



**CARLA ENARA DOS SANTOS PASIN**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA CENTRAL  
BELA VISTA PECUÁRIA EM BOTUCATU - SP**

**LAVRAS-MG**

**2019**

**CARLA ENARA DOS SANTOS PASIN**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA CENTRAL BELA VISTA  
PECUÁRIA EM BOTUCATU - SP**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Prof. Dr. José Rafael Miranda

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2019**

**CARLA ENARA DOS SANTOS PASIN**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA CENTRAL BELA VISTA  
PECUÁRIA EM BOTUCATU - SP**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

APROVADO em 28 de junho de 2019.

Dra. Ticiania Meireles Sousa

Me. Luiz Manoel Souza Simões

Prof. Dr. José Rafael Miranda  
Orientador

**LAVRAS-MG**

**2019**

*Dedico este trabalho aos que estiveram comigo durante  
esta longa jornada, e sem os quais sei que não  
conseguiria.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, por me permitir traçar esta jornada rumo aos meus sonhos e por guiar meu caminho sempre no sentido do que me está destinado.

Agradeço aos meus pais e padrinhos, por aceitarem minhas escolhas e incentivarem de forma incondicional meus estudos, não medindo esforços para que eu pudesse estar onde estive. Sou grata também por, apesar da distância, se alegrarem com a minha felicidade durante os bons momentos e me apoiarem nos momentos difíceis, tenho muito orgulho por ter sido abençoada em ter vocês como minha família.

Aos docentes que fizeram parte da minha graduação, muito obrigada por transmitirem seu conhecimento e, muitas vezes, seu amor pela profissão. Vocês contribuíram enormemente para que eu me tornasse a profissional que sou hoje.

Gostaria de agradecer em especial ao meu orientador Dr. José Rafael Miranda, e ao meu coorientador Dr. José Nélio Sousa Sales, por terem me recebido de braços abertos em um momento onde haviam muitas dúvidas e inseguranças, e por terem me auxiliado a encontrar oportunidades que fizeram a diferença em minha vida.

Agradeço, de certa forma, às dificuldades vividas durante todo meu processo de formação, afinal de contas graças a elas pude provar para mim mesma que sou capaz de grandes conquistas.

Sou grata aos amigos que fiz durante os anos de graduação, sem dúvidas levarei lembranças dos ótimos momentos vividos e terei comigo os conselhos que me fizeram uma pessoa melhor, mais forte e mais feliz também.

À Universidade Federal de Lavras, obrigada pela estrutura a qual tive o privilégio de usufruir.

Muito obrigada a todos que contribuíram para a realização do sonho de me tornar Médica Veterinária.

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado de forma a cumprir as exigências da disciplina PRG 107- Estágio Supervisionado, obrigatória para obtenção do título de bacharel no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. O estágio foi realizado durante 8 horas diárias, por um período de 60 dias, totalizando 480 horas de atividades práticas. Este foi iniciado no dia 04 de Fevereiro de 2019 e se encerrou no dia 30 de Abril de 2019. O local escolhido foi a empresa Central Bela Vista Pecuária, central de coleta e processamento de sêmen bovino e bubalino, localizada em Botucatu, estado de São Paulo. Durante esse período, foi possível acompanhar, sob supervisão do Médico Veterinário Rafael Rocha de Paula, a rotina de coleta de sêmen de diversos reprodutores, a realização de exames periódicos, avaliações clínicas e reprodutivas dos animais, o processo de análise, resfriamento e congelamento das doses de sêmen a serem comercializadas posteriormente, além do manejo diário dos animais na propriedade. Além disso, foi possível aperfeiçoar habilidades profissionais e pessoais que são relevantes para área. Este trabalho engloba uma descrição do local, das atividades desenvolvidas e da distribuição das diferentes raças encontradas na fazenda no planejamento de coleta. Ao longo do período de estágio haviam cerca de 313 animais na fazenda, distribuídos entre a quarentena, coleta e hotel. Estes dados foram tabulados e descritos de forma a entender melhor a distribuição dos reprodutores e suas raças durante a programação de trabalho na propriedade.

**Palavras-chave:** Estágio supervisionado. Reprodução. Sêmen. Bovinos. UFLA.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Vista panorâmica da nova sede da Central Bela Vista, inaugurada em 2017, no município de Botucatu – SP..... 14
- Figura 2 — Tronco de contenção para manejo sanitário utilizado na área de quarentena da Central Bela Vista, Botucatu – SP..... 16
- Figura 3 — Localização do galpão de coleta em relação aos piquetes na Central Bela Vista. 17
- Figura 4 — Área externa de coleta com piso de areia para amortecimento de impactos, utilizada na Central Bela Vista..... 17
- Figura 5 — Sala de preparo de material de coleta, da Central Bela Vista, onde se observa as vaginas artificiais já preparadas..... 18
- Figura 6 — Estufa de armazenamento das vaginas artificiais prontas para uso, localizada na área de coleta de sêmen, na Central Bela Vista..... 19
- Figura 7 — Sistema pneumático subterrâneo: local de envio do sêmen na área de coleta (a), local de recebimento do sêmen no laboratório (b)..... 19
- Figura 8 — Tronco tombador utilizado para casqueamento preventivo e realização de procedimentos cirúrgicos de casco nos animais da Central Bela Vista..... 20
- Figura 9 — Membro acometido por hiperplasia interdigital (seta), antes da realização do procedimento cirúrgico de remoção, na Central Bela Vista..... 21
- Figura 10 — Membro acometido por hiperplasia interdigital durante o procedimento de remoção cirúrgica realizado na Central Bela Vista..... 21
- Figura 11 — Curativo realizado em membro acometido por hiperplasia interdigital após a realização do procedimento cirúrgico de remoção, na Central Bela Vista..... 22
- Figura 12 — Bancada onde acontece o processamento inicial do sêmen, sendo pesado e tendo sua concentração aferida..... 24
- Figura 13 — Sistema *PROTHEUS*, *software* desenvolvido pelo Grupo CRV para controle interno de informações sobre os animais, o sêmen e a comercialização de doses.24
- Figura 14 — Segunda instância de processamento seminal onde é feita a contagem de motilidade e vigor, além de patologias espermáticas e diluição do sêmen..... 25
- Figura 15 — Máquina utilizada para rotulagem de palhetas a partir do número estimado de doses que a partida diluída de sêmen poderá envasar..... 25
- Figura 16 — Equipamento utilizado para o congelamento de doses de sêmen, com curva de resfriamento controlada através do computador..... 26
- Figura 17 — Área do hotel de touros, local onde os animais que concluíram seus contratos aguardam pela renovação para que possam voltar à coleta, na Central Bela Vista. 27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Número de animais na Central Bela Vista, distribuídos em diferentes atividades, durante o mês de fevereiro de 2019.....	35
Tabela 2 — Número de animais em coleta distribuídos durante a semana, na Central Bela Vista no mês de fevereiro de 2019.....	35
Tabela 3 — Distribuição percentual das raças em coleta durante os dias da semana, na Central Bela Vista, no mês de fevereiro de 2019.....	35
Tabela 4 — Número de animais na Central Bela Vista, distribuídos em diferentes atividades, durante o mês de março de 2019.....	36
Tabela 5 — Número de animais em coleta distribuídos durante a semana, na Central Bela Vista no mês de março de 2019.....	36
Tabela 6 — Distribuição percentual das raças em coleta durante os dias da semana, na Central Bela Vista no mês de março de 2019.....	36
Tabela 7 — Número de animais na Central Bela Vista, distribuídos em diferentes atividades, durante o mês de abril de 2019.....	37
Tabela 8 — Número de animais em coleta distribuídos durante a semana, na Central Bela Vista no mês de abril de 2019.....	37
Tabela 9 — Distribuição percentual das raças em coleta durante os dias da semana, na Central Bela Vista no mês de abril de 2019.....	38

