



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“USO DEL AGUA DE COCO COMO DILUYENTE  
DE SEMEN. UNA REVISIÓN”**

**SERVICIO PROFESIONAL QUE PRESENTA  
PMVZ. DIANA LAURA ALVAREZ ALCARAZ**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**ASESOR: Dra. Laura Guadalupe Sánchez Gil**

Morelia, Michoacán, Agosto de 2019



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“USO DEL AGUA DE COCO COMO DILUYENTE  
DE SEMEN. UNA REVISIÓN”**

**SERVICIO PROFESIONAL QUE PRESENTA  
PMVZ. DIANA LAURA ALVAREZ ALCARAZ**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

Morelia, Michoacán, Agosto de 2019

## DEDICATORIA

A mis padres, Alfonso y Ángela, con todo mi amor, por su sacrificio y esfuerzo para darme una carrera para mi futuro y ser quienes me apoyaron durante mi formación profesional ante cualquier situación.

## AGRADECIMIENTOS

A mi padre, Alfonso, por su lucha constante día con día en su trabajo, para poder darnos a mis hermanas y a mí lo mejor, ya que es mi ejemplo a seguir y por enseñarme que nunca hay que dejarse vencer antes adversidades y salir siempre adelante.

A mi madre, Ángela, por siempre estar ahí cuando la necesito, y escucharme cuando es necesario, por todos sus consejos y apoyo incondicional.

A mis hermanas, Ángeles, Alejandra y Mariana, por todo el apoyo que me brindan siempre, por sus regaños y consejos.

A mi asesora de Tesina, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia profesional y su inmensa paciencia durante el desarrollo de este trabajo, así como por brindarme su apoyo y sus consejos.

A mis Amigos Valentín Cerda, Carlos Mora y Juan Carlos Castillo, por brindarme su amistad durante 3 años de la carrera y por seguir haciéndolo, por preocuparse por mí y por todo el apoyo brindado.

A mi amiga Zuleima Manríquez, por brindarme su amistad durante 5 años de la carrera, por escucharme, aconsejarme, por estar conmigo en los momentos buenos y malos, por su impulso durante este trabajo.

A los profesores Dr. Rogelio Garcidueñas Piña, MC. Félix Márquez Mercado, MC. Angélica Gutiérrez Cancino, Dra. Laura Guadalupe Sánchez Gil y Dr. Lauro Rogelio Chávez Rodríguez, por todos los conocimientos compartidos, no solo en lo profesional sino en lo personal y lo ético, así como también por demostrar que todavía hay docentes a los que les gusta enseñar y transmitir el conocimiento debidamente.

A la Benemérita Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

# ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN. ....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Historia de la Inseminación Artificial.....	2
2.2. Técnica de Inseminación Artificial. ....	6
2.3. Tipos de diluyentes utilizados en la inseminación artificial.....	10
2.3.1. Características del diluyente.....	11
2.3.2. Tipos de diluyentes de semen de animales domésticos. ....	12
2.3.2.1. Para la conservación del semen en estado fresco o refrigerado.....	13
2.3.2.2. Para la conservación del semen en congelación .....	14
2.3.2.3. Diluyentes comerciales. ....	14
2.3.3. Elección del diluyente adecuado.....	15
2.4. Características del Agua de Coco.....	16
2.5. Usos del agua de coco.....	22
2.6. Usos del agua de coco como diluyente de semen .....	23
2.6.1. Agua de coco en diluyentes para la conservación de semen en estado fresco.....	25
2.6.2. Agua de coco en diluyentes para la conservación de semen en estado congelado.....	29
3. CONCLUSIONES.....	32
4. BIBLIOGRAFÍA .....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de inseminación artificial de uso en diferentes especies de animales domésticos.....	6
Tabla 2. Análisis proximal del agua de coco .....	17
Tabla 3. Composición química del agua de coco .....	18

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Técnica de inseminación rectovaginal.....	7
Ilustración 2. Técnica de inseminación transcervical.....	7
Ilustración 3. Técnica de inseminación cervical.....	8
Ilustración 4. Técnica de inseminación postcervical o intrauterina.....	8
Ilustración 5. Técnica de inseminación laparoscópica. ....	9

## **Resumen.**

La inseminación artificial es una técnica que se ha utilizado por años, que con el paso del tiempo y a lo largo de la historia se fue perfeccionando hasta el día de hoy. Durante años, la inseminación artificial ha sido utilizada para el mejoramiento genético de un hato, aumentar la productividad y evitar pérdidas económicas en el remplazo de toros. De acuerdo a las investigaciones realizadas, existen las relacionadas con la dilución y la preservación del semen a diferentes temperaturas. Los diluyentes empleados son de suma importancia para la conservación de las células espermáticas debido a que, por su constitución, proporcionan los elementos requeridos para que las células se mantengan íntegras, viables y con la capacidad de fecundar a los ovocitos, además de coadyuvar a la obtención de una mayor cantidad de eyaculado disponible para un número mayor de hembras.

A través de este documento se pretende dar a conocer las ventajas del uso del agua de coco en la inseminación artificial y ofrecer al lector una recopilación bibliográfica de los trabajos de investigación que a juicio del autor sobresalen en él y la difusión de sus resultados.

**Palabras Clave:** Diluyentes, inseminación artificial, agua de coco, semen, célula espermática.

## **Summary**

The artificial insemination is a technique that has been used for years, and throughout the time along the history it was perfected to this day. During years, has been used artificial insemination as a tool for genetic improvement of a herd, it is also used to increase productivity and avoid losses during replacement of Bulls. Existing investigations include those related to dilution and preservation of semen at different temperatures. The diluents used are of utmost importance for the conservation of sperm cells because, by constitution, they provide the elements required for the cells to remain intact, viable and with the ability to fertilize the oocytes, in addition to contributing to the obtaining a greater amount of ejaculate available for a greater number of females.

Through this document it is intended to make known the advantages of the use of coconut water in artificial insemination and offer the reader a bibliographic compilation of the research Works that, in the authors opinion, stand out in him and the dissemination results.

**Key words:** Diluents, artificial insemination, coconut water, semen, spermatic cell.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La inseminación artificial es una técnica que consiste en la introducción y el depósito de espermatozoides o de semen en el aparato genital femenino por métodos artificiales y mediante el uso de instrumental específico. Es una técnica sencilla y práctica que tiene gran aceptación para su uso en animales, entre otras cosas, porque permite el mejoramiento genético acelerado de las especies (Hafez, 2000).

Existen antecedentes de que la inseminación artificial fue utilizada por primera vez en el año 1332 d.c. en la especie equina (Foote, 2002; Giraldo, 2007; Rehman, et al., 2013) y que años más tarde, en 1780, se comenzó a utilizar en caninos en Europa (Hafez, 2000). A partir de entonces, la técnica de la inseminación artificial se ha ido perfeccionando y su uso actual en animales domésticos se ha extendido en el mundo entero (Giraldo, 2007; Ombeletl, 2015; Prathima, et al., 2015), de tal manera que hoy día existe toda una gran industria a su alrededor, producto del desarrollo de muchas investigaciones en diferentes especies animales y del desarrollo de otras tecnologías como la criopreservación y el sexado de espermatozoides, la regulación del ciclo estral, la fertilización *in vitro*, la transferencia de embriones o la clonación (Foote, 2002).

Entre estas investigaciones destacan las relacionadas con la dilución y la preservación del semen a diferentes temperaturas. Los diluyentes empleados son de suma importancia para la conservación de las células espermáticas debido a que, por su constitución, proporcionan los elementos requeridos para que las células se mantengan íntegras, viables y con la capacidad de fecundar a los ovocitos, además de coadyuvar a la obtención de una mayor cantidad de eyaculado disponible para un número mayor de hembras (Gadea, 2003; Galina, 2006).

Existen diluyentes comerciales que se encuentran a la venta en los mercados nacionales e internacionales, así como también diluyentes naturales que son de bajo costo y/o fácil elaboración. Entre estos últimos, se encuentra el agua de coco que ha

recibido la atención de varios investigadores por sus constituyentes químicos y por los resultados favorables observados en la preservación de la viabilidad espermática.

