordeste, la cual posee el 92% del rebaño nacional. En la actualidad también se desarrollan con gran éxito por varios estados de la región del Sudeste, hecho comprobado por la aceptación que los subproductos de la leche la cabra tienen en el creciente mercado de esa región.

La inseminación artificial constituye un método rápido y eficiente para el aprovechamiento genético de la capacidad lechera en los rebaños caprinos, ya que las cabras son más aptas para la producción de leche que de carne. En Brasil, los cruzamientos de machos exóticos de la raza Saanen con cabras nativas de la raza Marota incrementó de 500 a 2500 gr diarios la producción lechera de la primera generación. [7, 45, 46, 47].

El semen puro de caprinos, puede ser utilizado por lo menos 15 veces más en las cabras, ya que aumenta significativamente su capacidad aplicativa a través de simples diluciones [38]. Después de diluido, el semen puede ser conservado a través de refrigeración a +4 °C, para su utilización en un corto espacio de tiempo, o conservado en congelación a -196 °C en nitrógeno líquido, lo que favorece su utilización por un largo período de tiempo poscongelación. [46, 47].

El procesamiento del semen caprino presenta dificultades en relación con la congelación, los problemas son genera-

dos por la interacción del plasma seminal con los fosfolípidos existentes en los dilutores usualmente utilizados en el procesamiento y criopreservación del material espermático [46, 47]. Entre las alternativas de los dilutores bajos en fosfolípidos, se debe considerar el agua de coco, por el excelente comportamiento del semen caprino, tanto "in-vitro" como en la fertilidad [43].

Cuando se realizó el proceso de dilución y refrigeración del semen caprino en agua de coco, se obtuvo un mayor tiempo de sobrevivencia espermática cuando se comparó con la dilución en leche descremada [44], lo cual permite bajar los costos de la tecnología aplicada para lograr un incremento de la productividad lechera de las cabras nativas del Nordeste de Brasil.

La aplicación de semen diluido en agua de coco mostró un nivel de fertilidad superior que el semen diluido en leche, incrementando también la proporción de crías del sexo femenino [43]. Este mayor porcentaje de crías del sexo femenino, confirma los trabajos de Nunes [43,44,45] y Freitas [19], quienes encontraron mayores índices de nacimientos de crías hembras, destacando la posible influencia inhibitoria de este dilutor sobre la pre-selección de espermatozoides "Y" ó favoreciendo tal vez a los espermatozoides portadores del cromosoma "X". Este incremento de crías del sexo femenino cuando se trabaja el semen con agua de coco, podría estar relacionado con factores físicos o químicos inherentes al agua de coco, ya que el coco presenta peculiaridades hasta entonces no estudiadas como dilutor del semen caprino [51].

Con el propósito de explicar la mayor proporción de crías del sexo femenino, y a pesar de que el modo de acción de los componentes del agua de coco sobre el metabolismo "in vitro" del semen caprino no este bien dilucidado, en el presente estudio se procederá a verificar el desempeño del agua de coco utilizada como dilutor. Se adicionarán citoquininas a diferentes concentraciones y también se procurará esclarecer si el estímulo de la motilidad del espermatozoide caprino, verificado con el uso del agua de coco, se debe a las citoquininas presentes, las cuales actúan como aceleradores del crecimiento vegetal.

Una mayor proporción de crías del sexo femenino, podría ser de real importancia para el incremento de la eficiencia reproductiva del rebaño caprino, haciendo posible de esta manera, una mayor producción de leche y proteínas para la población humana [51].

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El reproductor caprino se presenta con un gran potencial reproductivo, cuando se compara con otras especies especialmente de rumiantes. Esa potencialidad lo caracteriza y se demuestra por los aspectos cuali y cuantitativos de su producción espermática [43].

Algunos factores ambientales, como las variaciones estacionales de temperatura, régimen de las lluvias y el consiguiente estado nutricional de los pastos, pueden afectar el ritmo de las secreciones hormonales y así modular los periodos reproductivos [39].

Las variaciones en la producción espermática de los caprinos fueron consecuencia de la influencia estacional, la edad, la raza y el estado de salud, que son factores determinantes en su potencialidad como reproductor [33].

Los trabajos referentes a producción espermática no son muy numerosos. El interés por la aplicación de la inseminación artificial en caprinos puede ser validado a través del estudio efectuado por Lunca [33]. Los valores de motilidad espermática del eyaculado diluido y congelado difieren de un macho a otro después de la descongelación [10].