## LISTA DE SIGLAS

BVD	Diarreia Viral Bovina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
EITB	<i>Enzymelinked Immunoelctrotransfer Blot</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial Hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
UFLA	Universidade Federal de Lavras

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Célsius
-	Menos
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>DESCRIÇÃO DA ESTRUTURA E ATIVIDADES DA EMPRESA....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Quarentena.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Coleta.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3</b>	<b>Laboratório de processamento de sêmen.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Hotel de touros.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Criopreservação do sêmen e suas consequências.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Diluentes para congelamento de sêmen bovino.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Crioprotetores.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Crioprotetores penetrantes.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Crioprotetores não penetrantes.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Outros aditivos.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Antioxidantes.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Inibidores de capacitação espermática prematura.....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1</b>	<b>Fevereiro.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2</b>	<b>Março.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3</b>	<b>Abril.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

Para obtenção do título de bacharel no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras é necessário cursar a disciplina obrigatória PRG107, na qual o aluno deve se matricular no décimo período do curso. Constituída por 28 créditos, caracterizando uma carga horária total de 476 horas, é necessário cumprir 408 horas de atividades práticas, as quais configuram o estágio supervisionado obrigatório, e 67 horas destinadas à realização de atividades teóricas.

O estágio supervisionado foi realizado na empresa Central Bela Vista Pecuária, central de coleta e processamento de sêmen bovino e bubalino, localizada na Rodovia Gastão Dal Farra, na cidade de Botucatu, estado de São Paulo. Sob orientação do professor Dr. José Rafael Miranda e supervisão do Médico Veterinário Rafael Rocha de Paula, as atividades se iniciaram no dia 04 de Fevereiro de 2019 e se encerraram no dia 30 de Abril de 2019, totalizando 480 horas. Foram cumpridas 8 horas diárias de estágio, no período da manhã de 07:00 às 12:00 horas e no período da tarde de 14:00 às 17:00 horas.

O local foi escolhido devido ao interesse na área de Reprodução de Grandes Animais e também devido à excelente reputação da empresa, tida como referência em qualidade, bem-estar animal e sustentabilidade. Durante o período de estágio foi possível acompanhar a rotina clínica dos animais, realização de exames rotineiros, coleta de sêmen propriamente dita e o processamento do mesmo no laboratório, até o momento da comercialização das doses congeladas. A realização das atividades práticas foi uma excelente oportunidade para exercer o conhecimento obtido durante a graduação, além de vivenciar a rotina da profissão, agregando novos conteúdos importantes na formação profissional.

## **2 OBJETIVOS**

A realização do estágio supervisionado teve como objetivo proporcionar o convívio com a rotina da profissão, permitindo vivenciar a realidade do mercado de trabalho.

### **2.1 Objetivos específicos**

- i. Conhecer a rotina da empresa, o manejo dos animais, sendo capaz de auxiliar nas etapas de execução das tarefas básicas.

- ii. Acompanhar a avaliação clínica e reprodutiva dos reprodutores, desenvolvendo raciocínio clínico para sugerir e executar tratamentos eventualmente necessários.
- iii. Desenvolver a destreza para coleta de amostras de sangue e lavados prepuciais para a realização de exames.
- iv. Treinamento para avaliação comparativa entre os ejaculados de diferentes animais para processamento posterior do sêmen.

### **3 DESCRIÇÃO DA ESTRUTURA E ATIVIDADES DA EMPRESA**

A empresa Central Bela Vista Pecuária está localizada na Rodovia Gastão Dal Farra, na cidade de Botucatu, estado de São Paulo. Seu horário de funcionamento é de segunda-feira à sexta-feira das 07:00 às 17:00 horas. Adquirida pelo Grupo CRV em 2011, anunciou em 2012 a compra de uma nova propriedade para a construção de novas instalações (FIGURA 1). Inaugurada em 2017, contribuiu para que a empresa se tornasse a maior central de coleta e processamento de sêmen da América Latina. Composta por 130 hectares e altitude de cerca de 1.000 metros, é beneficiada pelo clima e pelo isolamento sanitário, uma vez que as propriedades vizinhas são todas de produção agrícola. Possui como diferencial a sustentabilidade, visto que grande parte da alimentação dos animais é proveniente da propriedade, além de possuir tanques de contenção de resíduos e águas pluviais e uma extensa área de reflorestamento. Está atualmente habilitada a realizar exportação para os diversos países que possuem protocolo sanitário com o Brasil, prezando pela realização dos exames sanitários em laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura. A empresa conta com um corpo de 34 funcionários, sendo destes, dois médicos veterinários, Rafael Rocha de Paula, responsável pela análise e diluição do sêmen para congelamento, e Dr. Paulo Fantinato Neto, responsável pela clínica dos animais presentes na fazenda. Além dos auxiliares de laboratório, coletadores, tratoristas, funcionários do administrativo e pessoal da segurança e limpeza.

Figura 1 – Vista panorâmica da nova sede da Central Bela Vista, inaugurada em 2017, no município de Botucatu – SP.



Fonte: Central Bela Vista (2017)

### 3.1 Quarentena

De maneira a cumprir as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para obtenção do registro de central de coleta e processamento de sêmen, a Central Bela Vista possui uma área de quarentena bem equipada e isolada das demais instalações e abrigos de animais. Tem capacidade para abrigar até 100 reprodutores durante o período de isolamento sanitário exigido para que estes possam partir para a fase de coleta de sêmen. A área é isolada por cordoalhas altas e grandes portões de ferro limitando o acesso ao pessoal autorizado. Há uma estrutura de curral anti-estresse que leva os animais até o tronco de contenção onde são realizados os procedimentos necessários. Esta estrutura conta ainda com uma sala com armário de medicamentos, que contém também materiais como luvas, seringas e agulhas; uma sala com geladeira para armazenamento de vacinas e preparo de medicações, além de um banheiro para os funcionários.

Logo que o novo touro chega à propriedade é direcionado para esta área, onde permanecerá durante um período de 30 dias, realizando a coleta de exames semanais para certificação de sua sanidade. Neste momento são elaboradas solicitações de exames diferentes,

uma para os animais que terão sua produção de sêmen voltada para a comercialização dentro do país, e outra para os animais terão suas amostras seminais exportadas.