A través de este documento se pretende dar a conocer las ventajas del uso del agua de coco en la inseminación artificial y ofrecer al lector una recopilación bibliográfica de los trabajos de investigación que a juicio del autor sobresalen en él y la difusión de sus resultados.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1. Historia de la Inseminación Artificial.**

A través de una leyenda se tiene conocimiento que en la Edad Media, en el año 1332 d.c., los jefes de tribus árabes lograron obtener esperma de un semental equino de una comunidad rival, introduciendo un puñado de pelos en la vagina de yeguas servidas para impregnarlos de semen y posteriormente lo depositaron en la vagina de yeguas en celo, logrando de esta manera la inseminación y la concepción de sus hembras (Foote, 2002; Giraldo, 2007; Rehman, et al., 2013; Cárcano, et al., 2016; Ballesteros, et al., 2017).

Paez (2012), citado por (Ballesteros, et al., 2017), menciona que si bien la maniobra del traspaso de semen fue muy rudimentaria, el hecho permitió el conocimiento empírico de las virtudes reproductivas y productivas de importancia económica así como las relacionadas al mejoramiento genético animal, aunque sin entender lo que sucedía debido a que en ese tiempo no se conocían a los espermatozoides.

Fue hasta el año de 1678, cuando la Real Sociedad de Inglaterra publicó el trabajo de investigación de Leeuwenhoek y Hamm, que dio a conocer la existencia de lo que llamaron "animalcules" después de observar una gota de semen bajo una lente de 270 aumentos (Foote, 2002). A partir de entonces se iniciaron investigaciones que llevaron al entendimiento del origen, la anatomía y la fisiología de los espermatozoides.

El primer reporte escrito de una inseminación artificial exitosa fue publicado por un fisiólogo italiano, Lázaro Spallanzani en 1780, quien después de analizar y clasificar a varias especies de animales marinos y terrestres, decidió experimentar con la reproducción de un perro del cual obtuvo tres crías luego de 62 días pos inseminación de la hembra (Perez, 2011). En 1782, Rossi y su profesor de apellido Branchi repitieron con éxito el experimento de Spallanzani (Hafez, 2000).

En 1799 se reportó en Inglaterra, que un investigador de apellido Hunter utilizó la inseminación artificial en una mujer (Reggio, 1999), sentando así las bases de lo que hoy se conoce como reproducción asistida en humanos.

Poco tiempo después (1803), los experimentos de Spallanzani demostraron que el “componente fertilizante” del semen era sólido y podía filtrarse para mantenerse separado del líquido seminal que era estéril. Además, inició con los estudios para la conservación de las células espermáticas que concluyeron en señalar que el componente fértil enfriado con nieve no moría, sino que sólo se tornaba inmóvil hasta que se le exponía de nuevo al calor, después de lo cual seguía móvil por varias horas más. Estas investigaciones estimularon la experimentación con células sexuales y la ejecución de estudios sobre el proceso de fertilización, pero sobre inseminación artificial no hubo comunicados adicionales hasta finales del siglo (Perez, 2011).

Fue hasta 1897 cuando varios investigadores y en diversos países, reportaron haber usado la técnica de la inseminación artificial en estudios aislados con conejos, perros y caballos. Entre estos investigadores destacó la participación de Walter Heape, por su importante contribución al estudio de la estacionalidad reproductiva, de las tasas de concepción en hembras inseminadas y de las ventajas de la técnica de inseminación artificial, tales como el uso de un mismo eyaculado para inseminar a varias hembras y la mejora genética de la progenie (Foote, 2002; Perez, 2011).

Los primeros esfuerzos para establecer a la técnica de inseminación artificial como un procedimiento práctico, se iniciaron en Rusia en 1899 por Ivanoff, quien para 1907 ya había experimentado la inseminación artificial en diferentes especies animales

(bovinos, equinos, caninos, zorros, conejos y aves), ya había desarrollado algunos diluyentes para el semen, ya había incluido procedimientos de asepsia a la técnica de la inseminación artificial y ya había capacitado a personal técnico en la selección de garañones superiores (Foote, 2002) para multiplicar su descendencia y reemplazar a la población de caballos perdidos en la guerra. En 1912 el científico japonés que colaboró con Ivanoff, Dr. Ishikawa, regresó a Japón y comenzó un programa similar en caballos que se constituyó como el origen de la inseminación artificial aplicada en bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y aves de ese país (Reggio, 1999; Foote, 2002).

Derivado de los resultados obtenidos por Spallanzani e Ivanoff, el italiano Amantea en 1914 desarrolló una vagina artificial para perros la que sirvió de modelo para que años más tarde (1938) en Rusia, Milovanov diseñara vaginas artificiales para toros, caballos y carneros. Estos hechos permitieron mejorar en gran medida la técnica de recolección de semen, pasando a la colecta directa desde el macho y dejando de lado la colecta con esponjas intravaginales (Foote, 2002; Ombeletl, 2015). Otro método de recolección de semen que se comenzó a utilizar en esa época fue a través del electroeyaculador, como una alternativa a la vagina artificial en animales que no estaban entrenados para usarla; Gunn fue uno de los primeros en experimentar con electroeyaculadores, sin embargo y a pesar de su disponibilidad en el mercado para muchas especies animales, su uso no ha sido muy extendido (Reggio, 1999).

Para 1933 el Reino Unido se constituyó como el pionero en la comercialización de semen, con la publicación del libro “The technique of artificial insemination” por Walton y la difusión del éxito obtenido con sus experimentos sobre la conservación y transporte de espermatozoides a Polonia y la inseminación con dosis seminales de ovino, almacenadas durante dos días (Foote, 2002; Ballesteros, et al., 2017).

Tres años después, Eduard Sorensen y médicos veterinarios daneses establecieron el método rectovaginal para la fijación del cérvix que permitió por una parte reducir el número de espermatozoides por dosis seminal y por otra, modificar el sitio de depósito del semen de una manera más profunda (dentro del cérvix o en el cuerpo

del útero) (Reggio, 1999). En 1940, Sorensen inventó la forma de almacenar el semen en pajillas lo que facilitó el trabajo para su depósito intrauterino; sin embargo el francés Cassou en 1964, modificó esta pajilla danesa y produjo las pajillas plásticas selladas y la pistola para inseminación cuyas variantes se comercializan y utilizan mundialmente hasta la fecha (Foote, 2002; Giraldo, 2007; Rehman, et al., 2013).

En México, las primeras inseminaciones en vacas con semen fresco fueron realizadas en 1945 por el doctor Carvajal, pero fue hasta 1960 que se empezó a utilizar la inseminación artificial a escala comercial en los bovinos, utilizando semen congelado y fresco (Ortuño, 2010). En 1990, se inició el desarrollo de la técnica utilizando semen bovino sexado con potencial limitado. Mientras tanto, la inseminación artificial se ha extendido a nivel nacional a otras especies animales, como los porcinos, ovinos, equinos y caninos, principalmente (Reggio, 1999).

A partir de la década de los 40's, cuando en los Estados Unidos de Norteamérica se produjo un fenómeno del desarrollo de la técnica de inseminación artificial en bovinos, a lo largo del mundo y en diferentes especies animales se han venido realizando estudios que tienden a mejorar la técnica propiamente dicha y los resultados de la inseminación artificial. Estos estudios se relacionan con la calidad seminal, el procesamiento y la conservación de las dosis de semen, el comportamiento sexual de machos y hembras, la frecuencia y la forma de recolección del semen, la genética y nutrición del semental, la detección y sincronización del estro, el momento óptimo de la inseminación, el sexado de los espermatozoides, los porcentajes de fertilidad obtenidos y los materiales y equipos que se requieren para la correcta aplicación de la técnica, entre otros temas (Foote, 2002).