Cuando el semen es almacenado a temperaturas por encima de 0 °C, la sobrevivencia de las células espermáticas es corta en muchos dilutores (Dauzier, Tewari, Shani y Roy, John y Raja, Hiroe y Udatsu, cit por 10), y la capacidad fertilizante del semen no puede ser preservada en un nivel alto por más de unas pocas horas (Dauzier, cit. por 10).

A los trabajos iniciales sobre el uso del semen caprino puro, diluido o refrigerado [5, 6, 52, 57], se continuaron aquellos referentes al empleo de semen congelado [2, 3, 11, 12, 14, 17, 23, 25, 30, 31, 37, 54].

Los buenos resultados obtenidos señalan a la inseminación artificial como un método capaz de mejorar a corto plazo las condiciones genéticas de los rebaños, facilitándole a los criadores, con un mínimo de gastos, el acceso a reproductores de razas puras, generalmente de alto costo.

La congelación del semen caprino ha merecido la atención de investigadores de varios países con resultados relativamente satisfactorios. Liess y Ostrowski [30] congelaron semen caprino a -79 °C usando un dilutor a base de citrato-fosfato-gelatina (Spermasol), adicionado de yema de huevo y glicerol, obteniendo 13.33% de partos en 90 hembras inseminadas.

Kalev y Venkov [27] congelaron a ritmo rápido, semen caprino en hielo seco, utilizando como dilutor una solución de citrato-yema-glicose-glicerol, obteniendo 32.6% de fecundación mediante la aplicación del material procesado.

Fraser [18] logró obtener 5 cabras preñadas producto de 6 inseminaciones con semen diluido en leche descremada y congelado a ritmo lento, mientras que Dauzier [14] usando también leche descremada como dilutor y congelación lenta a -79 °C, encontró una buena sobrevivencia de los espermatozoides a la descongelación y apenas 5% de pariciones.

Hoffman et al [26] verificaron variaciones estacionales en la producción espermática del macho cabrío. Las glándulas vesiculares estan altamente activas durante la estación de

monta. El nivel de testosterona y de androsterona es más alto en la estación sexual que fuera de ella o durante la pubertad.

Cortee et al [9] observaron que el plasma seminal de los caprinos disminuye la resistencia de los espermatozoides a soportar la congelación. La necesidad de separar el plasma seminal antes de la congelación, como una forma de mejorar la congelabilidad del semen caprino, fue destacada por estos autores, en el cual se observó un índice de motilidad más alto en el semen lavado antes y después de congelado.

Fougner [16] refirió la existencia de una enzima semejante a la lecitinasa en el semen del caprino, que afectaba la sobrevivencia de los espermatozoides "in vitro". Por esta razón, sustituyó el plasma por un dilutor a base de tris, obteniendo como resultado 81 y 75% de fertilidad en dos pruebas realizadas utilizando semen congelado. Es importante resaltar que Roy [50] ya había informado de la presencia de una enzima en el semen caprino, la cual es secretada por las glándulas bulbo-uretrales que coagula las lecitinas de la yema de huevo y torna el medio altamente tóxico para los espermatozoides.

Nunes [42] notó que durante el procesamiento del semen, las células espermáticas permanecen bajo la acción de los efectos nocivos del plasma seminal tanto a temperaturas de +37 °C como debajo de 0°C. Basándose en este problema, procedió al lavado de los espermatozoides disminuyendo la interacción del plasma seminal, a través de una enzima del tipo fosfolipasa "A", la cual actúa sobre los fosfolípidos de los dilutores normalmente utilizados, liberando lisolecitinas y ácidos grasos, que son particularmente tóxicos para los espermatozoides.

Souza [54] usó la solución de Krebs-ringer-fosfato y la solución de citrato de sodio al 3% para el lavado del semen caprino, ambos mostraron ser igualmente eficaces en las diversas etapas del proceso de congelación.

Muchos otros dilutores que han sido probados en la congelación del semen caprino han tenido aceptación, pero la leche descremada continúa siendo el dilutor de preferencia, debido a su fácil disponibilidad [26].

La selección de un método alternativo capaz de permitir el procesamiento del semen caprino, suprimiendo o disminuyendo los efectos negativos de la fosfolipasa sobre el semen, se constituyó en un área de investigación prioritaria. Una opción sería el descubrimiento de un dilutor que permitiera un comportamiento satisfactorio "in vitro" e "in vivo" del semen, evaluado a través de la calidad y el tiempo de sobrevivencia de los espermatozoides a +37 °C, +4 °C y -196 °C. Todo este comportamiento debería estar correlacionado con la fertilidad de las hembras inseminadas con semen procesado a través de esta nueva tecnología.