Os manejos na quarentena são realizados às quartas-feiras, e exigem a presença de um médico veterinário e dois auxiliares de coleta para direcionar os bovinos de seus piquetes até o tronco de contenção. Após devidamente contidos, se iniciam os procedimentos. Durante a primeira semana de estadia dos animais na propriedade, são coletadas amostras de sangue para identificação de brucelose, diarreia viral bovina (BVD), leptospirose e, no caso dos animais produtores de sêmen para exportação, febre aftosa (EITB). Além disto, sempre na primeira semana é coletada uma amostra de pelo da cauda para exame de DNA. Em sequência são coletados dois frascos de lavado prepucial com solução fisiológica: um para avaliação da presença de *Trichomonas* e outro para *Campylobacter*. Para os touros que terão seu sêmen exportado, as amostras são coletadas de maneira diferente, a pedido do Instituto Biológico, onde esse material será processado. Para que os animais tenham seu sêmen exportado é necessário que os exames de quarentena coletados na central sejam processados por um laboratório que possua um certificado de acreditação no país onde residem os animais, no entanto, como no Brasil ainda não há um laboratório com este documento, a indicação do MAPA é que os exames sejam avaliados pelo Instituto Biológico. Desta forma, primeiramente deve ser coletado um *swab* prepucial, que é inoculado em meio de transporte específico para *Campylobacter* e em sequência somente uma amostra de lavado com solução fisiológica, que será inoculado em frasco contendo meio de transporte próprio para *Trichomonas*, sendo possível encaminhar as amostras para o laboratório sem que se perca a qualidade das mesmas durante o tempo de viagem. Após coletados os materiais biológicos, os animais são vacinados contra raiva e clostridioses, vermifugados de acordo com seu peso e banhados com carrapaticida. Os indivíduos neste primeiro momento passam pelo tronco de contenção para manejo sanitário (FIGURA 2) para realização do teste de tuberculina, o qual terá sua leitura feita após 21 dias, avaliando a reação no local da aplicação.

Durante a segunda e terceira semanas do animal na quarentena são coletados somente os lavados e/ou *swabs* seguindo o mesmo critério descrito anteriormente sobre exportação ou não. Já na quarta semana repetem-se todos os procedimentos, exceto inoculação de tuberculinas, coletas de sangue e DNA.

Figura 2 – Tronco de contenção para manejo sanitário utilizado na área de quarentena da Central Bela Vista, Botucatu – SP.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

### 3.2 Coleta

Após concluído o período de quarentena e obtenção do certificado de sanidade pelo animal, o mesmo é encaminhado para a área de coleta. Esta é composta por um galpão central (FIGURA 3), munido de pequenas cercas de ferro que possibilitam amarrar os touros, áreas de isolamento para coleta de animais que não aceitam cabresto, áreas externas com piso de areia para amortecer o impacto dos saltos (FIGURA 4), áreas internas com piso emborrachado com o mesmo objetivo, e um tronco hidráulico que permite a pesagem, contenção dos animais para a realização da higienização pré-coleta, exames clínicos, reprodutivos, e qualquer manejo que necessite do animal contido para segurança própria e dos funcionários. O ambiente conta também com uma sala de preparação dos materiais que serão utilizados (FIGURA 5), no caso as vaginas artificiais, dois banheiros, masculino e feminino, uma sala com armários para os funcionários e armário de medicamentos, e uma copa onde é oferecido o café da manhã diariamente.

O galpão é cercado por aproximadamente 190 piquetes, onde ficam abrigados os animais que estão fazendo parte da programação diária de coleta naquele momento, e que são manejados todos os dias pela manhã até a área onde passarão por toalete no tronco, incluindo o

corte do excesso de pelos do prepúcio, lavagem externa com água corrente sob ligeira pressão e lavado interno com solução de água e CB-30 TA da Ourofino® em baixíssima concentração.

Figura 3 – Localização do galpão de coleta em relação aos piquetes na Central Bela Vista.



Fonte: Central Bela Vista (2017)

Figura 4 – Área externa de coleta com piso de areia para amortecimento de impactos, utilizada na Central Bela Vista.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Os animais são então amarrados até que se inicie a coleta. Os trabalhadores se dividem em duplas, onde um é responsável por segurar a vaca, utilizada como manequim para estimular a libido dos touros, e o outro é encarregado de desviar o pênis do touro do órgão genital da fêmea. Em geral, os animais são estimulados a realizar 4 montas falsas, onde o pênis é desviado,

para aumentar a concentração do ejaculado. Em seguida, o coletador dirige-se até a estufa onde ficam armazenadas as vaginas a aproximadamente 50° C (FIGURA 6). As vaginas consistem em uma estrutura cilíndrica de material plástico, com válvula para água e revestimento de borracha, na qual é acoplado um cone de silicone com um tubo coletor na extremidade menor, onde será depositado o sêmen. Na sala de preparação, as vaginas artificiais são montadas e preenchidas com água em temperatura de 50° C através da válvula, de maneira a mimetizar a mucosa vaginal das vacas. Após isto, elas são colocadas na estufa para que a temperatura seja mantida e o coletador tenha fácil acesso. Ao pegar a vagina, amarra-se uma borracha de pequeno calibre no local onde o tubo é conectado ao cone de silicone, para evitar que o mesmo caia durante a deposição do ejaculado. Após amarrado com firmeza, o conjunto todo é coberto como uma capa própria para que não haja interferência da luz na qualidade seminal, e então coloca-se quantidade suficiente de lubrificante na extremidade na qual o pênis irá penetrar, para evitar que o animal se machuque. Estando pronta a vagina, retorna-se para o animal e o estimula novamente, no entanto, no momento de desvio o pênis, este é inserido no instrumento artificial e desta forma o animal realiza o salto, liberando o ejaculado.

Figura 5 – Sala de preparo de material de coleta, da Central Bela Vista, onde se observa as vaginas artificiais já preparadas.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Logo que coletado o ejaculado, o tubo é removido do cone de borracha, recebe uma tampa e é identificado com uma etiqueta contendo o nome do touro, a raça, o salto ao qual é referente e o nome

do operador que efetuou o procedimento. Neste momento o tubo será enviado diretamente para o laboratório, através de um sistema pneumático subterrâneo (FIGURA 7), que percorrerá uma distância de 500 metros em um tempo máximo de 30 segundos, com uma velocidade média de 16 metros por segundo, levando a capsula contendo o tubo até o local de destino de forma rápida e eficiente, evitando contaminações externas.

Figura 6 – Estufa de armazenamento das vaginas artificiais prontas para uso, localizada na área de coleta de sêmen, na Central Bela Vista.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Figura 7 – Sistema pneumático subterrâneo: local de envio do sêmen na área de coleta (a), local de recebimento do sêmen no laboratório (b).



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Às sextas-feiras a área de coleta é utilizada também como sede para realização de casqueamento preventivo dos animais, com a utilização de um tronco tombador (FIGURA 8), além da remoção cirúrgica de hiperplasia interdigital (gabarro) em animais acometidos (FIGURAS 9 e 10), e troca de curativos (FIGURA 11) de cirurgias realizadas na semana anterior.