En relación al procesamiento y la conservación de las dosis de semen por un periodo de tiempo prolongado, las investigaciones que se iniciaron en la década de los 40's permitieron el desarrollo de varias mezclas de diluyentes para conservar el semen en estado fresco o congelado y algunas de ellas se utilizan todavía con buenos resultados.

## 2.2. Técnica de Inseminación Artificial.

La inseminación artificial es una técnica instrumental por medio de la cual es posible preñar una hembra sin ser necesaria la presencia del semental. Se ha realizado con éxito desde 1780 y ha tenido auge desde la segunda mitad de nuestro siglo, siendo en la actualidad de uso cotidiano en varias especies animales (Hafez, 2000) e incluso en humanos.

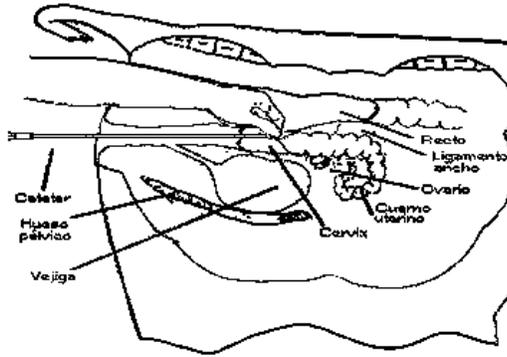
Como se observa en la Tabla 1, existen diferentes técnicas empleadas en la inseminación de los animales domésticos.

Tabla 1. Técnicas de inseminación artificial de uso en diferentes especies de animales domésticos.

ESPECIE	TÉCNICAS EMPLEADAS
Bovinos	Rectovaginal Laparoscópica
Porcinos	Cervical Postcervical o Intrauterina
Ovinos	Vaginal Cervical Laparoscópica
Equinos	Rectovaginal
Caninos	Vaginal Laparoscópica

Fuente: Morrow, 1986; Galina y Valencia, 2006; Anon, 2012; Carvalho, et. al., 2006; Díaz, et al., 2013; Hormaechea, et al., 2016.

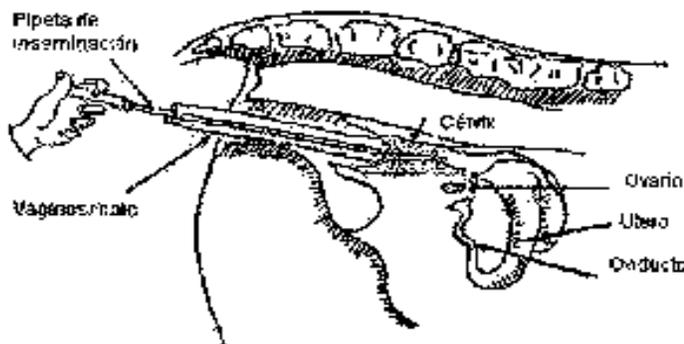
La inseminación rectovaginal (ilustración 1) consiste en introducir una pipeta con el semen por la vagina y ubicar el cérvix a través del recto, con el objeto de hacer llegar la pipeta hasta el último anillo del cuello uterino. Una vez en esa posición, el semen será depositado al inicio del cuerpo del útero (Morrow, 1986; Diaz, et al., 2013).



Fuente: Inseminacionartificial-dayana.blogspot.com

Ilustración 1. Técnica de inseminación rectovaginal.

La inseminación transcervical (ilustración 2) consiste en la utilización de un vaginoscopio que posibilita la localización del cérvix y su posterior fijación a través de un fórceps para aplicar una suave tracción del cérvix hacia arriba, facilitando la introducción de la pipeta de inseminación en el canal cervical.

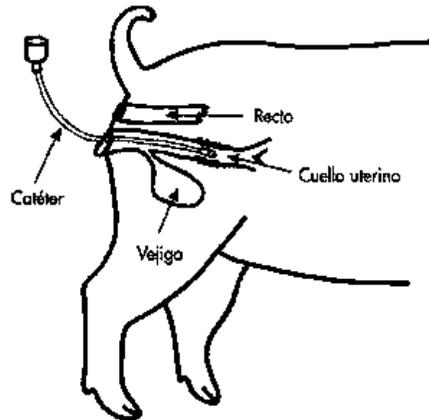


Fuente: Repository.lasalle.edu.co

Ilustración 2. Técnica de inseminación transcervical.

La inseminación artificial vaginal consiste en la deposición del semen en la parte craneal de la vagina (Galina, 2006).

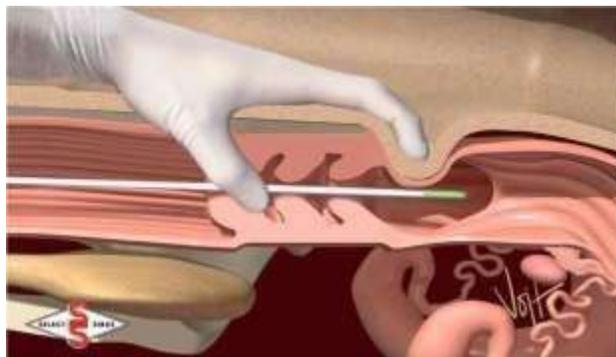
La inseminación artificial cervical (ilustración 3) consiste en el depósito del semen en el interior del cérvix, una vez que se han traspasado los primeros pliegues cervicales (Morrow, 1986; Galina, 2006).



Fuente: Elsitioporcino.com

Ilustración 3. Técnica de inseminación cervical.

La inseminación intrauterina o postcervical (ilustración 4) consiste en la deposición del semen directamente en el cuerpo del útero, posterior al cérvix (Anon., 2012; Hormaechea, et al., 2016).

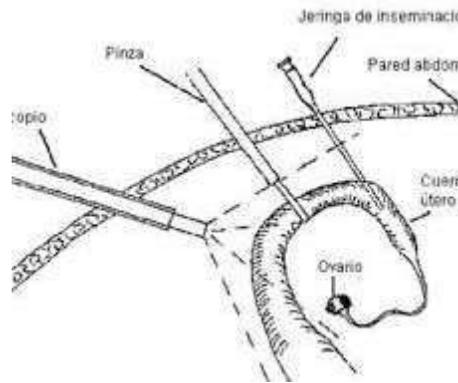


Fuente: Selectsires.com

Ilustración 4. Técnica de inseminación postcervical o intrauterina.

La inseminación laparoscópica (ilustración 5) consiste en la deposición del semen directamente en la porción anterior del cuerno uterino, haciendo una incisión en la

cavidad abdominal y mediante un equipo de laparoscopia (Hafez, 2000; Carvalho, 2013).



Fuente: Researchgate.net

Ilustración 5. Técnica de inseminación laparoscópica.

Como cualquier técnica, la inseminación artificial tiene ventajas y desventajas, mismas que deben ser analizadas a conciencia para poder determinar su aplicación como tecnología práctica (De La Torre Sánchez, et al., 1993).

Entre sus ventajas, la inseminación artificial maximiza el uso de machos sobresalientes aún después de muertos y la diseminación de material genético superior, mejora la tasa y la eficiencia de la selección genética, permite llevar a cabo pruebas de progenie más extensas y de manera más rápida, facilita la introducción de nuevo material genético, reduce los costos de transporte internacional de semen, reduce el riesgo de la propagación de enfermedades de transmisión sexual, maximiza la cantidad de vientres productivos por unidad de producción y permite incrementar el número de crías por semental al año, entre otras (Galina, 2006; De La Torre Sánchez, et al., 1993; Hafez, 2000; Verma, et al., 2012; Cárcano, et al., 2016).

Las desventajas de la técnica son menores a sus ventajas y pueden clasificarse en extrínsecas, como las referentes a la necesidad de incrementar la inversión en infraestructura básica y equipo especializado, así como en la contratación de personal capacitado, y en intrínsecas que derivan en el surgimiento de problemas de

consanguinidad y en incrementar el riesgo de utilizar intensamente un semental con características no deseables, entre otros (De La Torre Sánchez, et al., 1993; Hafez, 2000).