Dentro de las alternativas de los dilutores pobres en

fosfolípidos, debe ser considerada el "agua de coco", ya que el semen diluido en ella mostró excelente comportamiento tanto "in vitro" como en fertilidad. La motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos a +4°C son significativamente superiores en el semen diluido en agua de coco en comparación con el diluido en leche. El tiempo de sobrevivencia de los espermatozoides es del orden de 60 horas en el agua de coco contra apenas 6 horas en leche [44, 55]. Igualmente, la fertilidad de las cabras resulta superior cuando son inseminadas con semen diluido en agua de coco en comparación con el diluido en leche, existiendo además, referencias de una posible influencia en la relación del sexo expresada en un mayor número de crías hembras nacidas de semen diluido con agua de coco [43, 51].

La búsqueda de dilutores para el semen de diversas especies, llevo a algunos investigadores a trabajar con la leche de coco [41, 48, 4], concluyéndose que ésta presenta en su composición una razonable cantidad de fosfolípidos que dificultan su empleo en el semen caprino.

Debido a los prometedores resultados obtenidos en los primeros estudios con el agua de coco "in natura" y con el objetivo de facilitar su aplicación a nivel de campo, se procedió a su estabilización en forma de gel [43]. La estabilización del agua de coco, tanto en forma líquida como en la de gel, facilitaría su empleo así como su difusión en los trabajos de inseminación artificial, tornándose fundamental en el procesamiento del semen caprino [46, 47].

La evaluación de las características "in vitro" de los espermatozoides del semen de machos caprinos nativos del Nordeste brasileño, cuyo semen fue diluido en agua de coco bajo las formas "in natura" estabilizada y en gel, demostraron que los espermatozoides con mejor comportamiento fueron aquellos diluidos en agua de coco "in natura" (Fig.1) [55]. El excelente desempeño "in vitro" de los espermatozoides de semen caprino en el agua de coco sintética, se evidenció por las altas tasas de pariciones en cabras, permitiendo su recomendación final como dilutor en el procesamiento del semen caprino y su empleo en los programas de inseminación artificial [51].

Salles [51] inseminó 78 cabras con semen refrigerado a +4 °C, diluido en agua de coco bajo las formas "in natura", estabilizada y de gel, y obtuvo una tasa de parición global del 83.33%. En lo referente a los dilutores utilizados, los valores encontrados fueron 63.15, 87.5 y 92.59% respectivamente, evidenciándose un mejor comportamiento "in vivo" de las formas sintéticas del agua de coco.

El agua de coco como dilutor del semen caprino, no sólo simplifica el procesamiento del semen caprino, sino que disminuye la relación costo/beneficio de la criopreservación del semen caprino [37]. El uso del agua de coco como dilutor o como solución de lavado de las células espermáticas, ofrece una perspectiva favorable en la minimización de tecnología en el

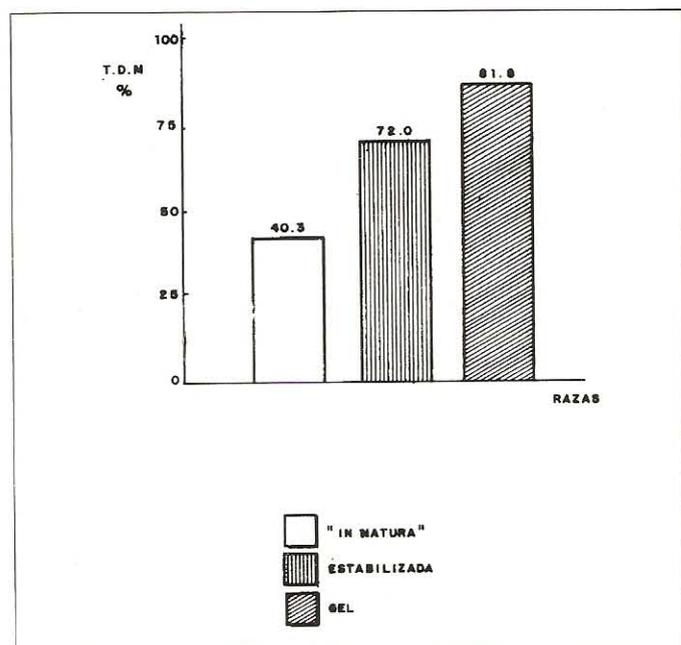


FIGURA 1. TASA DE DEGRADACIÓN MEDIA (%) DE LOS ESPERMATOZOIDES DE CAPRINOS DE RAZAS NATIVAS, INCUBADOS EN AGUA DE COCO "IN NATURA", ESTABILIZADA Y EN GEL, A 37°C DURANTE 180 MINUTOS.

procesamiento del semen caprino en lo que se refiere a los costos, permitiendo así la difusión de la nueva técnica en el campo de la inseminación artificial de la especie caprina [3].

