

## Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos

Andreia Fernandes de SOUZA<sup>1</sup>  
 Maria Madalena Pessoa GUERRA<sup>1</sup>  
 Zoraide Fernandes COLETO<sup>1</sup>  
 Rinaldo Aparecido MOTA<sup>1</sup>  
 Leonildo Bento Galiza da SILVA<sup>1</sup>  
 Ana Emília Duarte de Souza LEÃO<sup>1</sup>  
 Eliezer Silva do Nascimento SOBRINHO<sup>1</sup>

1 - Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE

### Resumo

Objetivou-se avaliar a flora microbiana no sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos, assim como a eficácia dos antibióticos estreptomicina, penicilina e gentamicina, na viabilidade de doses de sêmen congeladas. Foram utilizados 25 reprodutores de diferentes raças, submetidos a duas colheitas de sêmen através do método da vagina artificial, após higiene da região prepucial. A primeira colheita do sêmen foi realizada visando o exame microbiológico e a segunda teve como objetivo proceder a congelamento, após diluição em leite desnatado, utilizando penicilina + estreptomicina (A1), gentamicina (A2) ou sem antibiótico (A3). Ao proceder a avaliação microscópica no sêmen fresco, evidenciou-se média de  $87,92 \pm 7,76\%$  de motilidade individual progressiva (MIP) e  $4,96 \pm 0,20$  de vigor espermático. Em relação à avaliação bacteriana, constatou-se principalmente bactérias do gênero *Staphylococcus spp* e *Bacillus sp*. Após a congelamento do sêmen, não foram evidenciadas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os grupos quanto a MIP e vigor espermático. Entretanto, na avaliação microbiológica pós-descongelamento, a bactéria do gênero *Staphylococcus spp* esteve presente na maioria das amostras. Observou-se também que a gentamicina ( $13,3\text{mg/mL}$ ) apresentou melhor atividade antimicrobiana no processo de congelamento do sêmen, concluindo-se que pode ser o antibiótico usado na congelamento do sêmen de reprodutores caprinos.

**Palavras-chave:**  
 Flora microbiana.  
 Estreptomicina.  
 Penicilina.  
 Gentamicina.  
 Sêmen.

**Correspondência para:**  
 ANDREIA FERNANDES DE SOUZA  
 Departamento de Medicina Veterinária  
 Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
 Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n  
 52171-900 - Recife - PE  
 afsfooster@gmail.com

Recebido para publicação: 04/06/2004  
 Aprovado para publicação: 13/02/2006

### Introdução

A saúde reprodutiva dos machos constitui fator decisivo para programas de acasalamento utilizando monta natural ou inseminação artificial. Dessa forma, Coelho<sup>1</sup> recomendou que, além de exame clínico, sejam realizadas análises microbiológicas do sêmen, para que medidas preventivas sejam adotadas com o objetivo de melhorar o índice de fertilidade do rebanho, em virtude da ocorrência de grande variedade de germes saprófitas e patogênicos no sêmen de reprodutores bovinos, sem sinais clínicos de afecções genitais.

Estudo da flora do sêmen e prepúcio de bovinos e búfalos, aparentemente saudáveis, constatou a presença de algumas bactérias, como *Bacillus sp*, *Staphylococcus spp*, *Corynebacterium sp* e *Streptococcus sp*<sup>1,2,3,4</sup>,

corroborando a citação de Derivaux<sup>5</sup>, que microrganismos não específicos podem contaminar o sêmen dos animais domésticos, entre eles *Streptococcus sp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus sp*.

No entanto, poucos trabalhos relatam a flora microbiana encontrada no sêmen dos reprodutores, fato citado por Thibier e Guerin<sup>6</sup>, ao evidenciarem escassez de literatura relacionada ao tipo de microrganismos encontrados no sêmen de diferentes espécies. O sêmen pode ser contaminado no momento da colheita e, em bovinos, a vagina artificial é o método que proporciona maior contaminação, quando comparado ao de massagem das vesículas seminais<sup>7</sup>. Em suínos, utiliza-se higienização das instalações e região prepucial durante as fases de pré-colheita e colheita do ejaculado,

\* Dissertação de Mestrado defendida pelo primeiro autor no PPGCV-UFRPE, com apoio da CAPES.

visando reduzir a contaminação bacteriana do mesmo<sup>8</sup>.