### **2.3. Tipos de diluyentes utilizados en la inseminación artificial.**

Diluyente es la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir la dosis necesaria, preservando las características funcionales de los espermatozoides y manteniendo un nivel de fertilidad adecuado, aprovechando al máximo los espermatozoides contenidos en un eyaculado (Valencia, 2006; Julca, 2014).

Una de las funciones de los diluyentes es preservar la viabilidad y la fertilidad de los espermatozoides por un periodo de tiempo prolongado que va desde días, semanas e incluso años, de tal manera que se han desarrollado diluyentes para conservar el semen en estado fresco o congelado (Reggio, 1999; Foote, 2002; Ballesteros, et al., 2017; Cuenca, 2017).

En relación a los ingredientes utilizados en la fabricación de diluyentes, las investigaciones que iniciaron los estadounidenses Phillips y Lardy en 1940 probaron el efecto protector de la yema de huevo y fosfatos sobre la integridad de los espermatozoides bovinos destinados a la congelación; en esa década se generaron varias mezclas de diluyentes que adicionaron sustancias amortiguadoras como la yema de huevo con citrato de sodio, elementos crioprotectores como el glicerol y varios antibióticos como penicilina, estreptomina y polimixina para el control de las enfermedades venéreas y se utilizaron de manera comercial en diversos países (Ombeletl, 2015).

La mezcla de yema de huevo con citrato de sodio, desarrollada por Salisbury en 1941, permitió el uso de semen a 5°C hasta por tres días y la adición de glicerol a los medios de extensión que Polge y colaboradores probaron en 1949, permitió por primera vez la congelación exitosa de semen de toro y ave (Foote, 2002).

Otras mezclas de diluyentes para semen congelado se desarrollaron en la década de los 50's adicionando glicerol y leche descremada o leche entera y su uso perdura en la actualidad. En la década de los 60's, la Universidad de Cornell mejoró los diluyentes a base de yema de huevo y creó un diluyente propio (CUE, Cornell University Extender) que vino a incrementar sustancialmente las tasas de fertilidad obtenidas hasta entonces con el uso de la inseminación artificial en bovinos. En 1963 Davis desarrolló un diluyente a base de yema de huevo tamponada más Tris-glicerol para espermatozoides frescos y congelados, que se utilizó más adelante en semen de muchas especies animales (Reggio, 1999; Foote, 2002).

El desarrollo de los diluyentes para la conservación del semen en estado líquido se fortaleció con Salisbury en la década de los 70's quien mezcló ácido caproico, catalasa y 5% de yema de huevo, para generar un diluyente efectivo para la conservación de los espermatozoides bovinos a la temperatura ambiente de Nueva Zelanda (Hafez, 2000; Foote, 2002; Galina, 2006; Ombeletl, 2015). Con base en los resultados obtenidos con semen de bovinos, al mismo tiempo a nivel mundial se inició el desarrollo de mezclas de diluyentes para semen de diferentes especies animales, para conservarlo en estado fresco o congelado, de los cuales muchos se continúan utilizando.

### **2.3.1. Características del diluyente.**

El diluyente, además de ser el medio por el cual se extiende el volumen de un eyaculado, debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática; brindarle protección frente al shock térmico provocado por la refrigeración o congelación y el posterior retorno a la temperatura corporal a que es sometida; controlar y mantener el pH y la presión osmótica del medio para mantener su homeostasis; e inhibir el desarrollo microbiano en el semen (Gadea, 2007).

La energía proporcionada por el diluyente permite mantener el metabolismo del espermatozoide y generar el movimiento de su flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas (Hafez, 2000; Julca, 2014).

La integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides se consigue con la adición de sustancias lipídicas al diluyente, las que le confieren una función de protección frente a los cambios de temperatura (Reggio, 1999; Hafez, 2000; Ombeletl, 2015).

El pH óptimo de un diluyente depende de la naturaleza del mismo y de los iones que contiene pero normalmente se sitúa en la neutralidad (pH = 7). Para mantener esta condición es necesaria la presencia de soluciones tampón que deben tener las siguientes características: un valor de pH entre 6 y 8 (preferentemente 7), máxima solubilidad en agua, han de atravesar selectivamente la membrana plasmática, reducir el efecto de la concentración de sales, tener propiedades quelantes, ser estables y resistir la degradación enzimática (Graham, et al., 1978; Cuenca, 2017).

Para regular la presión osmótica dentro y fuera de la célula espermática, se utilizan en los diluyentes sales inorgánicas que le confieren propiedades coligativas a sus disoluciones (Julca, 2014).

La adición de antimicrobianos a los diluyentes previene la proliferación de gérmenes, que pueden interferir en la conservación del semen (Montenegro, 2013; Ombeletl, 2015).

### **2.3.2. Tipos de diluyentes de semen de animales domésticos.**

Para las diferentes especies animales se han desarrollado mezclas de diluyentes específicos, que permiten la conservación del semen por periodos de tiempo más prolongado tanto en estado fresco como congelado, los cuales se elaboran con ingredientes naturales o sintéticos y que, dependiendo del tipo de conservación que se requiera, varían en el número de ingredientes que los constituyen siendo mayor a

medida que se requiere la conservación del semen por periodos de tiempo más prolongado como en el caso de la congelación, en donde la célula espermática se ve sometida a procesos de enfriamiento, congelación y descongelación.

#### 2.3.2.1. Para la conservación del semen en estado fresco o refrigerado.

Este tipo de conservación mantiene el semen viable a temperatura ambiente o en temperaturas de refrigeración por poco tiempo, utiliza diluyentes de corta duración que contienen ingredientes naturales (solos, combinados o suplementados), cuyas mezclas previenen el shock térmico de los espermatozoides. Los ingredientes más utilizados son (Evans, 1990; Foote, 2002; Salomon, 2000; Muiño, 2007) (Dinatolo, 2011; Gonzalez, 2013; Diaz, et al., 2014; Suárez, 2015; Vaca, 2017):

- **Yema de huevo fosfatada.** Es una mezcla de agua destilada y yema de huevo.
- **Yema de huevo citrada.** Contiene citrato de sodio, agua destilada y yema de huevo.
- **Yema de huevo, glicina o glicocola y glicerina.** Es una mezcla de los tres ingredientes en cantidades iguales.
- **Yema de huevo y áloe.** Contiene una cantidad significativa de algunos minerales como el calcio, magnesio, fósforo, potasio, zinc y cobre.
- **Leche de vaca.** En condiciones de campo el diluyente del semen más fácilmente aceptable es la leche de vaca, que se puede utilizar tanto entera, como descremada o en polvo para reconstituir, siempre que se vaya a proceder a la inseminación artificial cervical o vaginal. En algunos lugares también se utiliza leche UHT (tratada a temperatura muy alta), que tiene la propiedad de conservarse mejor. Este producto es estéril, no precisa esterilización y, a diferencia de otras formas de leche, se puede utilizar directamente como diluyente.

#### 2.3.2.2. Para la conservación del semen en congelación.

Este tipo de conservación mantiene el semen viable a temperatura de congelación por un periodo de tiempo muy prolongado. Utiliza diluyentes de larga duración constituidos por ingredientes crioprotectores naturales y artificiales, sustancias amortiguadoras, iones, antioxidantes, enzimas y antibióticos (Gonzalez, 2013; Suárez, 2015; Vargas, 2015).

La yema de huevo en combinación con sustancias tamponadas como el tris-hidroximetilaminometano) y citrato de sodio son los principales constituyentes de los diluyentes para la congelación (Evans, 1990; Borges, 2003; Martínez, 2005), los que pueden adicionarse con glicerol, ácido cítrico o carbohidratos (Muiño, 2007).

#### 2.3.2.3. Diluyentes comerciales.

##### *Bovinos.*

El diluyente Tris-yema de huevo es el más utilizado a nivel mundial para el semen de los bovinos conservado a temperatura de congelación (Borges, 2003) Tardif Farell citado por (González, 2013). Otros diluyentes en el mercado son el IMV, el Triladyl, el Diladyl y el Andromed, a base de lecitina de soya (Gonzalez, 2013).

