ARTIGO

AUTORES:

Rinaldo Batista Viana¹Gláucia Mota Bragança¹

Elyzabeth da Cruz

Cardoso²Bruno Moura Monteiro³Cláudio Vieira Araújo⁴Gunnar Colombi da Paz¹Damazio Campos Souza¹

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501 Montese, 66077-901, Belém, PA, Brasil

²Universidade Federal Fluminense, Rua Miguel de Frias, 9, Icaraí, 24220-900, Niterói, RJ, Brasil

³Universidade de São Paulo, Av. Professor Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, 05508-270, São Paulo, SP, Brasil

⁴Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Bairro Boa Esperança, 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil

Recebido: 17/08/2011

Aceito: 26/11/2011

Autor correspondente:

Rinaldo Batista Viana

E-mail: rinaldovianna@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE:

Búfalo

Plasma seminal

Minerais

Sêmen

Reprodução

KEY-WORDS:

Buffalo

Seminal plasma

Minerals

Semen

Reproduction

Preparo de amostras de plasma seminal de búfalos para determinação de minerais

Sampling preparation of buffalo seminal plasma for determination of minerals

RESUMO: O objetivo deste estudo foi comparar dois procedimentos de preparo de amostras de plasma seminal de búfalos para determinação de minerais. O primeiro (procedimento 1) seguiu uma técnica recomendada para análise de minerais no plasma sanguíneo, enquanto o segundo (procedimento 2) seguiu uma técnica para determinação mineral em tecidos animais. Em ambos os procedimentos, a determinação do fósforo foi efetuada por fotolorimetria e os demais minerais, por espectrofotometria de absorção atômica em chama. No procedimento 1, ácido tricloroacético foi utilizado para desproteinização do plasma seminal. O sobrenadante dessa reação foi retirado para ser analisado com as devidas diluições em água deionizada. No procedimento 2, o plasma seminal foi queimado a 560 °C, para que as cinzas formadas fossem solubilizadas em ácido nítrico 50 e 10%, e diluídas em água deionizada. Para determinar a técnica recomendada, serão considerados os menores coeficientes de variação. Concluiu-se que o procedimento 1 foi o mais indicado para as análises de fósforo e magnésio, pois apresentou valores médios com menores coeficientes de variação e desvios padrão. Para cálcio, cobre, ferro, zinco, manganês e ferro, ambos os procedimentos testados demonstraram resultados equivalentes.

ABSTRACT: The purpose of this research was to compare two different procedures for sample preparation of buffalo seminal plasma for determination of minerals. The first procedure 1 was recommended for analysis of minerals in blood plasma. The second procedure 2 was recommended for mineral determination in animal tissues. In both procedures, the determination of phosphorus was performed by spectrophotometry and the other minerals were determined through atomic absorption spectrophotometry in flame. In procedure 1, trichloroacetic acid was used for the deproteinization of the seminal plasma. The supernatant of this reaction was removed for analysis with appropriate dilutions in deionized water. In the second procedure, the seminal plasma was burned at 560 °C, so that the ashes formed were dissolved in nitric acid at 50 and 10% and diluted in deionized water. It was possible to conclude that procedure 1 was the most suitable for the analysis of phosphorus and magnesium, as it presented lower mean values with coefficients of variation and standard deviations. For calcium, copper, iron, zinc and manganese, both procedures tested showed similar results.

1 Introdução

A concentração de minerais nos fluidos que constituem o ejaculado é pequena em relação aos demais tecidos, dependendo quase que exclusivamente do aporte alimentar. Por esse motivo, facilmente ocorrem alterações envolvendo, principalmente, a qualidade do esperma, pois os minerais encontram-se na alimentação mais comumente em deficiência do que em excesso (SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Os macrominerais participam ativamente da reprodução, como o cálcio, que é um importante regulador da fisiologia espermática, estando envolvido em várias etapas da maturação, da capacitação e da reação acrossomal dos espermatozoides (KILIC; SARICA; YAMAN, 1996). Diversamente, os microminerais são essenciais para reações metabólicas, enzimáticas e celulares normais, refletindo as funções hormonais reprodutivas, da espermatogênese e dos processos de maturação espermática (HIDIROGLOU; KNIPEL, 1984).