Figura 8 – Tronco tombador utilizado para casqueamento preventivo e realização de procedimentos cirúrgicos de casco nos animais da Central Bela Vista.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Figura 9 – Membro acometido por hiperplasia interdigital (seta), antes da realização do procedimento cirúrgico de remoção, na Central Bela Vista.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Figura 10 – Membro acometido por hiperplasia interdigital durante o procedimento de remoção cirúrgica realizado na Central Bela Vista.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Figura 11 – Curativo realizado em membro acometido por hiperplasia interdigital após a realização do procedimento cirúrgico de remoção, na Central Bela Vista.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

### 3.2 Laboratório de processamento de sêmen

O laboratório conta com uma estrutura que se inicia por banheiros para que os funcionários troquem suas roupas por vestimentas limpas e de uso exclusivo no ambiente laboratorial, incluindo jaleco branco e troca de sapatos. Em seguida tem-se a sala principal, onde o sêmen é recebido através do sistema pneumático como já mostrado anteriormente, sala de preparação de meios e sala de esterilização de vidrarias.

Pela manhã, antes que se inicie a coleta dos animais no galpão, lava-se as vidrarias para que estas sequem na estufa, passem por autoclavagem e sequem novamente, quando então serão utilizadas para reservar o sêmen com diluente para resfriamento em câmara fria. Neste momento são higienizadas também as agulhas da máquina de envase do sêmen em palhetas, que são autoclavadas e secas em estufa juntamente com a vidraria, e então são montadas em borrachas que farão a sucção do sêmen contido na vidraria para as palhetas.

A partir do momento que se inicia a coleta e os ejaculados começam a chegar no laboratório, estes passam por duas bancadas diferentes antes de receber o diluente e seguir para

a câmara fria a aproximadamente 3°C. Na primeira bancada (FIGURA 12) encontram-se um banho-maria seco a 37°C para manter a temperatura do sêmen e preservar sua qualidade, um equipamento agitador para homogeneizar o conteúdo antes de ser retirada uma alíquota que passa por duas diluições no aparelho chamado *diluter* de marca HAMILTON®, quando então a segunda diluição tem sua concentração mensurada através do aparelho BECKMAN COULTER® *Z series*, utilizado para aferição de concentração de diferentes tipos de células. Em seguida o tubo com sêmen *in natura* é pesado em balança tarada para o peso do frasco, obtendo-se então o peso do ejaculado apenas, que será utilizado pelo programa *PROTHEUS* (FIGURA 13), *software* desenvolvido pelo departamento de sistema de informação, a pedido do grupo CRV Lagoa, para facilitar o armazenamento de informações e a logística relacionada ao número de doses produzidas por cada animal, número de doses efetivamente congeladas e disponíveis para comercialização, entre outras informações necessárias para a empresa. Este programa está instalado no computador localizado ao final da bancada, e nele são inseridas informações relacionadas ao salto do animal, como horário, quem coletou, se o comportamento do animal foi fácil, além do peso do sêmen e concentração do sêmen, informações que serão utilizadas para estimar o volume do ejaculado e conseqüentemente indicar a quantidade de diluente a ser adicionada para obter-se a concentração de 20 milhões de espermatozoides totais por palheta de sêmen, padrão com o qual a empresa trabalha.

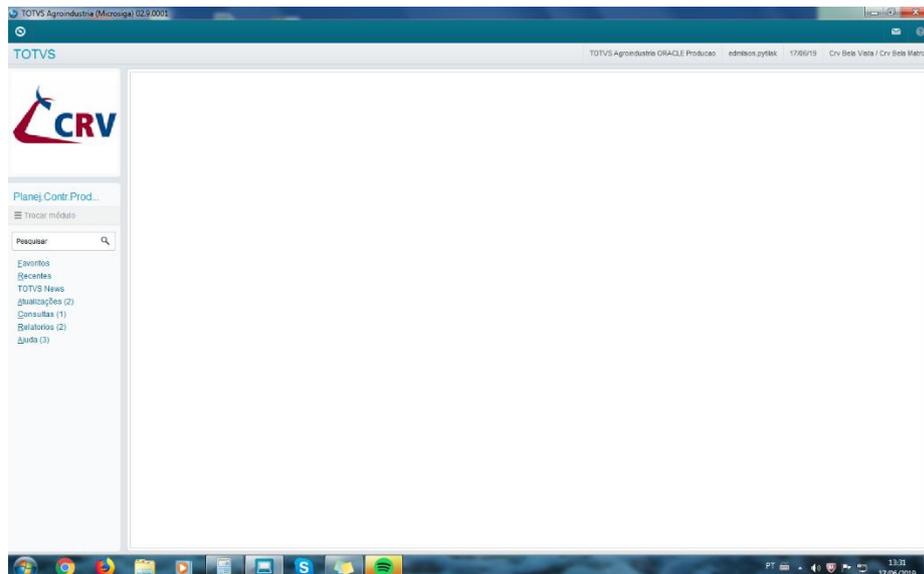
Já na segunda bancada (FIGURA 14) há uma estufa contendo as vidrarias estéreis a 36°C, um banho-maria úmido com a mesma temperatura onde o sêmen e o diluente já preparado são mantidos, placas térmicas para que as lâminas sejam montadas de forma a preservar as características de motilidade e vigor dos espermatozoides, um microscópio onde as lâminas são visualizadas e um computador também com o *software* instalado, onde são inseridas as patologias dos gametas contadas nas lâminas, assim como o vigor e a motilidade, parâmetros determinados de maneira subjetiva através da observação do médico veterinário responsável. A partir destas informações é gerado um número estimado de doses que aquele ejaculado será capaz de envasar após diluído.

Figura 12 – Bancada onde acontece o processamento inicial do sêmen, sendo pesado e tendo sua concentração aferida.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Figura 13 – Sistema *PROTHEUS*, *software* desenvolvido pelo Grupo CRV para controle interno de informações sobre os animais, o sêmen e a comercialização de doses.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Figura 14 – Segunda instância de processamento seminal onde é feita a contagem de motilidade e vigor, além de patologias espermáticas e diluição do sêmen.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

A partir do número estimado de doses inicia-se então o processo de rotulagem das palhetas, feito através da máquina rotuladora (FIGURA 15), contendo todas as informações daquela partida de sêmen. As mesmas são armazenadas em um pote plástico, com o nome do animal e são colocadas na câmara fria para que no momento do envase estejam com a temperatura aproximada à do ejaculado diluído, evitando a ocorrência de choque térmico.

Figura 15 – Máquina utilizada para rotulagem de palhetas a partir do número estimado de doses que a partida diluída de sêmen poderá envasar.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

Após permanecer cerca de 3 horas resfriando lentamente na câmara fria, o sêmen é envasado nas palhetas também resfriadas e passa por congelamento rápido em um equipamento IMV<sup>®</sup> próprio para este fim (FIGURA 16), capaz de congelar aproximadamente 8 mil doses de sêmen ao mesmo tempo. Tendo sido congeladas, as doses são contadas e transferidas para o botijão de lata contendo nitrogênio líquido, tendo uma temperatura interna de -196 °C, o qual será utilizado no transporte dessas doses. No entanto, antes do botijão ser liberado para o banco de sêmen, área administrativa responsável pela verificação da contagem de doses e também pela logística do sêmen, retira-se uma amostra de sêmen de cada animal que esteja no botijão, faz-se o descongelamento rápido, durante 30 segundos a 36 °C no aparelho descongelador, para certificar que todas as palhetas de cada animal tenham, após descongeladas, um mínimo de 55 % de motilidade e vigor 3, para se adequar aos padrões de comercialização da empresa. As doses que se encontram abaixo deste padrão caracterizam-se como reprovadas e a partida toda de sêmen daquele animal é descartada.