Por outro lado, não somente o método<sup>9</sup>, mas os equipamentos utilizados na colheita, os funcionários que manejam os animais<sup>10,11,12</sup>, e o processo de manipulação do sêmen até o envasamento<sup>1</sup>, são responsáveis pela contaminação das amostras durante o processo de refrigeração e congelamento.

Esses relatos justificam a prática utilizada em algumas centrais de inseminação artificial (IA) no Brasil, de realizar lavagem intraprepucial com solução antisséptica, constituindo medida eficiente para reduzir a contaminação bacteriana prepucial<sup>13,14</sup> e a flora microbiana do sêmen<sup>15</sup>.

Há muitos anos, no procedimento de criopreservação do sêmen bovino adiciona-se penicilina e estreptomicina aos diluentes, determinando sensível redução na contagem de microrganismos. Rodrigues<sup>13</sup> evidenciou que *Staphylococcus spp*, *Streptococcus sp*, *Enterococcus sp* e *Bacillus spp* são sensíveis à associação de penicilina G potássica (1.000.000 UI/mL) e estreptomicina (1mg/mL). Esse relato diverge de Spinosa, Górnaiak e Bernardi<sup>16</sup>, ao constatarem que a penicilina não é eficaz contra *Staphylococcus*, e de Coelho<sup>1</sup>, ao ressaltar que *Corynebacterium pyogenes* e *Streptococcus spp*, encontrados na flora do sêmen de bovinos de algumas centrais de IA são sensíveis a esses antibióticos, enquanto *Staphylococcus spp*, *Proteus sp*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras apresentam resistência a esses agentes antimicrobianos.

Estudos realizados por Bamba et al.<sup>17</sup> e Bamba e Sone<sup>18</sup>, com sêmen de javali, mostraram que a penicilina, apesar de controlar o crescimento bacteriano com menos eficácia, auxilia na manutenção da sobrevivência espermática durante o armazenamento a 15°C. Corroborando com isso, Sone<sup>19</sup> relatou que o controle de diversas espécies de *Pseudomonas* é praticamente ineficaz frente à ação de penicilina e estreptomicina.

Devido a essa controvérsia, outros

antibióticos como cefalosporina têm sido introduzidos na composição dos diluentes de sêmen<sup>20</sup>. Todavia, alguns autores consideraram de fundamental importância a determinação da flora microbiana do sêmen e prepúcio<sup>21</sup>, assim como a avaliação da resistência microbiana do sêmen frente aos agentes antimicrobianos de escolha<sup>19</sup>.

No entanto, apesar de várias décadas de utilização de antibióticos no meio diluidor do sêmen dos animais domésticos, poucas pesquisas têm sido realizadas com sêmen de reprodutores caprinos, assim como a sensibilidade desses microrganismos frente a drogas anti-bacterianas comumente utilizadas. Por conseguinte, esse trabalho teve como objetivo avaliar a flora microbiana encontrada no sêmen fresco e no sêmen congelado de reprodutores caprinos, criados na zona da Mata do Estado de Pernambuco, assim como a eficácia da gentamicina, e da associação penicilina + estreptomicina na viabilidade de doses congeladas de sêmen desses reprodutores.

## Materiais e Métodos

Foram utilizados 25 reprodutores caprinos das raças Boer (4), Alpina Americana (1), Alpina (4), Anglo-Nubiana (4), Toggemburg (4), Savana (1), Saanen (2) e Muciana (5), oriundos de oito propriedades localizadas na zona da Mata do Estado de Pernambuco e utilizados como reprodutores através de monta controlada, os quais encontravam-se em bom estado nutricional, sexualmente maduros, com idade de 2 a 5 ano e criados em sistema intensivo, sendo fornecida suplementação alimentar, além de água e sal mineral, *ad libitum*.