Ao avaliarem os níveis de zinco, cobre, ferro e manganês no plasma seminal de búfalos, Tuli et al. (1987) utilizaram o método que consistia em retirar a parte espermática, secá-la e depois calciná-la para obtenção de cinzas. Posteriormente, depois de realizada a decomposição, a amostra foi retomada em ácido sulfúrico e nítrico, técnica também utilizada por Kanwal et al. (2000).

Em outro estudo realizado sobre o efeito da filtração sobre os eletrólitos do plasma seminal de búfalos, cada ejaculado foi dividido em três partes, sendo uma não filtrada (controle) e as outras filtradas completamente, tendo sido utilizados dois tipos diferentes de filtros (KUMAR; PANGAWKAR; KUMAR, 1991). Posteriormente, os minerais foram determinados no plasma seminal do sêmen fresco por espectrofotometria de absorção atômica.

Para encontrar os níveis de sódio, potássio e zinco no plasma seminal, Goswami et al. (1993) utilizaram no processo de digestão da amostra uma mistura tripla de ácidos (perclórico, nítrico e sulfúrico) e água destilada, e analisaram em espectrofotômetro de absorção atômica. Shelke e Dhami (2002a, b) determinaram níveis de cálcio, fósforo inorgânico e magnésio no plasma seminal, de acordo com o kit comercial utilizado para analisar o sangue, sendo que

a leitura detalhada foi realizada no espectrofotômetro de absorção atômica.

Os minerais no plasma seminal de búfalos na Amazônia foram determinados pelo procedimento descrito por Milles, Wilkinson e McDowell (2001), recomendado para analisar plasma sanguíneo. A leitura dos minerais foi realizada no espectrofotômetro de absorção atômica em chama, sendo que o fósforo foi determinado pela técnica de colorimetria (VIANA, 2006).

O conhecimento dos principais elementos minerais constituintes do plasma seminal é importante por causa da influência que os minerais exercem no desenvolvimento reprodutivo. Todavia, são poucas as referências sobre esse assunto na espécie bubalina, sendo escasso e inconsistente o conhecimento sobre o processo pelo qual se efetuam as análises e a determinação desses elementos no plasma seminal.

A determinação de minerais no plasma seminal pode ser mais eficiente ao se utilizar o método de preparo de amostras para análises minerais no plasma sanguíneo do que aquele utilizado em tecido animal. A definição de um método de preparo de amostras para determinação de minerais no plasma seminal de búfalos contribui para a obtenção de resultados mais fidedignos, principalmente porque não há um padrão outro para realização dessas análises e vários fatores podem influenciar nos resultados, sobretudo pela técnica utilizada.

Desse modo, objetivou-se determinar se a preparação de amostras conforme análise de minerais no plasma sanguíneo era mais eficiente do que a técnica utilizada para determinação mineral em tecidos animais com a finalidade de se analisar o plasma seminal de búfalos.

2 Material e Métodos

Para a execução deste trabalho, foram utilizados 30 búfalos, sendo oito amostras de cada animal, perfazendo ao todo 240 amostras de plasma seminal de búfalos Murrah × Mediterrâneos, colhidas com o emprego de eletroejaculação (BARNABE et al., 1992b). Os animais apresentavam idade média de 23 meses e eram mantidos sob pastejo contínuo, em uma propriedade no Estado do Pará (02° 37' 36" N, 09° 50' 27" S, 46° 03' 18" E, 58° 53' 42" O Grw),

em piquetes de *Brachiaria brizantha*, considerando-se uma capacidade de suporte de 2UA.ha⁻¹ com adequada suplementação de minerais específica para bubalinos.

As amostras de sêmen foram colhidas com a utilização de eletroejaculador (BARNABE et al., 1992b), sempre no período de menor temperatura ambiental (das 4 às 9 h da manhã). As colheitas foram realizadas nos meses de maio e junho de 2005, tendo sido utilizadas somente aquelas amostras sem nenhum resquício de sujidades e urina, e adequadamente colhidas. Após as colheitas, o sêmen foi centrifugado a 3.000 rpm (2.000 g) durante 20 min. O sobrenadante foi retirado com a utilização de pipeta e aliquoteado em dois frascos, sendo congelado a -20 °C, para posterior determinação das concentrações de minerais. Posteriormente, todas as 240 amostras de plasma seminal foram submetidas, em duplicata, aos dois procedimentos (1 e 2) de preparação de amostras, perfazendo 960 análises.