Figura 16 – Equipamento utilizado para o congelamento de doses de sêmen, com curva de resfriamento controlada através do computador.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

### 3.4 Hotel de touros

A Central Bela Vista conta com uma estrutura de 140 piquetes (FIGURA 17) destinados à locação dos animais que encerraram a coleta do número de doses de seu contrato e ficam à espera de renovação ou não de contrato. Esta possibilidade tem como objetivo trazer praticidade ao contratante no momento de renovar seu contrato, uma vez que as condições sanitárias da

fazenda são mantidas nas instalações do hotel. Assim, caso o animal retorne para a coleta, não precisa passar novamente pelo período de quarentena.

Figura 17 – Área do hotel de touros, local onde os animais que concluíram seus contratos aguardam pela renovação para que possam voltar à coleta, na Central Bela Vista.



Fonte: Central Bela Vista (2017)

O hotel conta também com seu próprio tronco para manejos sanitários. Desta forma, a vacinação, vermifugação e manejo de eventuais feridas ou quaisquer que sejam as necessidades, podem ser realizadas de forma prática, sem que seja preciso manejar o animal até as demais instalações da propriedade.

#### **4 REFERENCIAL TEÓRICO**

Atualmente, a inseminação artificial é a biotecnologia que tem causado maior impacto nos programas de melhoramento genético de bovinos, resultado da sua eficiente forma de dispersão de genes de animais de alto valor genético no rebanho, através da utilização de sêmen congelado. O uso deste material congelado permite rápido avanço genético dos rebanhos comerciais, pois permite a escolha de reprodutores que melhor atendam às necessidades de produção de cada propriedade, sem ter o custo de manutenção com estes reprodutores dentro da fazenda. No entanto, a eficiência dos processos de utilização deste material depende também de um adequado processo de criopreservação dos espermatozoides e da avaliação de sua viabilidade celular (LEITE et al., 2011; ABUD et al., 2014).

#### 4.1 Criopreservação do sêmen

A utilização do sêmen bovino criopreservado apresenta vantagens em relação às demais formas de processamento. No entanto, é comum oferecer menores taxas de fertilidade quando comparado ao sêmen *in natura*. Isto se deve às mudanças de temperatura que ocorrem durante o processamento, o estresse osmótico e tóxico proporcionado pela adição dos crioprotetores e a formação de cristais de gelo extracelulares (WATSON, 2000; VERBERCKMOES et al., 2005). A efetividade do processamento que atua no bloqueio completo dos processos metabólicos desenvolvidos pelas células espermáticas é um fator crucial para o sucesso da criopreservação. Assim como o equilíbrio entre as células e o meio diluidor, fundamental para a preservação da integridade celular e obtenção do melhor desempenho durante a fertilização após o congelamento (VISHWANATH & SHANNON, 2000; CHAVEIRO et al., 2006).

Os gametas masculinos dos mamíferos são considerados extremamente sensíveis à redução de sua temperatura de aproximadamente 37°C até temperaturas próximas às de congelamento da água, 4° ou 5°C. Os danos causados por este resfriamento drástico, conhecido como choque térmico, são irreversíveis e caracterizados pela perda de viabilidade dos espermatozoides, rápida diminuição da motilidade ou alteração do seu padrão retilíneo para circular ou retrógrado, além da redução das taxas de glicólise, respiração celular e frutólise, havendo também o aumento dos danos ao DNA e a liberação de material intracelular (HOLT, 2000a; WATSON, 2000).

A queda de temperatura favorece a fase de transição dos lipídeos de membrana, onde a fase líquida ou fluida passa então a ser cristalina ou gel, tornando sua organização mais rígida. Caso houvesse a possibilidade de diminuição da temperatura na qual esta fase ocorre, seria possível que as membranas continuassem fluidas em baixas temperaturas e reduziria os danos causados por sua rigidez nos espermatozoides (PURDY et al., 2004).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a presença de proteínas seminais bovinas no plasma seminal. Estas moléculas são responsáveis pela regulação da capacitação espermática através de sua ligação aos fosfolipídios da membrana, estimulando o efluxo de colesterol e lipoproteínas de membrana plasmática. Ao preservar o plasma seminal durante o congelamento, essas proteínas promovem o efluxo de colesterol, o que torna os gametas mais sensíveis a danos durante a criopreservação. É possível minimizar este efeito através da utilização de crioprotetores que contenham lipoproteínas de baixa densidade em sua composição, pois estas são capazes de fazer ligação de forma estável com as proteínas, impedindo sua ação sobre a membrana plasmática. Durante o processo de resfriamento, o

influxo de cálcio da célula também é afetado e traz graves consequências para a célula, podendo acarretar na sua inviabilidade (MANJUNATH et al., 2002).

A adição e remoção do crioprotetor às células espermáticas são passos muito importantes do processo, uma vez que causam estresse às células e tem caráter definitivo no número de células que sobreviverá ao congelamento. Uma forma de amenizar o estresse causado durante esta etapa é a adição e/ou remoção lenta e gradual do crioprotetor (WATSON, 2000; GUTHRIE et al., 2002).

No que se diz respeito à curva de congelamento, esta pode ser lenta ou rápida. Ao atingir temperaturas na faixa de  $-5^{\circ}\text{C}$ , a água intra e extracelular permanece em estado de super resfriamento. No entanto, ao atingir temperaturas entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-10^{\circ}\text{C}$ , inicia-se a formação de cristais de gelo extracelulares, enquanto que a água intracelular se mantém em estado de super resfriamento, acarretando na desidratação celular decorrente do aumento da concentração de solutos no fluido remanescente fora da célula. Já na curva rápida, não há tempo para que ocorra a desidratação celular e as concentrações dos meios intra e extracelular serão as mesmas. É importante lembrar que a desidratação do espermatozoide durante o congelamento lento evita a formação de gelo intracelular, porém, a alta concentração de solutos pode ser prejudicial às células. O estresse osmótico é causado justamente pela formação destes cristais de gelo, que se formam quando uma solução é resfriada abaixo da temperatura de congelamento, e os solutos se dissolvem no líquido remanescente, causando o aumento da força osmótica da solução. Desta forma, a taxa de congelação deve atingir um nível intermediário entre rápida e lenta, para que não haja formação de cristais de gelo intracelular e também não haja exposição prolongada às altas concentrações de soluto (HOLT, 2000b; WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

Preconiza-se que o descongelamento seja realizado de acordo com a taxa de congelamento adotada, para que as células não sofram danos letais. Caso um sêmen que tenha sido congelado lentamente sofra descongelamento rápido, poderá sofrer grande influxo de água e conseqüente rompimento de membrana plasmática. Por outro lado, caso a taxa de congelamento tenha sido rápida e o descongelamento lento, há possibilidade de recristalização do gelo em cristais maiores, causando lesões mecânicas na membrana (HOLT, 2000b).

#### **4.2 Diluentes para criopreservação de sêmen bovino**

Considera-se a composição do diluente fator de extrema importância para a sobrevivência dos gametas durante o processo de criopreservação. A concentração de crioprotetor, sais e inclusão de detergentes são variáveis a serem consideradas na composição

destes meios (CHAVEIRO et al., 2006). A composição básica dos diluentes de congelamento se caracteriza pela presença de: 1) substâncias iônicas e não-iônicas responsáveis por manter a osmolaridade e fazer o tamponamento do meio; 2) uma fonte de lipoproteína de alto peso molecular com intuito de proteger as células contra o choque térmico; 3) glicerol ou dimetilsulfoxido para crioproteção ; 4) outros aditivos tais como antibióticos e antioxidantes (VISHWANATH & SHANNON, 2000).