Os animais foram submetidos a duas colheitas de sêmen com vagina artificial, utilizando uma fêmea em estro, após limpeza da região prepucial com água, sabão e solução antisséptica (Nordiodine)<sup>1</sup>, e secagem com papel toalha. Antes de cada colheita, o mesmo procedimento de lavagem (15 minutos) e secagem usado para limpeza da região prepucial dos reprodutores foi

1 Nordiodine dergermante, Cinor Sul – Química Farmacêutica

realizado na mucosa e no cone da vagina artificial.

Após a colheita, as amostras de sêmen foram submetidas a análise das características macroscópicas (cor, aspecto, volume) e, a seguir, colocadas em banho-maria a 37 °C durante o tempo necessário para avaliação microscópica (MIP, vigor, concentração e morfologia espermática). MIP e vigor espermático foram avaliados de forma subjetiva, através da observação em microscópio de luz<sup>2</sup>, e o resultado foi expresso, respectivamente, em porcentagem e em escala de 0 a 5. Em seguida, foram avaliadas a concentração, em Câmara de Neubauer, e a morfologia espermática, pelo método de Câmara Úmida<sup>22</sup>.

Imediatamente após as colheitas, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada ejaculado, colocadas em tubos de ensaio estéreis e, em seguida, transportadas em caixa térmica ao laboratório, para análise microbiológica. As amostras foram inicialmente diluídas em solução salina a 0,9%, na proporção de 1/10, 1/100 e 1/1000 (sêmen:solução salina estéril) e cultivadas em ágar sangue de ovino a 5% e ágar Levine, e incubadas em aerobiose a 37 °C. As placas cultivadas foram submetidas à análise após 24, 48 e 72 horas de incubação. Realizou-se também a cultura do sêmen nas mesmas diluições em microaerofilia, a 37 °C, durante 120 horas. Após anotações das características morfotintoriais das colônias e coloração utilizando-se a técnica de Gram, as bactérias classificadas como Gram negativas foram submetidas a provas bioquímicas, para sua posterior identificação.

Foram realizados antibiogramas das amostras bacterianas em agar Miller-Hinton, visando testar a sensibilidade *in vitro* frente a penicilina (10 mg), estreptomicina (10 mg) e gentamicina (10 mg). A leitura foi realizada 24 horas após a incubação das placas a 37 °C, procedendo-se a medição dos halos de inibição de crescimento.

Após avaliação microbiológica foram realizadas novas colheitas de sêmen com a finalidade de proceder à congelação, visando

testar a sensibilidade dos microrganismos frente aos antibióticos para os quais as bactérias se mostraram sensíveis na análise *in vitro*. Para diluição do sêmen, as amostras foram submetidas a duas lavagens em solução de Tris<sup>3</sup>, na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem) e centrifugadas a 600g durante dez minutos. Após a segunda lavagem foi acrescentado ao sedimento diluente à base de leite em pó desnatado, cujo volume foi dividido em duas partes iguais, sendo a primeira metade sem o crioprotetor acrescentada à temperatura ambiente. A seguir, à segunda metade do diluidor foi acrescentado glicerol (14,0%) e, procedeu-se à divisão em três alíquotas, as quais foram acrescentados os antibióticos, de acordo com os grupos experimentais: A1 = penicilina + estreptomicina<sup>4</sup> (2g de sulfato de estreptomicina, 3.750.000UI de penicilina G procaína e 1.250.000 UI de penicilina G potássica); A2 = gentamicina<sup>5</sup> (13,3 mg/mL); A3 = sem adição de antibiótico (Grupo Controle).

O sêmen pré-diluído foi igualmente dividido em três amostras e a cada uma foi adicionada a solução diluidora. Em seguida, as mesmas foram levadas ao refrigerador (4 °C) durante duas horas. Após esse período, cada parcela do diluente contendo o crioprotetor glicerol (14%) + antibiótico, de acordo com o grupo experimental (A1, A2 e A3), foi dividida em três alíquotas e adicionadas, a intervalos de dez minutos, às amostras de sêmen diluídas e refrigeradas.

Após o envase do sêmen em palhetas (0,25 mL), as doses (200x 10<sup>6</sup> espermatozoides) foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (10 minutos) e armazenadas no botijão criobiológico (-196 °C). Para o procedimento de congelação, somente foram utilizadas amostras que apresentaram, no mínimo, MIP de 60% e vigor 3,0, após adição do crioprotetor. Quinze dias após a congelação as doses foram descongeladas (37 °C, 40 segundos), avaliadas (MIP e vigor) e, em seguida, realizados exames microbiológicos.