No primeiro procedimento (procedimento 1), foram seguidas as recomendações de Milles, Wilkinson e McDowell (2001), descritas para a análise de minerais no plasma sanguíneo. Esta consistiu na diluição de 1 mL do plasma seminal em 9 mL de ácido tricloroacético 10% para a precipitação proteica. Uma vez retirado o sobrenadante e efetuadas as respectivas diluições com água deionizada, efetuaram-se as análises de cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn). Para o cálcio (Ca), o magnésio (Mg) e o fósforo (P), as soluções foram preparadas contendo cloreto de lantânio 1%. A determinação do P foi realizada por meio da fotolorimetria e os teores de Ca, Mg, Cu, Fe, Zn e Mn, com a espectrofotometria de absorção atômica em chama (EAA).

No segundo procedimento (procedimento 2), foram seguidas as recomendações de Milles, Wilkinson e McDowell (2001), descritas para a análise de minerais em tecido animal. O procedimento consistiu na obtenção da cinza do plasma seminal após secagem e queima em mufla a 560 °C. Depois, as cinzas foram digeridas em ácido clorídrico a 50 e 10%, e diluídas em água deionizada para as respectivas análises do Cu, Zn, Fe e Mn. Para o Ca, Mg e o P, as soluções foram preparadas contendo cloreto de lantânio 1%. Da mesma forma que no

procedimento 1, a determinação do P foi realizada por meio da técnica de fotolorimetria e os teores de Ca, Mg, Cu, Fe, Zn e Mn, pela espectrofotometria de absorção atômica em chama.

A análise estatística consistiu em realizar correlação de Spearman (ordem) entre os valores encontrados para os minerais obtidos no procedimento 1 e os respectivos valores obtidos no procedimento 2, das mesmas amostras de plasma seminal. Foi considerada correlação significativa quando $p \leq 0,05$. Quando constatada correlação significativa, foi considerado como melhor procedimento aquele com as medidas descritivas (média, desvio padrão e valores mínimos e máximos) com menor coeficiente de variação.

3 Resultados e Discussão

O coeficiente de correlação dos procedimentos testados foi distinto na determinação do Cu, Zn, Mn, Fe e do Ca, e equivaleram-se apenas na obtenção do P e do Mg das amostras (Tabela 1). Para os microminerais e para o Ca, em ambos os procedimentos realizados, visualizaram-se correlações não significativas e baixas; todavia, para o P e Mg, obtiveram-se correlações significativas que tenderam de medianas a altas.

Diferentemente dos procedimentos utilizados neste trabalho, os autores da literatura compilada utilizaram distintos procedimentos para determinação dos minerais no plasma seminal em diferentes espécies animais. Enquanto no presente estudo as análises foram feitas utilizando-se a diluição do plasma seminal em ácido tricloroacético 10% para a precipitação proteica (procedimento 1) e a obtenção de cinzas do plasma seminal após secagem e queima em mufla a 560 °C, digeridas em ácido clorídrico a 50 e 10% (procedimento 2), as amostras, segundo Tuli et al. (1987), foram calcinadas para obtenção de cinzas conforme o procedimento 2; todavia, foram digeridas em ácido sulfúrico e nítrico, técnica também utilizada por Kanwal et al. (2000) ou em uma mistura tripla de ácidos perclórico, nítrico e sulfúrico (GOSWAMI et al., 1993). Tanto no procedimento 1 como no 2 não se utilizou o processo de filtração descrito por Kumar, Pangawkar e Kumar (1991). Já Shelke e Dhami (2002a, b) utilizaram um kit comercial empregado para analisar sangue.

As médias encontradas para os macrominerais no presente estudo (Tabela 2), de um modo geral, não divergiram dos valores descritos na literatura coligida, pois a variação foi próxima daquelas observadas na literatura (Tabela 3).

As médias encontradas para o cálcio nos procedimentos 1 e 2 (Tabela 2) situaram-se entre os valores descritos por Barnabe et al. (1992a), que estudaram sêmen de búfalos Murrah × Mediterrâneo, no Estado de São Paulo. Porém, somente o procedimento 1 mostrou valores próximos daqueles encontrados por Shelke e Dhami (2002a, b), que utilizaram búfalos da raça Jafarabadi e analisaram o plasma seminal conforme plasma sanguíneo em espectrofotômetro de absorção atômica, similarmente ao feito no procedimento 1 neste trabalho.