El alto porcentaje de crías hembras (55.6% vs 44.4% de machos), nacidas de partos en los que se utilizó semen diluido en agua de coco, confirma la posible influencia de este dilutor sobre la preselección de espermatozoides con el cromosoma "Y", favoreciendo de esta manera la mayor tasa de fecundación de los espermatozoides portadores del cromosoma "X" [19].

Salles [51] al estudiar la eficiencia reproductiva de cabras sin raza definida (SRD), sincronizadas e inseminadas con semen diluido en agua de coco "in natura" y bajo las formas de gel y estabilizada, encontró una proporción de crías del sexo femenino de 83.33, 76.0, y 67.86% respectivamente. A partir de estos resultados obtenidos, comenzaron los nuevos estudios, donde este dilutor fue adicionado con diferentes concentraciones de citoquininas. El agua de coco inmaduro contiene sustancias promotoras del crecimiento todavía no identificadas. Kovoov (cit. por 49) demostró, que el principio activo del agua de coco, es una sustancia que posee las propiedades de las auxinas y citoquininas al mismo tiempo.

Los fisiólogos constataron que en numerosas especies vegetales, el agua de coco inmaduro indujo diferenciación celular en plantas que en otras condiciones hubieran permanecido en estado de dormancia. Van Overbeek *et al* (cit. por 49) fueron los primeros en utilizar el agua de coco como acelera-

dora de la maduración de embriones divididos de "DATURA" que permanecían inmaduros. Caplin y Steward (cit. por 49) obtuvieron en tejidos de zanahoria, una diferenciación mucho más acentuada en presencia del agua de coco.

Según Gómez [22] el cocotero fue introducido en el Brasil por los portugueses en 1533. Se introdujeron en Bahía y de ahí, tal vez su denominación en el Nordeste del Brasil de Cocotero-de-Bahía como sucede en Ceará, Río Grande del Norte, Paraíba y en Pernambuco. En las playas se encuentran en grandes cantidades, siendo una de las características de los paisajes del litoral. El cocotero-de-Bahía se encuentra en las regiones calientes de América, Asia, África y Oceanía, en los continentes y en las islas.

El Cocotero-de-Bahía o Cocotero-de-Playa, *Cocos nucifera L.*, pertenece a la sub-familia *Cocosideae*, tribu *Cocoseae* de la familia *Palmae*, Engler [15] (cit. por 36). Técnicamente el agua de coco es el líquido del endosperma encontrado dentro de las cavidades del coco. El contenido de agua presente, depende del tamaño del fruto, variedad y estado de maduración [24]; es una solución ácida y estéril que contiene sales, proteínas, azúcares, alcoholes de azúcares, vitaminas, factores de crecimiento y grasas neutras [35, 1].

Según Prevot [49] (cit. por 36), en virología, el agua de coco es utilizada para el desarrollo de meristemos vegetativos y florales, cuyo cultivo es la base de un método de cura para plantas infectadas con virus. El agua de coco también sirve como fuente de factores de crecimiento para los cultivos de tejidos destinados al estudio de la biosíntesis de virus vegetales.

Las citoquininas son sustancias reguladoras del crecimiento que producen división celular en las plantas. Desde su descubrimiento en la década del cincuenta como hormona de división celular, se ha demostrado que las citoquininas también están involucradas en la diferenciación, elongación celular, crecimiento y senescencia foliar, dominancia apical, germinación, desarrollo de los organelos, actividad enzimática, abertura estomática, desarrollo del fruto e hidrólisis de reservas de semillas. Es evidente por la variación de los fenómenos antes mencionados, que esta hormona actúa fundamentalmente en la vida de las plantas.

Miller [40] consiguió por medio de autoclave, aislar del DNA de espermatozoides de arenques, los primeros cristales de un agente inductor de división celular. Esa sustancia que promueve la división celular en callo de tabaco en concentraciones tan bajas como una parte por billón (1 ppb), fue denominada "cinetina". Varios análisis químicos, unidos al hecho de que había sido extraída del DNA, sugerían que era un derivado de purina; y que por hidrólisis producía adenina.

Existen compuestos que exhiben actividad semejante a las citoquininas que no son derivados de purinas y por lo tanto, no se relacionan con la adenina. Los más comunes son de-

rivados de la úrea, de estos, más de doscientos tienen actividad biológica como la difenilúrea que fue aislada de la leche de coco. Extractos y jugos de varias plantas, muestran actividad típica de división celular, el más famoso de los cuales es probablemente el endosperma líquido del coco (*Cocos nucifera*), que contiene muchos factores necesarios para el crecimiento de tejidos en cultivos.