Para a análise dos dados utilizou-se

2 Zeiss - Germany

3 Sigma, Germany.

4 Agrovit, CIBA Geigy Química S/A

5 Gentocin, Schering-Plough Coopers

técnicas de estatística descritiva e de estatística inferencial. As técnicas de estatística descritiva envolveram a obtenção de distribuições absolutas e percentuais e medidas estatísticas (mínimo, máximo, média, desvio-padrão e coeficiente de variação) para as variáveis numéricas. As técnicas de estatística inferencial envolveram a utilização dos testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas; o teste F, através do modelo de blocos completos aleatorizados, e o teste t-Student pareado<sup>23</sup>. O nível de significância considerado nas decisões estatísticas foi de 5,0 % e utilizouse o “software” SAS (Statistical Analysis System) na versão 8.

## Resultados e Discussão

O exames andrológicos dos reprodutores não evidenciou alteração nos testículos ou em qualquer estrutura genital. À análise macroscópica das amostras de sêmen, observou-se aspecto leitoso espesso, cor branco marmóreo e volume médio de 1,47 mL. Na avaliação microscópica, evidenciouse média de  $87,92 \pm 7,76\%$  de MIP e 4,96

$\pm 0,20$  de vigor espermático, demonstrando pequena variabilidade para idade (C.V. = 41,15%), MIP (CV = 8,83) e vigor (CV = 4,03). Estes dados corroboram os descritos por Silva<sup>24</sup> e Salgueiro e Nunes<sup>25</sup>, em caprinos da raça Anglo-nubiana, e Cezar et al.<sup>26</sup>, em SRD, ao observarem no sêmen fresco, 84,99 %, 84,13 % e 88,70 % de MIP, e 4,34, 3,88 e 4,70 de vigor, respectivamente.

Em relação à concentração e morfologia espermática, constatou-se, em média,  $4,75 \times 10^9$  espermatozoides/ejaculado e 85,1% de células normais, destacado-se entre as patologias cabeça piriforme (7,3%) e gota citoplasmática distal (2,4 %). No entanto, ao serem agrupadas, observou-se que 4,9 % das células apresentavam defeitos menores e 10,0 % defeitos maiores, classificando os animais aptos à reprodução<sup>27,22</sup>.

O exame microbiológico realizado no sêmen fresco constatou a presença de 10 diferentes espécies de bactérias e um tipo de levedura, das quais 72,0 e 64,0% das amostras apresentaram *Staphylococcus spp* e *Bacillus sp*, respectivamente. Todavia, também foram encontrados *Klebsiela pneumoniae* (8,0%), *Candida sp* (12,0%), *Pseudomonas sp* (12,0%),

Tabela 1 – Sensibilidade dos microrganismos isolados no sêmen de reprodutores caprinos criados na zona da Mata do Estado de Pernambuco, a antimicrobianos. Recife (2003)

Bactérias	Grupos Experimentais					
	Penicilina/ Estreptomicina		Gentamicina		Controle	
	N	%	N	%	N	%
<i>Staphylococcus spp</i>	7/18	38,9	12/18	66,7	16/18	88,9
<i>Streptococcus sp</i>	5/8	62,5	4/8	50,0	8/8	100,0
<i>Corynebacterium sp</i>	3/6	50,0	2/6	33,3	5/6	83,3
<i>Micrococcus sp</i>	3/8	37,5	5/8	62,5	5/8	62,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	0/4	00,0	1/4	25,0	3/4	75,0
<i>Escherichia coli</i>	0/5	00,0	2/5	40,0	4/5	80,0
<i>Bacillus sp</i>	4/16	25,0	10/16	62,5	11/16	68,8
<i>Cândida sp</i>	1/3	33,3	3/3	100,0	3/3	100,0
<i>Shigella sonnei</i>	4/7	57,1	4/7	57,1	7/7	100,0
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	0/2	00,0	0/2	00,0	2/2	100,0

N = amostras sensíveis / total de amostras testadas

*Enterobacter cloacae* (16,0%), *Escherichia coli* (20,0%), *Corynebacterium sp* (24,0%), *Shigella sonnei* (28,0%), *Streptococcus sp* (32,0%) e *Micrococcus sp* (32,0%), semelhante aos os relatos de outras espécies animais<sup>1,2,3,4</sup>.