##### *Ovinos y Caprinos.*

El diluyente más utilizado en esta especie es el Tris-Yema de Huevo, pero se comercializan también el Laiciphos, CUE (Cornell University Extender), Spermasol, Dilopten, Neoseminan e IVT (Illini Variable Temperature) para diluir semen fresco, Ovine Fresh para semen refrigerado y Ovine Freezing, Spermasol con yema de huevo e IVT con yema de huevo para semen congelado (Leboeuf, 2000; Santiani, 2003).

##### *Conejos.*

El diluyente a base de leche descremada reconstituida más utilizado en la refrigeración de semen de conejo es el de Corteel, con buenas propiedades

conservantes a una temperatura de +15°C, aunque se muestra ineficaz a 5°C (Vaca, 2017).

### *Porcinos.*

A nivel práctico de acuerdo a las condiciones de producción, los diluyentes para semen de cerdo se clasifican en dos grandes grupos, los que tienen como objetivo la conservación del semen a **corto plazo** (1-3 días) o aquellos que tienen como objetivo la conservación del semen por más de 4 días considerados como diluyentes **a largo plazo** (Rueda, et al., 2009)

Los diluyentes de corto plazo se utilizan principalmente en lugares donde la distribución de las dosis seminales es a corta distancia y conservan el semen entre 15 y 20°C (Cuenca, 2017). Entre éstos se incluyen al Citrato de sodio-Yema de huevo, la Yema de huevo-Glucosa y a la leche descremada líquida o en polvo (Cuenca, 2017).

Los diluyentes de largo plazo se utilizan en zonas donde el lugar de producción seminal y el lugar donde el semen va a ser utilizado es distante. Son muy complejos en su constitución y requiere ciertas exigencias en cuanto a la fracción seminal que se va a mezclar, tipo de agua destilada para dilución, control elevado de la contaminación bacteriana utilizando un antimicrobiano no espermicida y una refrigeración entre 15-17°C (Leon, 2006; Coz Le, 2007; Rueda, et al., 2009; Cuenca, 2017). Entre éstos se incluyen al BTS, Kiev, Zorlesco y Modena (Aleman, et al., 2007; Coz Le, 2007; Cuenca, 2017; Hernandez, 2009).

### **2.3.3. Elección del diluyente adecuado.**

Algunas de las características a considerar en la elección del diluyente más adecuado para cualquier especie animal son: la relación entre su precio y calidad, la temporada del año determinada por la temperatura ambiente y el fotoperiodo, el tiempo y las condiciones del transporte de semen, así como el tiempo transcurrido entre la producción de la dosis seminal y la inseminación (Maqueda, 2012).

Debe seleccionarse un diluyente de composición más o menos compleja pero con un buen poder tamponador para mantener las condiciones de pH y que proporcione los azúcares necesarios para la supervivencia de las células así como otros elementos más complejos que permitan asegurar una duración más o menos larga (Coz Le, 2007). Cuenca (2017) resume lo anterior al mencionar que lo que marca la diferencia al momento de obtener un diluyente, son los sistemas tampón y los compuestos que se añaden para estabilizar las membranas de células espermáticas.

#### **2.4. Características del Agua de Coco.**

El coco es el fruto de la palmera cocotera (*Cocos nucifera L.*) que pertenece a la familia de las palmáceas (Calderón, 2015), madura a los 6 meses de edad y a partir de ese momento presenta la parte comestible de la fruta, carne de coco y agua de coco, que provienen del proceso de celularización del tejido del endospermo, que a diferencia de otras plantas, el endospermo no llena toda la cavidad del saco embrionario sino que deja una cavidad llena de líquido (Yong, et al., 2009).

El agua de coco, solución natural y estéril, ligeramente ácida, se considera una bebida isotónica natural que tradicionalmente se usa como un suplemento de crecimiento en el cultivo/micropropagación de tejidos vegetales por su composición química única de azúcares, vitaminas, minerales, aminoácidos y fitohormonas provenientes del apoplasto de la semilla (pared celular circundante). Otros componentes en el agua de coco incluyen alcoholes de azúcar, lípidos, compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos y enzimas que desempeñan diferentes funciones en los organismos vegetales y animales (Díaz, 2002; Yong, et al., 2009; Vargas, 2015; Rodríguez & Mera, 2017).

Se ha observado que el perfil nutricional del agua de coco sufre variaciones significativas de acuerdo con la variedad de la especie cultivada, la composición del suelo donde se cultiva la planta y el estado de maduración del fruto, es decir, entre frutos jóvenes (alrededor de 6 meses de edad, 206-565 gramos de peso) y maduros (alrededor de 12 meses de edad, 393 gramos de peso), como se muestra en las

Tabla número 2 y 3 (Diaz, 2002; Yong, et al., 2009; Camara, et al., 2011; Rodriguez & Mera, 2017). Otra variación en la edad del fruto se refiere a que el volumen de agua en el coco disminuye y el sabor y la composición química se alteran, a medida en que el fruto es más maduro (Aragao, et al., 2001).

Tabla 2. Análisis proximal del agua de coco.

COMPONENTE	TIPO DE FRUTO	
	JOVEN (g/100 g)	MADURO (g/100 g)
Humedad	94.18-94.99	94.45
Materia seca	5.01-5.82	5.55
Proteína total	0.12-0.72	0.52
Carbohidratos	3.71-4.76	4.41
Extracto etéreo (lípidos totales)	0.07-0.2	0.15
Fibra dietética, total	1.1	---
Cenizas	0.39-0.87	0.47
Valor energético	19 Kcal (79 KJ)	---

Fuente: Yong, et.al., 2009.

Además de los nutrientes indicados en la tabla 3, el agua de coco contiene sustancias promotoras de crecimiento como las citoquininas (una especie de fitohormonas) y enzimas como fosfatasa ácida, catalasa, deshidrogenasa, peroxidasa y ARN polimerasas, que le confieren ampliar las posibilidades de su uso en tejidos vegetales y animales (Yong, et al., 2009).

Tabla 3. Composición química del agua de coco.

COMPONENTE	TIPO DE FRUTO	
	JOVEN	MADURO
Azúcares (g/100 g):		
Totales	2.61-5.23	3.42
Sacarosa	0.06	0.51
Glucosa	2.61	1.48
Fructosa	2.55	1.43
Alcoholes de azúcar (mg/l):		
Manitol	---	0.80
Sorbitol	---	15.00
Mioinositol	---	0.01
Escilo-inositol	---	0.05
Iones inorgánicos (mg/100 g):		
Calcio	24-27.35	31.64
Hierro	0.02-0.29	0.01-0.02
Magnesio	6.40-25	9.44-30
Fósforo	4.66-20	12.77-37
Potasio	203.70-250	257.52-312
Sodio	1.75-105	16.10-105
Zinc	0.07-0.1	0.02
Cobre	0.01-0.04	0.03-0.04
Manganeso	0.12-0.142	0.08
Selenio	0.001	---
Cloro	---	183
Azufre	0.58	---
Aluminio	0.07	0.06
Boro	0.05	0.08

Continuación tabla 3.

COMPONENTE	TIPO DE FRUTO	
	JOVEN	MADURO
Vitaminas:		
Vitamina C, ácido ascórbico	2.4 mg/100 g	7.08 mg/100 dm <sup>3</sup>
Tiamina (B1)	0.03 mg/100 g	0.01 mg/100 dm <sup>3</sup>
Ribiflavina (B2)	0.057 mg/100 g	0.01 mg/100 dm <sup>3</sup>
Niacina (B3)	0.08 mg/100 g	0.64 mg/l
Ácido pantoténico (B5)	0.043 mg/100 g	0.52 mg/l
Piridoxina (B6)	0.032 mg/100 g	---
Ácido fólico	0.003 mg/100 g	0.003 mg/l
Biotina	0.02 mg/100 g	0.02 mg/l
Ácido nocotínico (niacina)	0.64 mg/100 g	0.64 mg/l
Lípidos (g/100 g):		
Total	0.03-0.2	0.1482
Ácidos grasos saturados	0.0733-0.176	0.1
Ácidos grasos monosaturados	0.008-0.3	0.02
Ácidos grasos poliinsaturados	0.002-0.0128	0.0054
Aminoácidos (µg/ml):		
Alanina	16.40	177.10-312
β-alanina	---	12
Ácido γ-aminobutírico	1.90	168.80-820
Arginina	14.70	16.80-133
Asparagina y glutamina	---	60
Ácido aspártico	11.30	5.40-65
Asparagina	17.10	10.40
Cistina	---	0.97-1.17
Ácido glutámico	9.40	78.70-240
Glutamina	80.00	13.40
Glicina	1.30	13.90
Homoserina	---	5.2

Continuación.