Para neutralizar os íons nitrogênio produzidos pelos espermatozoides, um dos componentes fundamentais do diluente é um sistema tampão, para manter o pH da solução próximo à neutralidade (6,8 a 7,1). Para diluição de sêmen bovino, os meios de tamponamento mais utilizados são o citrato, que tem ação favorável na solubilidade das frações proteicas da gema de ovo, componente comumente utilizado na diluição de sêmen, e o tris-hidroximetilaminometano (TRIS) (BORGES, 2003).

Os compostos diluentes utilizados com maior frequência são à base de gema de ovo ou leite, sendo fundamental a inativação da lactenina no caso da utilização do leite, uma vez que esta substância bacteriostática possui caráter tóxico para o espermatozoide. A combinação utilizada com maior frequência é a de gema de ovo, TRIS e citrato, pois a utilização de diluentes à base de leite tem como aspecto negativo a dificuldade de visualização do espermatozoide no microscópio, o que torna as avaliações pós-descongelamento muito difíceis (VISHWANATH & SHANNON, 2000; AMIRAT et al., 2004).

É necessário considerar que a utilização de diluentes à base de compostos de origem animal implica em maior dificuldade de padronização dos meios, além da possibilidade de contaminação microbiana iminente. Sendo assim, propôs-se a utilização do extrato de soja como componente substituinte à gema de ovo (THUN, 2002).

### **4.3 Crioprotetores**

Qualquer substância capaz de fornecer temporariamente energia, proteção contra os danos causados pela queda de temperatura, e manutenção do ambiente favorável à sobrevivência da célula, é considerada crioprotetora (PURDY, 2006). A função dos crioprotetores utilizados no congelamento de sêmen é a de evitar a formação de grandes cristais de gelo intracelulares, repor a água necessária para manutenção do volume celular de maneira a reduzir o estresse osmótico, reduzir o ponto de congelamento da água, e interagir com íons e macromoléculas presentes na solução, além de funcionar como tampão para ajustar quaisquer alterações possíveis de pH (MEDEIROS et al., 2002).

Os diluentes de criopreservação podem ser classificados como extracelulares ou intracelulares. Os diluentes extracelulares ou não-penetrantes são compostos por macromoléculas de peso molecular elevado, tais como açúcares complexos, proteínas do leite ou lipoproteínas da gema do ovo. Estas atuam pelo efeito osmótico, prevenindo a formação de cristais de gelo no interior da célula por promoverem a saída de água do interior da mesma. Os diluentes intracelulares ou penetrantes podem ser alcoólicos ou amidas. Dentre os alcoólicos, destaca-se a utilização do glicerol, etilenoglicol e o DMSO, enquanto no grupo das amidas, são utilizadas a acetamida, lactamida, dimetilformamida e dimetilacetamida (NUNES, 2002; OLIVEIRA et al., 2006; FICKEL et al., 2007).

#### **4.3.1 Crioprotetores penetrantes**

Os crioprotetores penetrantes caracterizam-se por penetrar na membrana celular através de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, atuando na desidratação celular através do seu efeito osmótico. Os agentes não penetrantes proporcionam um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas (PURDY, 2006).

O Glicerol, composto orgânico pertencente à função álcool, além de apresentar o efeito osmótico, atua na membrana plasmática ligando-se aos fosfolipídios presentes na cabeça espermática, sendo capaz de diminuir a fluidez da membrana. No momento do congelamento, a solução contendo glicerol possuirá mais água sem congelar do que quando comparada com aquela que não possui o composto, resultando no aumento dos canais de solvente sem congelar e na menor concentração de sais nestes canais (BAUDOT et al., 2002). No entanto, de acordo com Alvarenga et al. (2000), há relatos de efeitos tóxicos do glicerol à célula espermática. Dentre eles destaca-se a desnaturação proteica, alterações nas interações de actina responsáveis pela interferência no deslizamento das fibras densas da cauda do espermatozoide, alterações no glicocálice e nas proteínas de superfície celular acarretando em interferência no processo de reconhecimento dos receptores da zona pelúcida.

O etilenoglicol é um composto químico do grupo dos álcoois, amplamente utilizado como um anticongelante automotivo. De acordo com Souza et al. (2002), o etilenoglicol tem sido utilizado como alternativa devido às suas propriedades crioprotetoras, proporcionando maior proteção do acrossoma e das membranas espermáticas quando comparado ao glicerol. No entanto, em altas concentrações tem efeito deletério na conservação dos gametas, sendo necessário utilizá-lo somente em baixas concentrações (BITTENCOURT et al., 2004).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto químico orgânico de baixa toxicidade (FERNANDES et al., 2002). A principal característica deste composto é interagir ou combinar com ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídios e muitas substâncias sem alterar de forma irreversível sua configuração molecular (STEDMAN, 2003). Sabe-se que o DMSO interage com os fosfolipídios estruturais da membrana espermática, de maneira a manter sua propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo de 0°C, diminuindo assim o ponto de congelamento do fluido intracelular, e conseqüentemente reduzindo a formação de cristais de gelo intracelulares durante o processo de congelamento (THIRUMALA et al., 2006).

De acordo com Melo et al. (2007), vários compostos dentre as amidas se destacam na criopreservação de células. Isto se dá devido ao seu menor peso molecular quando comparadas ao glicerol e etilenoglicol, propondo-se então que possam produzir menores danos osmóticos nas células por este motivo.

#### **4.3.2 Crioprotetores não-penetrantes**

Segundo Celeghini et al. (2008), os crioprotetores extracelulares ou não-penetrantes são aqueles que não conseguem adentrar a célula espermática. Estes atuam no meio extracelular, de modo a aumentar a pressão osmótica, induzindo a desidratação da célula e conseqüentemente diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular.

Também utilizada como crioprotetor, a gema do ovo apresenta composição bastante variável, contendo vitaminas, glicose, proteínas, fosfolipídios, componentes bactericidas e antioxidantes. Os meios contendo gema de ovo ofereceram uma taxa considerável de viabilidade espermática quando comparados àqueles contendo apenas glicose (HOUPALATHI et al., 2007). Holt (2000a) disse ainda que a principal função de proteção da gema de ovo é minimizar o choque térmico a partir da estabilização das membranas biológicas. No entanto, deve-se ressaltar que a utilização de gema de ovo no preparo de crioprotetores tem sido questionada no que se diz respeito à sua origem, uma vez que pode gerar contaminações a partir de possíveis microrganismos veiculados (FARSTAD, 2009). Tem sido testada a substituição deste componente por lecitina de soja, permitindo o preparo de meios quimicamente mais definidos por não ter composição tão variável quanto a gema de ovo, e também com menor risco de contaminação (HOUPALATHI et al., 2007; HIWASA et al., 2009).