Analisando-se a presença de bactérias nas diferentes diluições (1/10, 1/100 e 1/1000) constatou-se que houve decréscimo no número de bactérias e de leveduras encontradas nas amostras quando se aumentou a diluição, com exceção para *Enterobacter cloacae* e *Candida sp*. Observou-se ainda que a frequência de bactérias foi menor ou igual nas concentrações mais diluídas. Em cálculos auxiliares, determinou-se a presença de 45 bactérias na concentração de 1/10, 38 na concentração de 1/100 e 24 na concentração de 1/1000. Esses achados discordam dos obtidos por Coelho<sup>1</sup> em taurinos, que relatou maior frequência nas concentrações mais diluídas, principalmente, se tratando de *Staphylococcus spp*.

O resultado das avaliações da sensibilidade aos três antibióticos, para cada uma das bactérias encontradas nas amostras positivas, encontra-se na tabela 1. Nesta se constata que o percentual de microrganismos resistentes oscilou de 22,2 %, para as nove amostras testadas com *Candida sp*, até 66,7 % para as 12 amostras de *Enterobacter cloacae*

e as nove amostras de *Shigella sonnei*.

Com exceção de *Streptococcus sp*, *Corynebacterium sp*, *Shigella sonnei* e *Klebsiella pneumoniae*, a frequência de amostras resistentes foi mais elevada quando utilizou-se penicilina + estreptomina, quando comparada ao uso de gentamicina ou no grupo controle. Porém, a frequência de amostras resistentes a gentamicina foi menos elevada, com exceção do *Micrococcus sp* e *Bacillus sp*. Devido ao número reduzido de amostras testadas em algumas bactérias, não se realizou testes comparativos de sensibilidade entre antibióticos.

Após descongelamento, comparou-se estatisticamente a motilidade no sêmen fresco e pós-congelamento. Considerando-se os diferentes tipos de antibióticos utilizados na composição do diluidor, verificou-se que a média de motilidade espermática variou de 45,0%, para as amostras criopreservadas com penicilina/estreptomina, até 47,6% para aquelas com gentamicina, não se observando diferença significativa entre os dois grupos constituídos por três diferentes antibióticos. Todavia, constatou-se diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre a motilidade média desses grupos e aquela observada no sêmen fresco. Em relação ao vigor espermático, foi possível verificar diferença elevada entre a média encontrada

Tabela 2 – Microrganismos isolados em amostras de sêmen, pós-descongelamento, de reprodutores caprinos criados na Zona da Mata do Estado de Pernambuco. Recife (2003)

Bactérias	Grupos Experimentais					
	Penicilina/ Estreptomina		Gentamicina		Controle	
	N	%	N	%	N	%
<i>Staphylococcus spp</i>	3/25	12,0	0/25	0,0	12/25	48,0
<i>Streptococcus sp</i>	1/25	4,0	0/25	0,0	8/25	32,0
<i>Corynebacterium sp</i>	0/25	0,0	0/25	0,0	9/25	36,0
<i>Micrococcus sp</i>	1/25	4,0	0/25	0,0	6/25	24,0
<i>Bacillus sp</i>	1/25	4,0	0/25	0,0	8/25	32,0
<i>Cândida sp</i>	1/25	4,0	1/25	4,0	0/25	0,0
<i>Shigella sonnei</i>	0/25	0,0	1/25	4,0	3/25	12,0

N = amostras sensíveis/total de amostras testadas

no sêmen fresco em relação ao sêmen descongelado. Entre os grupos constituídos de penicilina/estreptomicina ou gentamicina, as médias variaram de 3,0 a 3,1, não se constatando diferença significativa entre antibióticos. Comparando-se a média do vigor espermático nos grupos criopreservados com aquela encontrada no sêmen fresco, observou-se diferença altamente significativa ( $P < 0,01$ ). As diferenças encontradas no MIP e vigor nas amostras de sêmen fresco e criopreservado são explicadas pelo fato de que os procedimentos de criopreservação causam extensivos danos às células espermáticas, devido a alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação<sup>28</sup>, com a conseqüente redução na velocidade e no percentual de células móveis<sup>29,30</sup>.