COMPONENTE	TIPO DE FRUTO	
	JOVEN	MADURO
Histidina	3.50	Traza
Isoleucina	---	18
Leucina	6.20	22-31.70
Lisina	4.40	22.50-150
Metionina	3.50	8
Ornitina	---	22
Fenilalanina	---	10.20-12
Prolina	4.10	21.60-97
Serina	7.30	65.80-111
Tirosina	0.90	3.1-16
Triptófano	---	39
Treonina	2.90	26.30-44
Valina	5.60	15.10-27
Hidroxiprolina	Traza	Traza
Ácidos orgánicos (meq/ml):		
Málico	9.36	11.98-34.31
Cítrico	---	0.31-0.37
Piridolina	0.43	0.18
Succínico	---	0.28
Fitohormonas (mg/l):		
Auxin	---	0.07
1,3-Difenilurea	---	5.8
Propiedades químicas:		
pH	4.6-5.6	5.2±0.1

Fuente: Yong, et.al., 2009.

Algunos de los componentes más importantes y útiles del agua de coco son las citoquininas (una clase de fitohomas) (Kende y Zeebaart (1997) citados por Yong, et

al., 2009) y los azúcares (Rodríguez & Mera, 2017) los cuales al inicio de la maduración, se presentan en forma de azúcares reductores (glucosa y fructosa), cuyas concentraciones alcanzan niveles máximos del 5%, próximo al 6º y 7º mes, período en que la cantidad de agua también es mayor. Con la maduración, la concentración de azúcares reductores disminuye hasta un 1%, pero se forman azúcares no reductores (sacarosa), siendo al final de la maduración el contenido de azúcares totales de aproximadamente el 2% (Magalhaes, et al., 2005).

Los segundos constituyentes en términos de cantidad son los minerales. Solo representan del 0,4% al 1% del volumen de líquido, pero sin embargo contribuyen a sus propiedades isotónicas (Prades, et al., 2011). El contenido mineral del agua de coco sufre modificaciones durante el período de proceso de maduración del fruto: mientras que el potasio es el electrolito más abundante, el sodio se incrementa, el calcio, el magnesio, el cloro, el hierro y el cobre se presentan estables durante este proceso y el azufre tiene un lento incremento (Aragao, et al., 2001).

Srebernich citado por (Carvalho, et al., 2006) afirma que el principal ácido orgánico presente en el agua de coco es el ácido málico. Los ácidos orgánicos, como el succínico y el cítrico, son relativamente constantes (Aragao, et al., 2001). Otros ácidos están presentes, pero representan muy poco en la composición del agua de coco (Carvalho, et al., 2006).

Los principales aminoácidos encontrados en el agua obtenida de frutos frescos son la alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido glutámico y serina, con un 75% de aminoácidos libres. En frutos maduros la alanina es el más abundante (Aragao, et al., 2001). Según Mondai et al. (1970) (citado por (Aragao, et al., 2001), el valor proteico del agua de coco gira alrededor del 2.5%.

El agua de coco no es una fuente rica en vitaminas, pero contiene ácido ascórbico (vitamina C) y vitaminas del complejo B (Atukorale, 2001). Según Tavares et al. (1998), (citado por (Carvalho, et al., 2006) el agua de coco con seis meses de

maduración, puede ser considerada como buena fuente de vitamina C. Las vitaminas contenidas en ella son el ácido nicotínico, el ácido pantoténico, la biotina, la riboflavina y el ácido fólico (Aragao, et al., 2001).

El agua de coco tiene aceite en emulsión estabilizado por proteínas coloidales (Carvalho, et al., 2006) aunque Pehowich et al. (2000), citado por (Carvalho, et al., 2006) afirman que el contenido de lípidos en el agua de coco es bajo.

Así como la composición química del agua de coco puede verse afectada por la especie, la edad y el sitio donde se desarrolló la planta, la temperatura de conservación afecta la calidad de este producto, conservándose mejor a una temperatura de refrigeración (4°C) sin afectar su sabor (Zhou, 2013).

## **2.5. Usos del agua de coco.**

Hasta el 2011, las investigaciones sobre el agua de coco se enfocaban en tres aspectos: a) determinar su uso, sobre todo a nivel medicinal (10%), b) conocer su composición química (50%) y c) identificar técnicas para su conservación (40%) (Prades, et al., 2011). Después de esa fecha, los estudios se han enfocado hacia los usos potenciales del agua de coco.

A pesar de que ha sido ampliamente estudiada, desde su introducción a la comunidad científica en la década de los 40's, el agua de coco es, en su forma natural, una bebida rehidratante, refrescante y nutritiva para consumo humano a nivel mundial. Sin embargo, por sus características fisicoquímicas se le han conferido otras muchas funciones; algunas de ellas son (Aragao, et al., 2001; Martínez, 2005; Yong, et al., 2009; Prades, et al., 2011; Vargas, 2015):

- ✓ Rehidratar vía oral a pacientes y a personas que hayan realizado ejercicio físico.

- ✓ Hidratar vía intravenosa a pacientes en situaciones de emergencia.
- ✓ Proteger contra el infarto del miocardio.
- ✓ Controlar la hipertensión arterial.
- ✓ Promover y regular el crecimiento de tejidos vegetales.
- ✓ Fortalecer al sistema antioxidante de plantas y animales.
- ✓ Potenciar los efectos antienvjecimiento, anticancerígeno y antitrombótico en plantas y animales.
- ✓ Ser un aditivo en medios de cultivo de tejidos vegetales, incluidas las hierbas medicinales.
- ✓ Favorecer el crecimiento microbiano (especialmente de *Acetobacter xylinum*).
- ✓ Servir como medio de purificación y símbolo religioso (Asia).
- ✓ Ser procesado como vinagre o como vino.
- ✓ Contribuir a tratar enfermedades neuronales, gastrointestinales, oculares, urinarias y reproductivas.
- ✓ Incrementar la cantidad de semen en humanos.
- ✓ Proteger a las células espermáticas de diferentes especies animales durante su criopreservación.
- ✓ Incrementar la viabilidad y fertilidad espermáticas.

## **2.6. Usos del agua de coco como diluyente de semen.**

En los procesos tecnológicos de la inseminación artificial, el desarrollo de un diluyente que mantenga la viabilidad de la célula espermática por un período mayor de tiempo (en condiciones de refrigeración o criopreservación) es un requisito indispensable para la conservación del semen de diversas especies. En virtud de las características fisicoquímicas que posee, el agua de coco ha mostrado tener un gran potencial como diluyente de semen de animales domésticos (Barros & Toniolli, 2011) (Chávarri, 2017), incluso su uso alternativo como suplemento en diluyentes con poca cantidad de fosfolípidos demostró que el agua de coco mejoró las características del semen in vivo e in vitro y su fertilidad (Díaz, et al., 2014).

Las investigaciones en animales domésticos sobre el uso del agua de coco como diluyente de semen, comenzaron a tomar fuerza a finales de la década de los 80's, con el desarrollo de diluyentes para conservar la viabilidad de los espermatozoides de carnero a temperatura de refrigeración (Viveiros, 2008).

La mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el agua de coco, parece estar asociada a las sustancias químicas que contiene, esa sustancia, es un factor físico químico que parece favorecer la motilidad del semen (Nunes, 1993).