As médias de fósforo de ambos os procedimentos (Tabela 2) foram semelhantes às observadas por Shelke e Dhami (2002a, b) e menores do que aquelas descritas por Mohan et al. (1994) que, de forma semelhante a este trabalho, utilizaram búfalos Murrah cruzados.

No procedimento 1, o magnésio apresentou valor médio maior do que o citado por Sansone, Nastri e Fabbrocini (2000) em búfalos, enquanto que, no procedimento 2, o valor médio do magnésio variou proximamente aos valores relatados por Sansone, Nastri e Fabbrocini et al. (2000) e Shelke e Dhami (2002a, b).

Os níveis de zinco observados nos procedimentos 1 e 2 foram menores do que os descritos por Tuli et al. (1987), Kumar, Pangawkar

Tabela 1. Correlação de Spearman para os minerais obtidos nas técnicas estudadas. Estado do Pará, 2011.

	Ca ²	P ²	Mg ²	Cu ²	Zn ²	Mn ²	Fe ²
Ca ¹	0,20 p = 0,28						
P ¹		0,72 p < 0,0001					
Mg ¹			0,68 p < 0,0001				
Cu ¹				0,13 p = 0,49			
Zn ¹					0,27 p = 0,14		
Mn ¹						-0,21 p = 0,26	
Fe ¹							0,29 p = 0,10

¹Procedimento 1 - recomendado para a análise de minerais no plasma sanguíneo. ²Procedimento 2 - recomendado para a análise de minerais em tecido animal.

Tabela 2. Médias, desvios padrão, coeficientes de variação e valores mínimos e máximos dos minerais no plasma seminal de acordo com as técnicas estudadas. Estado do Pará, 2011.

Mineral	Técnica	Média ± desvio padrão	Coeficiente de variação	Mínimo	Máximo
mg dL ⁻¹					
Cálcio	1	12,99 ± 2,84	21,83	8,83	21,95
	2	8,96 ± 5,32	59,41	0,42	24,55
Fósforo	1	3,54 ± 2,61	73,77	0,72	11,51
	2	3,28 ± 4,75	144,59	0,04	18,58
Magnésio	1	9,78 ± 2,85	29,16	5,31	18,30
	2	4,46 ± 2,87	64,34	0,41	11,89
µg dL ⁻¹					
Cobre	1	0,11 ± 0,10	82,23	0,04	0,57
	2	0,53 ± 0,50	93,78	0,03	1,81
Zinco	1	4,17 ± 1,06	25,57	2,74	6,70
	2	0,49 ± 0,47	97,40	0,04	2,69
Manganês	1	0,14 ± 0,09	65,26	0,03	0,50
	2	0,50 ± 0,29	56,62	0,11	1,32
Ferro	1	7,86 ± 1,82	23,18	4,92	11,31
	2	5,59 ± 3,24	57,89	0,92	13,60

¹Procedimento 1 - recomendado para a análise de minerais no plasma sanguíneo. ²Procedimento 2 - recomendado para a análise de minerais em tecido animal.

Tabela 3. Valores descritos para macro e microminerais no plasma seminal de búfalos de acordo com cada autor.