Nos exames microbiológicos realizados nas amostras pós-congelação (Tabela 2), destacaram-se as bactérias *Staphylococcus sp* (48,0%), *Corynebacterium* (36,0%), *Streptococcus sp* (32,0%) e *Bacillus sp* (32,0%). Para os dois grupos de antibióticos testados, a maior freqüência de microrganismo isolado foi para

*Staphylococcus spp* (12,0%), discordando dos achados de Rodrigues<sup>15</sup>, ao afirmar que todas as bactérias isoladas no sêmen bovino foram sensíveis à associação de penicilina G potássica (1.000.000UI/mL) + estreptomicina (1mg/mL).

Dessa forma, ressalta-se que alguns microrganismos encontrados em amostras de sêmen de reprodutores caprinos apresentaram resistência a penicilina e estreptomicina, associação amplamente utilizada nos diluidores de sêmen. O uso de gentamicina é uma alternativa para o controle efetivo desses microrganismos, sendo recomendada a realização de outras pesquisas, utilizando esse agente anti-microbiano em diferentes concentrações, em virtude da possível ação tóxica que esta droga pode determinar nos espermatozoides.

Conclui-se que a gentamicina, na concentração de 13,3 mg/mL, é o antibiótico que apresenta melhor atividade antimicrobiana, sendo recomendada para utilização no processo de congelação de sêmen caprino.

## Microbiological evaluation of buck fresh and frozen semen

### Abstract

The aim of this research was to evaluate the microbial flora in the fresh and frozen semen of goat reproducers, as well as the effectiveness of the antibiotics estreptomycin, penicillin and gentamicin in cryopreservation of semen. It were used 25 males of different breeds, submitted to two semen collect through the artificial vagina method after cleanliness of prepucial region. The first collection of semen aimed the microbiological exam. The second collection had as goal accomplish freezing, after dilution in skimmed milk, with penicillin + estreptomycin (A1), gentamicin (A2) or control (A3). After microscopic evaluation, it was evidenced average of  $87.92 \pm 7.76\%$  of MIP and  $4.96 \pm 0.20$  of spermatic vigor in fresh semen. Regarding bacterin evaluation, it was verified, mostly, bacteria of the gender *Staphylococcus spp* and *Bacillus sp*. After semen cryopreservation, it was observed that there wasn't difference ( $P > 0.05$ ) among groups in MIP and spermatic vigor. However, in the microbiological evaluation of frozen-thawed semen, bacteria of *Staphylococcus spp* gender was present in great part of samples. Gentamicin (13.3mg/mL) promoted larger inhibition of the bacterial growth in the semen post-freezing, concluding that gentamicin can be the antibiotic used for freezing of goat semen.

### Key-words:

Microbial Flora.  
Estreptomycin.  
Penicillin.  
Gentamicin.  
Semen.