Van Oberbeek en 1940 descubrió que el endosperma lechoso de cocos inmaduros era rico en compuestos que promovían citocinas; mientras que Steward en 1950 utilizó la técnica de cultivo celular y aisló muchas citoquininas de la leche de coco que incrementaban la división celular en la zanahoria. En 1955 Shant y Steward [53] encontraron 1,3 difenilurea mediante la extracción completa con solventes y demostraron que el compuesto cristalino poseía actividad citoquinínica.

La primera citoquinina natural en plantas fue extraída y cristalizada por Lethan en 1963 [28], la denominó "zeatina" y la extrajo de granos de maíz en desarrollo. La zeatina es la citoquinina natural más activa, siendo diez veces más potente que la cinetina. La descripción de una auténtica citoquinina en leche de coco fue realizada por Lethan en 1974 [29]. Otra de las citoquininas naturales presentes en la leche de coco posiblemente sea la fenilalanina, encontrada por Van Standen y Drewes [56] e identificada a través de cromatografía, espectrometría de masas, espectrofotometría infra-roja y resonancia magnética nuclear.

Después de su descubrimiento en el maíz, la zeatina fue encontrada en las más diversas especies, lo que sugiere que ella está altamente distribuida en plantas superiores. La citoquinina contenida en el agua de coco es la zeatina ribosídica, que es relativamente abundante en las plantas (comunicación personal con el fitotecnista Raimundo Gleidstone Aragao, 1992). La zeatina induce la división celular en tejido de tabaco y zanahoria en concentraciones de 5×10^{-11} M. Este efecto es generalizado a través del reino vegetal y fue demostrado en bacterias, hongos y algas, así como también en algunos protozoarios. Existen también indicios que las citoquininas inducen división celular en animales superiores; ellas fueron detectadas en el t-RNA de mono, carnero, ratón y humano [20].

Se han demostrado varios efectos de las citoquininas sobre importantes procesos fisiológicos como floración, expresión sexual y formación de frutos. La cinetina, zeatina y adenina aumentan la sensibilidad de la "perilla" y la "pharbitis" en los días cortos, mientras que no tienen ningún efecto sobre esas mismas plantas en condiciones no-inductoras. Esto es debido a que los niveles endógenos de citoquininas varían con la longitud del día, algunos investigadores sugieren que sus efectos sobre los ácidos nucleicos (que parecen estar involucrados en el proceso de floración) pudieran ser responsables de los efectos observados.

La floración también puede incrementarse en muchas

especies a través de las citoquininas; igualmente inducen el fotoperíodo en varias especies. La subsecuente etapa de expresión sexual, nacimiento y desarrollo del fruto pueden ser susceptibles de alteraciones mínimas provocadas por las citoquininas [8, 34].

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo constituye una evaluación "*in vitro*" del comportamiento de los espermatozoides caprinos incubados a $+37^\circ\text{C}$ durante 120 minutos diluidos en agua de coco "*in natura*" y adicionados de citoquinina.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Núcleo de Caprinos y Ovinos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Ceará, Campo de Itaperi, región del litoral de Fortaleza. El clima, según Köppen, es húmedo y semihúmedo tipo AW con precipitación media anual de 1.378,3 mm y temperatura media de $26,8^\circ\text{C}$, altitud de 15,49 m, latitud S de $3^\circ 43'$ y longitud W de $38^\circ 32'$.

Se utilizaron cuatro reproductores provenientes de fincas con manejo semi-intensivo; dos de la raza Moxotó, uno Canindé y otro Gurgéa con edades y pesos promedio de 4 años y 35 Kg. Las colecciones con vagina artificial se realizaron dos veces por semana. El semen después de colectado, se evaluó por volumen y motilidad masal. Cada eyaculado fue fraccionado en tres alícuotas, una se diluyó en agua de coco "*in natura*" y en diferentes concentraciones de citoquinina adicionadas al agua de coco.

El agua de coco "*in natura*" provenía de un fruto con aproximadamente seis meses de madurez, lo que corresponde con el inicio de la formación de una cutícula interna del endocarpo. Para la preparación de 100 ml de agua de coco "*in natura*" se utilizó 50 ml de agua de coco filtrada, 25 ml de agua destilada y 25 ml de citrato de sodio al 5% para las correcciones parciales de la osmolaridad y el pH respectivamente. Esta solución fue preparada momentos antes de la dilución. Una alícuota del agua de coco "*in natura*" se adicionó con 5 μg de zeatina y a otra de 100 μg de zeatina. La citoquinina utilizada en el experimento fue donada por Microbiológica (Consultoría de análisis de productos biológicos). Todos los eyaculados diluidos fueron incubados a $+37^\circ\text{C}$, para luego ser evaluados en el microscopio óptico por su motilidad progresiva individual (escala 0-5) y porcentaje de espermatozoides móviles a través de pruebas de termorresistencia a 5, 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación. Toda la información obtenida se anotó en fichas diarias.