Mineral	Valor descrito	Autor
Ca	7,93-15,64 mg dL ⁻¹	Barnabe et al. (1992a)
	(14,40 ± 0,19 mg dL ⁻¹)	Shelke e Dhami (2002a, b)
P	13,59 ± 0,65 mg dL ⁻¹	Mohan et al. (1994)
	5,85 ± 0,23 mg dL ⁻¹	Shelke e Dhami (2002b)
Mg	6,46 ± 0,39 mg dL ⁻¹	Sansone, Nastri e Fabbrocini (2000)
	2,51 ± 0,07 mg dL ⁻¹	Shelke e Dhami (2002a, b)
Zn	33,50 ± 4,60 µg dL ⁻¹	Tuli et al. (1987)
	27,40 ± 0,20 µg dL ⁻¹	Kumar, Pangawkar e Kumar (1991)
	58,00 ± 4,20 µg dL ⁻¹	Dhami, Mohan e Sahni (1995)
	5,68 µg dL ⁻¹	Sansone, Nastri e Fabbrocini (2000)
	13,87 ± 1,81 µg dL ⁻¹	Dhami et al. (2001)
Fe	58,0 ± 4,20 µg dL ⁻¹	Shelke e Dhami (2002a)
	10,94 ± 0,81 µg dL ⁻¹	Shelke e Dhami (2002b)
	12,80 ± 1,40 µg dL ⁻¹	Tuli et al. (1987)
	29,90 ± 2,30 µg dL ⁻¹	Dhami, Mohan e Sahni (1995)
	4,48 ± 0,36 µg dL ⁻¹	Dhami et al. (2001)
Cu	4,77 ± 0,17 µg dL ⁻¹	Shelke e Dhami (2002a, b)
	0,90 ± 0,10 µg dL ⁻¹	Dhami, Mohan e Sahni (1995)
	0,27 ± 0,02 µg dL ⁻¹	Dhami et al. (2001)
Mn	0,25 ± 0,01 µg dL ⁻¹	Shelke e Dhami (2002a, b)
	7,70 ± 2,40 µg dL ⁻¹	Tuli et al. (1987)
	2,90 ± 0,20 µg dL ⁻¹	Dhami, Mohan e Sahni (1995)
	0,24 ± 0,00 µg dL ⁻¹	Dhami et al. (2001)
	0,21 ± 0,02 µg dL ⁻¹	Shelke e Dhami (2002a, b)

e Kumar (1991), Dhami, Mohan e Sahni (1995), Dhami et al. (2001) e Shelke e Dhami (2002a, b), ao estudarem os perfis bioquímicos e os macro e microminerais do sêmen congelado de touros da raça Jafarabadi, e semelhantes (procedimento 1) às concentrações desse mineral descritas por Sansone, Nastri e Fabbrocini (2000).

O valor médio do ferro nos procedimentos 1 e 2 foi menor do que as médias citadas por Tuli et al. (1987) e Dhami et al. (1995); todavia, as concentrações obtidas nos procedimentos 1 e 2 foram, respectivamente, maiores ou similares às observadas por Dhami et al. (2001) e Shelke e Dhami (2002a, b).

Os níveis de cobre determinados pelo procedimento 1 foram menores do que os descritos na literatura compilada; no entanto, no procedimento 2, os valores observados situaram-se próximos àqueles relatados por Dhami, Mohan e Sahni (1995), Dhami et al. (2001) e Shelke e Dhami (2002a, b).

A concentração de manganês obtida pelo procedimento 1 foi menor do que aquela mencionada por Dhami et al. (2001) e Shelke e Dhami (2002a, b). Pelo procedimento 2, esse valor foi discretamente

maior do que aqueles descritos pelos supracitados autores. Todavia, as médias obtidas para o Mn em ambos os procedimentos no presente estudo foram menores do que as encontradas por Tuli et al. (1987), que utilizaram um procedimento em que o plasma foi calcinado e depois tratado com ácidos, assim como no procedimento 2 adotado neste estudo e por Dhami, Mohan e Sahni (1995), que trabalharam com búfalos Murrah.

As variações obtidas na concentração de minerais no plasma seminal podem ocorrer em função do procedimento utilizado para o preparo das amostras. Entretanto, torna-se difícil a comparação entre os diversos trabalhos realizados, visto que trabalharam com animais de raças e idade distintas, e submetidos a diferentes manejos nutricionais e em diferentes condições de ambiente. Daí a importância deste estudo, visto que os dois procedimentos testados foram realizados com animais de mesma idade e mesmos padrões raciais, submetidos ao mesmo manejo nutricional e mineral, além de o estudo ter sido realizado sob as mesmas condições edafoclimáticas.

4 Conclusões

O procedimento utilizado para análise de minerais no plasma sanguíneo foi mais eficiente para determinação de fósforo e magnésio, enquanto que, para cálcio, cobre, ferro, zinco, manganês e ferro, ambos os procedimentos mostraram-se equivalentes.

Agradecimentos

À Matsuda Ltda, à Associação Paraense dos Criadores de Búfalos, à SECTAM/FUNTEC/Governo do Estado do Pará e ao CNPq, pelo suporte financeiro dado a esta pesquisa.