A utilização de diluentes à base de leite também oferece boa proteção ao sêmen, uma vez que as caseínas do leite reduzem a ligação de proteínas plasmáticas ao espermatozoide, reduzindo a perda de lipídios de membrana durante os procedimentos de criopreservação,

provocando aumento da proteção durante o congelamento e descongelamento dessas células (BERGERON et al., 2007).

De acordo com Purdy (2006), é necessário basear a escolha do açúcar a ser utilizado no crioprotetor em suas funcionalidades e propriedades químicas. Utiliza-se comumente açúcares simples, como a glicose e a frutose, lactose, e trealose, açúcares não penetrantes nas células. Estes atuam na elevação da pressão osmótica da solução, acarretando na desidratação celular e conseqüentemente na redução da formação de cristais de gelo intracelulares. Os açúcares podem também reorganizar a membrana plasmática através de interação com os fosfolipídios, elevando a capacidade de sobrevivência dos gametas (BUCAK et al., 2007).

#### **4.4 Outros aditivos**

##### **4.4.1 Antioxidantes**

Com o intuito de melhorar os índices de fertilidade com a utilização do sêmen criopreservado, tem-se desenvolvido diversos estudos para manter a integridade do espermatozoide durante as etapas de refrigeração e congelamento. Destaca-se a importância dos antioxidantes na proteção celular durante os processos de manipulação espermática e redução da temperatura, com o objetivo de reduzir as conseqüências negativas causadas pelo estresse oxidativo nas células espermáticas. (GUERRA et al., 2004).

De acordo com Halliwell (2000), a função primária dos antioxidantes, utilizados em baixa concentração, é prevenir a oxidação do substrato ou regenerar parcela significativa deste para manter o meio propício aos gametas. A criopreservação tem sobre os espermatozoides efeitos semelhantes aos de capacitação espermática, levando ao aumento de permeabilidade da membrana e à geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) às quais os espermatozoides são vulneráveis (CARVALHO et al., 2002).

O estresse oxidativo tem como conseqüência a peroxidação lipídica das membranas, sendo que seus efeitos incluem perda irreversível de motilidade e danos ao DNA celular. De acordo com Stradaioli et al. (2007), há um equilíbrio entre o potencial antioxidante do plasma seminal e os gametas. No entanto, as atividades pró-oxidantes do metabolismo espermático em condições atípicas como as de manipulação, são determinantes na taxa de peroxidação lipídica. Para evitar as lesões de membrana do espermatozoide, decorrentes das diferenças de concentração de ROS e antioxidantes no plasma seminal, utiliza-se mecanismos enzimáticos de defesa contra a peroxidação lipídica, tais como a superóxido desmutase, catalase, glutathione

redutase e peroxidase. No caso de antioxidantes não enzimáticos tem sido utilizado o urato, ácido ascórbico, carotenoides, taurina, vitamina E, hipotaurina e piruvato (STRADAIOLI et al., 2007).

#### **4.4.2 Inibidores de capacitação espermática prematura**

Ao submeter os espermatozoides à criopreservação, estes se encontram no início do processo de capacitação, e, no entanto, ao serem descongeladas, as células apresentam características típicas de estágios avançados da capacitação. Isto se deve à perda de colesterol da membrana plasmática, fator que a desestabiliza e aumenta sua capacidade de fusão com a membrana acrossomal externa. Levando em consideração o papel importante desempenhado pelo colesterol na estabilização das membranas espermáticas, sugere-se a adição de ciclodextrina-colesterol aos criopreservantes, uma vez que houve aumento considerável do número de espermatozoides viáveis no sêmen após o descongelamento de amostras incubadas com este componente (PURDY et al., 2004).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Durante o período de 3 meses de estágio, o número de animais na propriedade, em quarentena, coleta e hotel variava a cada mês, assim como a programação da coleta era alterada mensalmente, de modo a cumprir os contratos de doses coletadas de cada animal. Os contratos dos animais se dão em número de doses de sêmen, variando de acordo com o interesse do contratante. Desta forma, os animais são distribuídos em coleta durante os dias da semana para que atinjam o número de doses necessárias o mais rápido possível, respeitando a fisiologia do animal. Afinal, a estadia do touro na central gera um ônus ao proprietário.

### **5.1 Fevereiro**

No mês de fevereiro, havia na propriedade em média 300 animais, estando cerca de 20 animais em quarentena, 173 em coleta e 107 alojados no hotel (Tabela 1). É importante ressaltar que estes números são relativos, pois diariamente animais concluem seus contratos e voltam ao hotel, assim como renovam seus contratos e voltam para a coleta.

Tabela 1 — Número de animais na Central Bela Vista, distribuídos em diferentes atividades, durante o mês de fevereiro de 2019.

<b>Atividade Exercida</b>	<b>Número de Animais</b>
Quarentena	20
Coleta	173
Hotel	107
<b>TOTAL:</b>	<b>300</b>

Fonte: Do autor (2019).

Na Tabela 1 é possível notar que havia maior número de animais em coleta, ou seja, produzindo sêmen na fazenda, caracterizando o objetivo principal de uma central de coleta e processamento de sêmen.

A distribuição dos animais entre os dias da semana se dá às segundas e quintas, quartas, terças e sextas, como mostra a Tabela 2, significando que em geral, os animais coletam duas vezes por semana, exceto aqueles que tem necessidades específicas e coletam apenas um dia na semana.

Tabela 2 — Número de animais em coleta distribuídos durante a semana, na Central Bela Vista no mês de fevereiro de 2019.

<b>Dias da Semana</b>	<b>Número De Animais</b>
Segunda e Quinta-Feira	59
Quarta-Feira	52
Terça e Sexta-Feira	62
<b>TOTAL:</b>	<b>173</b>

Fonte: Do autor (2019).

A distribuição das raças entre os dias também foi muito relativa, não havendo um padrão específico, como evidenciado na Tabela 3.

Tabela 3 — Distribuição percentual das raças em coleta durante os dias da semana, na Central Bela Vista, no mês de fevereiro de 2019.

<b>Dias da Semana</b>	<b>Angus</b>	<b>Nelore</b>	<b>Outros</b>
Segunda e Quinta - Feira	10%	80%	10%
Quarta - Feira	5%	80%	15%
Terça e Sexta - Feira	20%	60%	10%

Fonte: Do autor (2019).

## 5.2 Março

Durante o mês de março havia um total de aproximadamente 310 animais na Central Bela Vista, sendo 27 em quarentena, 180 em coleta e 103 no hotel (Tabela 4).

Tabela 4 — Número de animais na Central Bela Vista, distribuídos em diferentes atividades, durante o mês de março de 2019.

<b>Atividade Exercida</b>	<b>Número de Animais</b>
Quarentena	27
Coleta	180
Hotel	103
<b>TOTAL:</b>	<b>310</b>

Fonte: Do autor (2019).

O aumento no número de animais na quarentena representa a chegada de novos indivíduos na propriedade, assim como alguns dos animais que estavam em quarentena no mês de fevereiro passaram a fazer parte do quadro de coleta do mês de março.

A distribuição dos animais entre os dias da semana teve pequena alteração assim como o número de animais em coletado (Tabela 5).

Tabela 5 — Número de animais em coleta distribuídos durante a semana, na Central Bela Vista no mês de março de 2019.