## Referências

- 1 COELHO, N. M. **Flora bacteriana do prepúcio e sêmen de reprodutores Bos Taurus**. 1976. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1976.
- 2 FLATSCHER, J.; HOLZMANN, A. Genital diseases in bulls: importance of artificial insemination- control measures. In: CONFERENCE OF THE OFFICE INTERNATIONAL DESEPIZOOTIES, REGIONAL COMMISSION FOR EUROPE, 10, 1984. Viene, **Anais**. Viene, 1994, p. 893- 402.
- 3 RAGHAVAN, R.; NILAKANTAN, P. R.; UPPAL, P. K. Studies on the bacteriology of bovine genital tract. **Indian Veterinary Journal**, v. 48, n. 8, p. 779-783, 1971.
- 4 RODRIGUES, A. L. R.; BICUDO, S. D.; LOPES, C.A.M. Sensibilidade de bactérias do sêmen de touros Nelore (*Bos indicus*) em central de inseminação artificial frente a antibióticos utilizados em meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 267- 268, 1999.
- 5 DERIVAUX, J. **Fisiopatología de la reproducción y inseminación artificial de los animales domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1967. 416 p.
- 6 THIBIER, M.; GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 233-251, 2000.
- 7 SOREL, M. P. Contribution à l'étude de la bactériologie du sperme frais de taureau. **Bulletin de la Academie Veterinaire de France**, v. 34, n. 7, p. 295-300, 1961.
- 8 DIAS, C. P. et al. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 32 – 40, 2000.
- 9 GUNSALUS, I. C.; SALISBURY, G. W.; WILLETT, E. L. The bacteriology of bull semen. **Journal of Dairy Science**, v. 24, n. 11, p. 911-919, 1941.
- 10 KENDRICK, J. W. et al. Microbiological contamination of bovine semen. **Theriogenology**, v. 4, p. 125 –129, 1975.
- 11 MARIONOV, P.; BOHNELL, H. Hygienic conditions of material for freezing bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 57, p. 701-711, 1974.
- 12 RIEK, P. M.; PICKETT, B. W.; CREIGHTON, K. A. Sources of bacterial contamination in frozen bovine semen: a survey. In: TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION OF ANIMAL BREEDERS, 15, 1980. USA, 1980. **Proceedings...** USA, p. 40-44.
- 13 RODRIGUES, A. L. R. **Avaliação das floras aeróbia e anaeróbia facultativa prepuccial e seminal de touros Bos indicus submetidos a higienização intraprepuccial em central de inseminação artificial**. 1998. 86 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 1998.
- 14 SALISBURY, G. W.; VANDERMARK, N. L. **Physiology of the reproduction and artificial insemination of cattle**. San Francisco : Freeman e Company, 1961, 630 p.
- 15 REDDY, B. J. C.; KRISHNAMURTHY, P. S.; VENKATASWAMI, V. Bacterial flora prepuce and the effect of intra-preputial treatment on the bacteriological quality of semen. **Indian Veterinary Journal**, v. 48, n. 7, p. 722-727, 1971.
- 16 SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 454 p.
- 17 BAMBA, K. et al. Two-step insemination apparatus for pigs. **Japanese Journal of Swine Science**, v. 17, p. 19, 1980.
- 18 BAMBA, K.; SONE, M. Factors affecting the quality of boar semen stored by means of dialysis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 193-197, 1981.
- 19 SONE, M. Effects of various antibiotics on the control of bacterial in boar semen. **The Veterinary Record**, v. 111, p. 11-14, 1982.
- 20 SILVA, K. M. G. ; PAPA, F. O. ; GABALDI, S. H. Efeito dos antibióticos gentamicina e do aminoácido taurina em meio de gema ovo (baken) sobre a longevidade e fertilidade do sêmen resfriado de equino. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 81-87, 2004.
- 21 JOHNSTON, S. D. et al. Antibiotics for the preservation of koala (*Phascolarctos cinereus*) semen. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 5, p. 335-338, 1998.
- 22 MIES FILHO, A. **Reprodução Animal**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. v. 2, 750 p.
- 23 DOUGLAS, G. A. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman and Hall, 1991. 611 p.
- 24 SILVA, M. A. V. **Efeito de diferentes diluentes de congelamento e duas temperaturas de descongelamento sobre a integridade acrossômica, vigor e motilidade espermática do sêmen caprino**. 1993. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1993.
- 25 SALGUEIRO, C. C. M. de; NUNES, J. F. Estudo de características testiculares e espermáticas de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 231-232, 1999.
- 26 CEZAR, K. L. R. et al. Influência da configuração escrotal sobre a eficiência reprodutiva de caprinos nativos criados no sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 5, p. 115-117, 2002.

27 CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2 ed, Belo Horizonte,1998. 49 p.

28 ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v. 23, p. 77-90, 1989.

29 ISACHENKO, E. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human Reproduction**, v. 19, n. 4, p. 932-939, 2004.

30 WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

31 JERROLD, H. Z. **Biostatistical analysis**. 4. ed, New Jersey: Prentice Hall, 1999. 929 p.