Se utilizó la prueba "t de Student" para las comparaciones de las medias de la motilidad progresiva individual y porcentaje de espermios móviles con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS PRELIMINARES

Al evaluar la motilidad progresiva individual del semen caprino incubado a +37°C durante 120 minutos y diluido en agua de coco "in natura", se confirmó el excelente comportamiento de las células espermáticas en el agua de coco, hallazgo este, reportado en otros estudios similares [3, 19, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 58].

El estudio realizado con el propósito de conocer la posible acción de la citoquinina natural zeatina, sobre la motilidad progresiva individual de las células espermáticas, permitió observar que a los 60 minutos de incubación hubo un incremento sustancial de la motilidad progresiva individual. El dilutor que contenía la menor concentración de zeatina/ml parece ser

responsable del incremento de la motilidad (Cuadro 1). Un comportamiento semejante al de la motilidad progresiva individual, fue observado en el porcentaje de espermatozoides móviles, donde a los 70 minutos de incubación se percibe un incremento en el dilutor adicionado de zeatina (Cuadro 2).

La información presentada fue obtenida con pocas repeticiones, por lo que es necesario la realización de mayor número de investigaciones para aclarar los beneficios de este nuevo dilutor. Esta información podrá ser obtenida al finalizar los experimentos contenidos en el proyecto, del cual es parte esta investigación. También es importante correlacionar los datos de la validación "in vitro" del dilutor con la fertilidad "in vivo".

CUADRO 1

MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDAR PARA MOTILIDAD PROGRESIVA INDIVIDUAL DE ESPERMATOZOIDEOS CAPRINOS DILUIDOS EN AGUA DE COCO "IN NATURA" ADICIONADA CON ZEATINA E INCUBADA A +37°C DE TEMPERATURA

Tiempo de Incubación	DILUTOR		
	"In Natura"	A.C +5 µg Zeat.	A.C +100 µg Zeat.
5	3.81 ± 0.23	3.34 ± 0.57	3.26 ± 0.40
30	3.84 ± 0.14	3.40 ± 0.78	3.48 ± 0.49
60	3.78 ± 0.16	3.76 ± 0.75	3.41 ± 0.57
90	3.74 ± 0.13	3.42 ± 0.68	3.12 ± 0.68
120	3.68 ± 0.15	3.47 ± 0.55	2.95 ± 0.41

ac + 5 µg zeat.= agua de coco + 5 µg de zeatina.

ac + 100 µg zeat.= agua de coco +100 µg zeatina.

CUADRO 2

MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDAR DEL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS DE CAPRINOS MOTILES DILUIDOS EN AGUA DE COCO "IN NATURA" ADICIONADA CON ZEATINA E INCUBADA A +37°C DE TEMPERATURA

Tiempo de Incubación	DILUTOR		
	"In Natura"	A.C +5 µg Zeat.	A.C +100 µg Zeat.
5	87.9 ± 2.5	78.8 ± 8.5	77.8 ± 5.6
30	85.9 ± 5.0	80.0 ± 7.6	74.4 ± 11.9
60	84.3 ± 3.6	78.3 ± 5.7	73.1 ± 13.3
90	83.6 ± 4.2	73.1 ± 5.9	70.7 ± 10.8
120	82.0 ± 4.0	69.1 ± 13.1	69.0 ± 10.8

ac + 5 µg zeat.= agua de coco + 5 µg de zeatina.