La habilidad del agua de coco en la sobrevivencia espermática, es también atribuida en gran parte a una inhibición reversible del ácido láctico del esperma, manifestado por una disminución en el metabolismo celular, en términos de respiración, glucólisis anaerobia y motilidad (Martínez, 2005), que aunado a la baja cantidad de fosfolipasa "A" que presenta el agua de coco, la hacen una excelente opción para el congelamiento de semen (Trigoso, 2017).

En términos generales y en virtud de su potencialidad, el agua de coco ha sido probada como diluyente en diferentes formas (Barros & Toniolli, 2011):

- a) Natural. Diluyente constituido por 50% de agua de coco filtrada, 25% de agua destilada y 25% de una solución de citrato de sodio al 5%.
- b) Estabilizada. Diluyente natural envasado, esterilizado por ultrafiltración y mantenido en refrigeración.
- c) Liofilizada. Diluyente para congelación al cual se le retira el agua por sublimación.
- d) En forma de gel.
- e) En polvo. En donde el agua de coco se deshidrata mediante la técnica de "spray seco".

El principal factor limitativo para el uso del agua de coco en forma natural, en las regiones donde el fruto se produce o distribuye, es sin duda la imposibilidad de

conservarlo por largos periodos, mientras que cuando se utiliza en forma estabilizada el factor limitativo es el espacio para almacenar las dosis seminales de 500 ml, por lo que varios investigadores se centraron en el desarrollo del diluyente en forma de polvo, facilitando así su almacenaje y distribución (Barros & Toniolli, 2011).

### **261. Agua de coco en diluyentes para la conservación de semen en estado fresco.**

Uno de los factores que determinan el éxito de la inseminación artificial en fresco es el uso de diluyentes naturales o sintéticos que permiten el fraccionar el eyaculado en varias dosis y manteniendo la viabilidad de los espermatozoides (Trejo, et al., 2013; Milton, 2017).

#### *Caprinos.*

Se ha demostrado que la fertilidad de cabras que fueron inseminadas con semen diluido en agua de coco, fue superior a la observada en cabras inseminadas con semen diluido en leche, además de que se obtuvo un mayor número de crías por hembra (Nunes, 1993).

Un estudio *in vitro* demostró resultados favorables en la conservación de la motilidad progresiva y de la motilidad total, cuando el semen fue diluido en agua de coco natural, comparado con semen diluido en leche (Nunes, 1995; citado por Barros y Toniolli, 2011).

#### *Ovinos.*

Cuando se utilizó el agua de coco en forma natural como diluyente del semen de ovinos, en muestras de semen incubadas en baño maría a 37°C en diferentes periodos de tiempo, se observó que fue superior a la leche descremada en el mantenimiento de las características seminales de porcentaje de motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides móviles (Nunes, 1997; citado por Barros y Toniolli, 2011).

El agua de coco en polvo y reconstituida fue probada como diluyente de semen de carneros, registrando valores de 60% de motilidad espermática cuando fue conservado a una temperatura de 14°C y valores de 48% de motilidad progresiva y 88.5% de gestaciones, con semen conservado a 4°C (Salgueiro et.al., 2007; citado por Barros y Toniolli, 2011).

En el caso de los ovinos, se hacen necesarias más investigaciones para incrementar el tiempo de conservación del semen con el mantenimiento de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Leboeuf, 2000).

#### *Porcinos.*

La solución a base de agua de coco es un medio rico en nutrientes, de bajo costo, que ha sido utilizado con experimentos para la conservación de semen porcino *in vitro* (Julca, 2014). Cuando se utilizó en forma natural o estabilizada, se obtuvieron valores superiores de motilidad progresiva en relación a los obtenidos con un diluyente comercial (BTS) a los 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación a 37°C (Toniolli et. al., 1998; citado por Barros y Toniolli, 2011).

El uso del agua de coco en polvo y reconstituida se evaluó en semen de verracos, comparando sus características con el semen diluido en BTS. Los resultados *in vitro* fueron superiores para el vigor y la motilidad espermática en el caso del diluyente con agua de coco (4.1 y 91%), sin embargo, en los resultados de fertilidad y prolificidad el diluyente comercial fue superior obteniendo 10% más de fertilidad y 1.8 lechones más por camada (Toniolli et. al., 2010; citado por Barros y Toniolli, 2011).

Al evaluar las características del semen de cerdo diluido en agua de coco natural y conservado a 16°C por 24hrs, Julca (2014) registró una motilidad espermática de 63.33% con una viabilidad del 55% de los espermatozoides.

El porcentaje de espermatozoides vivos y muertos evaluado a las 12 horas post dilución del semen fresco de cerdo diluido con agua de coco natural, tuvo valores muy aceptables para considerar el semen apto para la inseminación artificial (90% de vivos, 10% de muertos) incluso hasta las 36 horas post dilución donde se observaron

valores de 80% de espermatozoides vivos y un 20% de muertos, lo que evidencia los beneficios del agua de coco sobre las células espermáticas (Aguilar, 2015).

Uno de los aspectos importantes que resulta de la investigación con agua de coco como diluyente para semen fresco de cerdo, es que no afecta su fertilidad en términos del número de lechones nacidos vivos (Rosero, et al., 2018).

#### *Caninos.*

Cuando se diluyó semen de perro en agua de coco natural se observó un mantenimiento de la motilidad y del vigor espermáticos, en cantidades aceptables, aún después de 180 minutos (Uchoa et. a., 2002; citado por Barros y Toniolli, 2011).

Un estudio sobre el índice de gestación en perras demostró las bondades del agua de coco en estado natural como diluyente de semen refrigerado al registrar hasta el 90% de tasas de preñez, comparado con el 50% cuando el medio de dilución fue a base de leche descremada (Betini et.a., 2001; citado por Barros y Toniolli, 2011).

#### *Conejos.*

Según lo reportado en un estudio realizado en conejas, comparando el uso del agua de coco natural como diluyente y un extensor comercial (MBO), la fertilidad observada utilizando semen fresco en la inseminación artificial fue de 88% para el agua de coco y de 80% para el MBO. El número de gazapos obtenidos fue de 8.89 cuando se utilizó el agua de coco y 7.44 con el MBO. Lo que señala la superioridad del agua de coco para mantener las cualidades del semen fresco en esta especie (Trejo, et al., 2013).

De acuerdo a Rosero, et.al. (2018), el uso de los diluyentes naturales para semen fresco de conejo en el proceso de la inseminación artificial, mejora los índices productivos y la valoración seminal hasta los 120 minutos postdilución; así como también muestra un mejor desempeño sobre algunos indicadores reproductivos como la tasa de concepción, el número de crías, la motilidad y la viabilidad espermática.

### *Bovinos.*

Para esta especie se han desarrollado muchos tipos de diluyentes y aún se están haciendo estudios tendientes al mantenimiento de valores aceptables en las características de los espermatozoides destinados a la inseminación artificial, observados después de un tiempo prolongado de dilución, tales como el color, olor, pH y volumen de semen, la motilidad espermática masal e individual y la tasa de espermatozoides vivos y muertos en una muestra de semen. El agua de coco natural es considerado un diluyente beneficioso para el semen de bovino ya que se han observado porcentajes de espermatozoides viables del 80% o superior (Julca, 2014; Trigos, 2017).

### *Especies silvestres.*

La conservación de los espermatozoides de monos capuchinos (*Cebus apella*) en estado fresco por 5 horas, mediante la dilución de semen en agua de coco adicionada con cafeína, permitió observar un incremento en la motilidad espermática de 0.5% y hasta 6% en las muestras con 6 y 10 mM/ml de cafeína, respectivamente. por lo que este tipo de diluyente puede ser de utilidad en la inseminación de monos capuchinos con semen fresco (Oliveira, 2011).