Referências

- BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; OLIVEIRA, C.A.; ARRUDA, R.P.; VALENTIM, R.; ZOGNO, M.A. 1992a. Biochemical study of semen of buffaloes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION XII, 3, 1992, Hague-Netherlands. *Anais...Hague-Netherlands: International Congress on Animal Reproduction 1992a. p.1523-1524.*
- BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; OLIVEIRA, C.A.; ARRUDA, R.P.; VALENTIM, R.; ZOGNO, M.A. 1992b. Seasonal behavior of semen collected by

- electroejaculation form buffaloes raised in São Paulo State (Southeast-Brazil) In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION XII, 4, 1992, Hague-Netherlands. *Anais...* Hague-Netherlands: International Congress on Animal Reproduction 1992b. p.1690-1691.
- DHAMI, A. J.; MOHAN, G.; SAHNI, K. L. Seminal LDH and trace elements in the static versus motile ejaculates of Friesian and Murrah buffalo bulls. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 10, p. 151-156, 1995.
- DHAMI, A. J.; VINAYA, B. S.; PATEL, K. P.; PARADVA, J. P.; KAVANI, F. S. Trace minerals profile of blood and seminal plasma of breeding bulls. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 71, n. 8, p. 761-763, 2001.
- GOSWAMI, S. C.; MEHTA, S. N.; GEORGIE, G. C.; TULI, R. K.; DIXIT, V. P.; BHELA, S. L. Blood and seminal plasma trace mineral concentrations during different seasons in crossbred bulls. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 63, n. 4, p. 430-433, 1993.
- HIDIROGLOU, M.; KNIPFEL, J. E. Zinc in mammalian sperm – review. *Journal of Dairy Science*, v. 67, p. 1147-1156, 1984. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81416-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81416-2)
- KANWAL, M. R.; REHMAN, N. U.; AHMAD, N.; SAMAD, H. A.; ZIA-UR-REHMAN; AKHTAR, N.; ALI, S. Bulk Cations and Trace Elements in the Nili-Ravi Buffalo and Crossbred Cow Bull Semen. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 2, n. 4, 2000.
- KILIC, S.; SARICA, K.; YAMA, N. Effect of total and ionized calcium levels of seminal fluid on sperm motility. *Urologia Internationalis*, v. 56, p. 215-8, 1996. <http://dx.doi.org/10.1159/000282845>
- KUMAR, M.; PANGAWKAR, G. R.; KUMAR, R. Effect of filtration on seminal plasma electrolytes in buffalo bull. *Indian Veterinarian Journal*, v. 68, p. 493-494, 1991.
- MILLES, S. P. H.; WILKINSON, N. S.; McDOWELL, L. R. *Analysis of minerals for animal nutrition research*. Flórida: Editora da UFL, 2001. 117 p.
- MOHAN, G.; TRIPATHI, R. P.; DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. Certain biochemical constituents and freezability of semen of Holstein-Friesian, crossbred and Murrah bulls under tropics. *Indian Journal of Animal Science*, v. 64, n. 7, p. 704-707, 1994.
- SANSONE, G.; NASTRI, M. J. F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 55-76, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00154-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00154-8)
- SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. *Capacidade reprodutiva de touro de corte: funções, anormalidades e outros fatores que influênciam*. Campo Grande: Embrapa gado de corte, 1993. Circular técnica 51. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc51/index.html>>.
- SHELKE, V. B.; DHAMI, A. J. Comparative appraisal of blood and seminal plasma biochemistry of Gir and Jafarabadi breeding bulls. *Indian Veterinary Journal*, v. 79, p. 349-353, 2002a.
- SHELKE, V. B.; DHAMI, A. J. Interrelationships of seminal plasma biochemical, enzymatic and macro-micro mineral profiles with physical attributes and freezability of semen in Jafarabadi bulls. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 72, n. 5, p. 386-390, 2002b.
- TULI, R. K.; GOYAL, R. L.; MANDAKHOT, V. M.; SINGAL, S. P. Trace mineral in buffalo seminal plasma. *Indian Journal Dairy Science*, v. 40, n. 3, p. 348-350, 1987.
- VIANA, R. B. *Influência da suplementação mineral no desenvolvimento reprodutivo de bubalinos do desmame aos vinte e quatro meses de idade*. 201 f. 2006. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.