ac + 100 µg zeat.= agua de coco +100 µg zeatina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Agua de coco, o elixir da longa vida. São Paulo, Abril, Saúde (12): 34-7, 1984.
- [2] Andersen, K. Insemination with frozen semen in goats. Nord. Vet. ked. 21: 625-628, 1969.
- [3] Araujo, A.A. Utilização da água de coco "in natura" com adição de gema de ovo, como diluente de congelação do sêmen caprino. Fortaleza. Universidade Estadual do Ceará. (Monografia de Especialização). 1990.
- [4] Balakrishnan, P.P.; Neelakanta, T. Preservation of buck semen at room temperature in coconut milk extender. Kerala J. Vet. Sci. 13(2): 321-324, 1962.
- [5] Benediktovic, S. An experiment on artificial insemination in goats. Oytscyodstyo. U.S.S.R. (4): 26. In: Anim. Breed. Abst. 2: 219, 1934.
- [6] Bonfert, A. Erfahrungen mit der ziegenbesamung in Saarland. International Congress on Animal Reproduction, 4, Hague. Proc. 4, 858-672. 1961
- [7] Cancio, C.B.R.; Rangel, J.H.A.; Cliveira, F.J.; Tenorio Junior, N. Comportamento produtivo e reprodutivo de caprinos das racas Saanen, Marota e seus mestiços no sertão de Alagoas. (Pesquisa em andamento, 17). 18 p. 1985.
- [8] Caplin, H.; Steward, F.C. Cytokinins. Plant physiology, a treatise. Academic Press. New York. 6B: 181-212. 1972.
- [9] Corteel, J.M. Viabilité des spermatozoides de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal. Effet du glucose. Ann. Biol. Bioch. Biophys. 14 (4b) 741-745. 1974.
- [10] Corteel, J.M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: GALL, C. Goat production. London. Academic Press. p. 171-191. 1981.
- [11] Corteel, J.M.; Baril, G. Production de sperme chez le bouc: variation saisonnières de la quantité et de la qualité du sperme recolté selon l'âge des animaux. Journée de la Recherche Ovine et Caprine. Paris, p.4-17. 1975.
- [12] Costa, S.A.; França, M.P.; Vinha, N.A. Inseminação artificial em cabras nativas com sêmen congelado, após sincronização de cio com PGF₂. Arq. Esc. Vet. UFMG. Belo Horizonte, 34(2): 273-277, 1982.
- [13] Crane, C.; Van Overbeek, J. Cytokinins. Annu. Rev. Plant. Physiol. 21:359-384, 1965.
- [14] Dautzier, L. Quelques résultats sur l'insemination artificielle des brébis et des chevres en France. International Congress on animal Reproduction. 3, Cambridge. Proc. 119-145. 1962
- [15] Engler, A. Syllabus der pflanzenfamilien. Gebrüder Borntraeger, Berlin, II band, 66 p., 1964. Apud MEDINA, J.C. Cultura. Série Frutas Tropicais do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas-SP. 5, 7-172. 1980.
- [16] Foufner, J.A. Uterine insemination with frozen semen in goat. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Krakow. proc. VIII, 4, 987-990. 1976.
- [17] França, M.P. Inseminação artificial com sêmen congelado de caprinos no sertão de Pernambuco. Niterói. Universidade Federal Fluminense. (Tese de Mestrado). 1981.
- [18] Fraser, A.F. A technique for freezing goat semen and results of a small breeding trial. Can. Vet. J. 3(5): 133-144, 1962.
- [19] Freitas, V.J.F. Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (hCG) inseminadas artificialmente. Fortaleza. Universidade Estadual do Ceará. (Monografia de Especialização). 1988
- [20] Ferri, M.G. Fisiologia Vegetal. EDUSP. São Paulo, cap. 4.
- [21] FUNCEME. Dados meteorológicos de Fortaleza. 11 p. 1974-1977.
- [22] Gomes, R.P. O coqueiro-da-baía. 2 ed. São Paulo, Nobel. 11 p. 1977.
- [23] Gonzalez, G.S. Inseminación artificial en cabras com semen congelado. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Krakow. Proc. VIII, 1503-1507. 1976.
- [24] Hagenmayer, R.D. Coconut aqueous processing, 2 ed. Philippines, San Carlos Publ., 283 p. 1980.
- [25] Haibel, G.K. Semen freezing and artificial insemination, In: Current therapy in therio-genology, Philadelphia, W.B. Saunders, 1986.
- [26] Hoffman, W.; Leiddl, W.; Karo, H. Seasonal rhythm of