<b>Dias da Semana</b>	<b>Número De Animais</b>
Segunda e Quinta-Feira	62
Quarta-Feira	55
Terça e Sexta-Feira	63
<b>TOTAL:</b>	<b>180</b>

Fonte: Do autor (2019).

Assim como no mês anterior, a distribuição de raças se manteve aleatória. No entanto, com número maior de animais da raça angus em coleta, quando comparado com o mês de fevereiro (Tabela 6).

Tabela 6 — Distribuição percentual das raças em coleta durante os dias da semana, na Central Bela Vista no mês de março de 2019.

<b>Dias da Semana</b>	<b>Angus</b>	<b>Nelore</b>	<b>Outros</b>
-----------------------	--------------	---------------	---------------

Segunda e Quinta - Feira	20%	50%	30%
Quarta - Feira	35%	50%	15%
Terça e Sexta - Feira	70%	15%	15%

Fonte: Do autor (2019).

As quedas de temperatura na cidade de Botucatu favorecem a produção de sêmen do gado europeu. É devido a isto que os animais da raça angus começam a ser coletados com mais intensidade no mês de março, quando a temperatura da cidade começa a cair.

### 5.3 Abril

No decorrer do mês de abril, a Central Bela Vista contou com 313 animais em seu rebanho, estando 26 animais em quarentena, 180 animais em coleta e 107 no hotel, como (Tabela 7).

Tabela 7 — Número de animais na Central Bela Vista, distribuídos em diferentes atividades, durante o mês de abril de 2019.

<b>Atividade Exercida</b>	<b>Número de Animais</b>
Quarentena	26
Coleta	180
Hotel	107
<b>TOTAL:</b>	<b>313</b>

Fonte: Do autor (2019).

A distribuição dos animais durante os dias de coleta se manteve praticamente a mesma do mês anterior (Tabela 8).

Tabela 8 — Número de animais em coleta distribuídos durante a semana, na Central Bela Vista no mês de abril de 2019.

<b>Dias da Semana</b>	<b>Número De Animais</b>
Segunda e Quinta-Feira	61
Quarta-Feira	57
Terça e Sexta-Feira	62
<b>TOTAL:</b>	<b>180</b>

Fonte: Do autor (2019).

Foi possível notar pouca mudança na distribuição dos animais, aumentando um pouco o número de animais programados para quarta-feira, principalmente quando comparados os dois meses anteriores entre si.

No mês de abril houve pequena mudança no número de animais de raças além de Nelore e Angus em coleta (Tabela 9).

Tabela 9 — Distribuição percentual das raças em coleta durante os dias da semana, na Central Bela Vista no mês de abril de 2019.

<b>Dias da Semana</b>	<b>Angus</b>	<b>Nelore</b>	<b>Outros</b>
Segunda e Quinta - Feira	30%	40%	30%
Quarta - Feira	30%	20%	50%
Terça e Sexta - Feira	10%	60%	40%

Fonte: Do autor (2019).

O aumento do número de animais de outras raças é devido à chegada de vários animais da raça Gir na quarentena do mês de março.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A realização do estágio supervisionado na Central Bela Vista, proporcionado pela disciplina PRG 107, foi de suma importância para a minha formação pessoal e profissional. Neste período foi possível sedimentar grande parte do conhecimento obtido durante a graduação em Medicina Veterinária, mas além disto, foi possível conviver com a rotina de uma empresa e agregar conhecimentos e vivência prática. A Central Bela Vista se mostrou uma empresa de grande infraestrutura e responsabilidade com seus clientes e funcionários, além da preocupação com o bem-estar animal e sustentabilidade.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; NETO, J. C. O.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 32-37, 2014.
- ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, Botucatu, v.32, p.541-545, 2000.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, Nantes, v. 61, p. 895-907, 2004.
- BAUDOT, A.; CACELA, C.; DUARTE, M. L.; FAUSTO, R. Thermal study of simple amino-alcohol solutions. **Cryobiology**, Lisboa, v.44, p.150-160, 2002.
- BERGERON, A.; CRÊTE, MH.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, Quebeque, v.70, p. 708-717. 2004.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R. B. S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A. P.; ALVES, S. G. G.; ALMEIDA, A. K.; GUIMARÃES, J. D. Utilização de glicerol e etileno glicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, Viçosa, v.5, p.27-32, 2004.
- BORGES, J.C. 2003. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação de sêmen bovino**. 2003. 73 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
- BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, Ankara, v.67, p.1060-1067, 2007.
- CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.38, p.33-38, 2002.
- CELEGHINI, E. C.C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, São Paulo, v. 104, p. 119-131, 2008.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, Amsterdã, v. 65, p. 1875-1890, 2006.

FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen - New challenges. **Reproduction of Domestic Animals**, Oslo, v.44, p.336-341, 2009.

FERNANDES, A. C.; HEROLD, B.; MAIA, H.; RAUTER, A. M.; RODRIGUES, J. A. R. **Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos**, Lidel, 220 p. 2002.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Eur J Wildl Res**, Berlim, v.53, p.81-89, 2007.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. H. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia - Revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.28, p.187-195, 2004.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRISTER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects os cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Missouri, v. 67, p. 1811-1816, 2002.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, Singapura, v.355, p.1179-1180, 2000.

HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, Obihiro, v.55, p.50-54, 2009.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Londres, v. 62, p. 3-22, 2000a.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Londres, v. 53, p. 47-58, 2000b.

HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. Bioactive egg compounds. **Springer-Verlag**, Nova Iorque, 296 p. 2007.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Científica Ciências Biológica e da Saúde**, Mato Grosso do Sul, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, Montreal, v. 67, p. 1250 - 1258, 2002.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUEZ, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better? **Theriogenology**, Porto Alegre, v. 57, p. 327-344, 2002.

MELO, C. M.; ZAHN, F. S.; MARTIN, I.; ORLAND, C.; DELL'AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Influence of semen storage and cryoprotectant an post-

thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Botucatu, v.27, n.4, p.171-175, 2007.

NUNES, J. F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONSALVEZ, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo, v. 2, p.111-125, 2002.

OLIVEIRA, E. C.S.; JULIANI, G. C.; MARQUES JR, A. P.; HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, p.1116-1122, 2006.

PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, Colorado, v. 48, p. 36-45, 2004.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Fort Collins, v.63, p.215-225, 2006.

SOUZA, A. F.; GUERRA, M. M. P.; BATISTA, A. M.; MERGULHÃO, F. C. C.; NEVES, A. C.; WISCHRAL, A. Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Suplementos**, Belo Horizonte, n.5, p.103-105, 2002.

STEDMAN, T.L. **Stedman: dicionário médico**, Rio de Janeiro, 27 ed, 2196 p. 2003.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSM) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, Udine, v. 67, p. 1249-1255, 2007.

THIRUMALA, S.; CAMPBELL, W.T.; VICKNAIR, M. R.; TIERSCH, T. R.; DEVIREDDY, R.V. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 66, p. 964-973, 2006.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, Zurique, v. 57, p. 1087-94, 2002.

VERBERCKMOES, S.; VAN SOON, A.; DEWULF, J.; & DE KRUIF, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, Merelbeke, v.63, p.912-922, 2005.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, Nova Zelândia, v.62, p. 23-53, 2000.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Londres, v.60/61, p.481-492, 2000.