- reproduction in the male goat. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Hannover, Proc.VII 2065-2068. 1972.
- [27] Kalev, G.; Venkow, T. Sur la méthode de congelation profonde du sperme de taureau, de bélier et de bouc. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Hague. Proc. IV. I, 972-974. 1971.
- [28] Letham, D.S. *Phytochemistry*, 12. 2445. 1963.
- [29] Letham, D.S. *Physiology Plant.*, 32, 66. 1974.
- [30] Liess, J.; Ostrowsky, J.E.B. Beitrag zur samenertragung bei anwendung des tiefkuhlfahrens (-79 °C). Artificial insemination in goats using deep frozen semen (-79°C); *Anim. Breed. Abst.* 28(4): 425, 1960.
- [31] Lyngset, O.; Amdal, J.; Welle, W. Artificial insemination in the goat with deep frozen semen and liquid semen after hormonal synchronization of oestrous. *Nord. Vet. Med.* 17: 178-181, 1965.
- [32] Loysel, C. Voies disponibles pour atténuer chez les caprins l'aspect saisonnier de la reproduction et de la production laitière et augmenter la productivité des troupeaux. Nouzilly, INRA, 5 p. (Thèse BTS Production Animale). 1984.
- [33] Lunca, N. Artificial insemination in sheep and goats on the international plane. Congreso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale Trento. Proc. V. 118-146. 1964.
- [34] Maheshwari; Venkataraman. Cytokinins. In: Skoog, F. & Armstrong, D.J. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 21: 359-384, 1970.
- [35] Marques, A.L.V. Agua da coco. Fortaleza-Ce, Sociedade Cearense de Ginecologia e Obstetrícia. Informativo SOCEGO, ano II, nº 92, 1982.
- [36] Medina, J.C. Cultura. In: Série de Tecnologia de Alimentos. Campinas-SP, 5. 7-172. 1989.
- [37] Melo, A.C.M. Utilização da água de coco e do leite glicosado como diluente para a congelação do sêmen caprino. Fortaleza. Universidade Estadual do Ceará. (Monografia de Especialização). 1990.
- [38] Mies Filho, A. Reprodução de animais e inseminação artificial 5ª ed, Porto Alegre. SULINA. 2 vols, 788 p. 1982.
- [39] Mies Filho, A. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial na espécie ovina. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte, Anais. VII. 1-17. 1988.
- [40] Miller, C.O. *Plant Physiol.*, 31. 318. 1954.
- [41] Norman, C. ; Johnson, C.E. Liability of bovine spermatozoa at room temperature in a coconut milk citrate-calcium-carbonate diluent. *J. Dairy Sci.*, 41: 733, 1959.
- [42] Nunes, J.F. Étude des effets du plasma seminal sur la survie "in vitro" des spermatozoïdes de bouc. Paris. Université Pierre et Marie Curie. (Thèse de Doctorat). 1982.
- [43] Nunes, J.F. Inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. Simposio da Caprinocultura do Estado Dorio. Niterói. 1986.
- [44] Nunes, J.F. Artificial insemination in goats. International Conference on Goats, Brasília. Proc. IV. 733-743. 1987.
- [45] Nunes, J.F. A inseminação artificial em caprinos no nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, 12(2): 85-91, 1988.
- [46] Nunes, J.F. Exame clínico-andrológico e tecnologia do sêmen caprino. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte. Anais. VII 121-129. 1988.
- [47] Nunes, J.F. Fatores que influenciam os aspectos quanti-qualitativos do sêmen caprino no nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* Belo Horizonte. 12(2): 77-83, 1988.
- [48] Pillai, V.B.; Neelakanta, J.C.P.; Mathai, E. Efficiency of coconut milk-extender as diluent for the preservation buck semen at room temperature. *Kerala J. Vet. Sci.* 9 (2): 290-292, 1978.
- [49] Prevot, P.L. L'utilisation du lait de coco comme accélérateur de croissance des végétaux. *Oléagineux* 23 (3) 177-178, 1968.
- [50] Roy, A. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature.* 179: 318, 1957.
- [51] Salles, M.G.F. Agua de coco (*Cocos nucifera L.*) "in natura" e sob a forma de gel e estabilizada, como diluidor do sêmen caprino. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (Tese de Mestrado). 1989.

- [52] Setinsky, Z.; Oelicario, J.; Kaciga, M. Artificial insemination in goats in Zagreb in 1952 a 1956. Anim. Breed. Abst., 26 (1): 63, 1958.
- [53] Shantz, E.M.; Steward, F.C. J. Am. Chem. Soc., 77 (6). 351, 1955.
- [54] Souza, I.M. Congelação de sêmen de bode. Efeito de duas soluções de lavagem. A Hora Veterinária. Porto Alegre 29:53-58, 1986.
- [55] Toniolli, R. Avaliação "in vitro" do sêmen de caprinos das raças nativas do nordeste brasileiro, diluídos em água de coco sob a forma "in natura", estabilizada e gel. Fortaleza. Universidade Estadual do Ceará. (Monografia de Especialização). 1988.
- [56] Van Standen, J.; Drewe, S.E. Physiol. Plant. 32. 147. 1974.
- [57] Wagner, H. Erfahrungen und versuche in der ziegen besamung (Experiances and experiments in the insemination of goats). Hannover, 1949. (Disseertação Inaugural). In: Anim. Breed. Abst., 19(3): 362, 1949.