En Gallinas de Guinea (*Numida meleagris*), se evaluó el porcentaje de motilidad, el vigor y la morfología de los espermatozoides conservados a temperaturas de 4 o 15°C por 0, 2 y 24 horas, diluidos en agua de coco en polvo y rehidratada o en un medio comercial. Los resultados no mostraron efecto de los tratamientos sobre las variables estudiadas al momento de la dilución, sin embargo, a las 2 y 24 horas de conservación sólo en el tratamiento con agua de coco a 4°C, las variables espermáticas estudiadas tuvieron valores superiores a los aceptados comúnmente (Rondon, 2008).

## **262 Agua de coco en diluyentes para la conservación de semen en estado congelado.**

### *Ovinos y Caprinos.*

El agua de coco ha sido utilizada como diluyente durante la conservación de semen de ovino y caprino (Trejo, et al., 2013). Se ha demostrado que el uso de agua de coco *in vivo* e *in vitro* favorece la conservación del semen caprino y su fertilidad ya que parece bloquear la acción de la fosfolipasa "A", presente en el plasma seminal, sobre los fosfolípidos celulares y con ello reduce el efecto tóxico para los espermatozoides, favoreciendo su tolerancia a la congelación (Nunes, 1993) lo cual se traduce en un incremento de la movilidad y de la viabilidad postdescongelación de los espermatozoides, en relación con otros diluyentes naturales (Trejo, et al., 2013; Rosero, et al., 2018).

### *Caninos.*

El agua de coco en polvo, reconstituída y adicionada con 20% de yema de huevo y 6% de glicerol, como diluyente de semen canino, se comparó contra el semen diluido en agua de coco natural, adicionada con las mismas concentraciones de crioprotectores. Después de un periodo de congelación y descongelación, ambas muestras tuvieron resultados similares para las variables analizadas de motilidad y vigor espermático (Cardoso et. al., 1998; citado por Barros y Toniolli, 2011).

Otra investigación que evaluó el efecto del agua de coco natural adicionada con 20% de yema de huevo y 6% de glicerol, pero utilizando dos métodos de dilución distintos (1:1 semen-diluyente vs  $200 \times 10^6$  esp/ml de diluyente), concluyó que la motilidad y el vigor de las células espermáticas, así como el número de gametos normales después de la descongelación, fueron similares entre ambos tratamientos (Soares, 2006). En un experimento anterior muy similar, Cardoso y colaboradores demostraron el potencial del agua de coco como conservador del semen canino, pero pusieron de manifiesto la necesidad de realizar inseminaciones para probar la capacidad de fertilización del semen congelado y descongelado (Cardoso, 2005).

Cuando se comparó el efecto de la adición de glicerol al agua de coco con yema de huevo en concentraciones de 4, 6 y 8%, para la dilución y conservación del semen de perros, no se observaron diferencias significativas entre los grupos para las características de motilidad y vigor de los espermatozoides descongelados, sin embargo se reportó un ligero incremento en los porcentajes de anomalías totales y secundarias en los espermatozoides de la muestra de semen adicionado con 6% de glicerol (Soares, 2003).

#### *Felinos.*

También el agua de coco en polvo, reconstituída y adicionada con 20% de yema de huevo y 6% de glicerol, se utilizó en la criopreservación del semen del gato doméstico con buenos resultados postdescongelación para porcentaje de motilidad ( $69.5\% \pm 21.4\%$ ) y vigor ( $3.8 \pm 0.7$ ) espermáticos. En este caso, la adición del 20% de yema de huevo causó una alteración en la viscosidad del diluyente porque no se pudo disolver totalmente (Silva et. al., 2007; citado por Barros y Toniolli, 2011).

#### *Peces.*

En un estudio realizado con semen de tres especies de peces, donde se comparó el efecto del agua de coco en polvo (ACP™) reconstituída y adicionada con criopreservadores (metilglicol o dimetil-sulfoxido), contra un medio estándar para la congelación del semen, se concluyó que el agua de coco en polvo puede utilizarse como un diluyente crioprotector ya que mantiene por arriba de 60 el porcentaje de espermatozoides móviles después de la descongelación (Viveiros, 2008).

En otro experimento similar donde se utilizó el agua de coco en polvo (ACP™) reconstituída y adicionada con metilglicol, se observaron porcentajes de motilidad superiores a 80 en espermatozoides descongelados (Viveiros, 2010).

### *Especies silvestres.*

La criopreservación de los espermatozoides extraídos directamente del epidídimo (Silva, 2011) o una vez eyaculados (Silva, 2012), mediante el uso de diluyentes a base de agua de coco en polvo, yema de huevo y glicerol también ha sido utilizada en especies silvestres como el Pecarí de Collar (*Tayassu tajacu*) y el Agouti (*Dasiprocta aguti*); las características evaluadas fueron motilidad, vigor, viabilidad, morfología e integridad de la membrana de los espermatozoides, después de la descongelación, cuyos resultados demostraron que estos tipos de diluyentes son efectivos para la conservación de las características seminales por periodos de tiempo prolongados.

### 3. CONCLUSIONES

El agua de coco es un material natural que, por sus características fisicoquímicas, puede ser usado como diluyente del semen en varias especies animales, para conservarlo en estado fresco o congelado.

Por su bajo costo y facilidad de acceso, este tipo de diluyente natural representa una opción para los propietarios de pequeñas unidades de producción animal que estén interesados en aplicar la técnica de inseminación artificial en sus animales.

Son pocas las especies animales en las que se ha probado su efectividad como extensor y conservador de semen por periodos prolongados.

A pesar de que todavía no se comercializa en nuestro país, los resultados de las investigaciones demuestran las bondades del agua de coco como extensor y preservador del semen de diferentes especies animales, en estado fresco y congelado.

Se hace necesario plantear diseños experimentales en torno al uso del agua de coco como diluyente de semen, que incluya entre otras cosas, un mayor número de especies animales, el efecto del plasma seminal sobre el agua de coco, un comparativo de costos entre diluyentes, varias formas de almacenamiento del diluyente y de las dosis seminales, los efectos de los factores físicos y bióticos del medio ambiente sobre las dosis de semen y la identificación de factores que puedan limitar su uso, entre otras.

## 4. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, J., 2015. Evaluación Del Agua De Coco Como Diluyente Natural En Inseminación Artificial En Cerdas (Tesis Licenciatura).Guatemala: S.N.

Aleman, D., Alfaro, M. 2007. Efecto De La Temperatura Del Semen Sobre La Respuesta Reproductiva De Cerdas.[En Línea] Available At: <Http://Albeitar.Portalveterinaria.Com/Noticia/3597/Articulosporcino-Archivo/Efecto-De-La-Temperatura-Sobre-La-Respuesta-Reproductiva-De-Cerdas.Html> [Último Acceso: 20 Enero 2019].

Aragao, M., Isberner, V.,Cruz, E. 2001. Agua De Coco. 1° Ed. S.L. Embrapa. Atukorale.D.Features.[EnLínea]AvailableAt:<Http://Www.Infolanka.Com/Org/Srilanka/Food/7.Htm> [Último Acceso: 27 Febrero 2019].

Ballesteros, J., Meza, B. Gurrola, G. Y. F. 2017. Inseminación Artificial Animal: Historia Y Evolución. Primera Ed. S.L.:Utp.

Barros, T. & Toniolli, R. 2011. Uso Potencial Da Água De Coco Na Tecnologia De Sêmen. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, 35(4), Pp. 400-407.

Borges, J., 2003. Utilização De Antioxidantes Associados Ou Não A Emulsificante Na Criopreservação De Sêmen Bovino. (Tesis Licenciatura). Minas Gerais-Brasil: S.N.

Calderón, A. 2015. “Desarrollo De Una Bebida Hidratante Elaborada A Base De Agua De Coco Y Suero De Leche Siguiendo La Normativa Para Bebidas Isotónicas (Tesis Licenciatura).Guayaquil-Ecuador: S.N.

Camara, R. Y Otros, 2011. Análise Microbiológica E Proteica Da Água De Coco Em Pó (Acp) Esterilizada Por Membrana Para Uso Em Processos Biotecnológicos. Revista Portuguesa De Ciencias Veterinarias, 106(1), Pp. 577-580.

Cárcano, J. Y Otros. 2016. Manual Del Inseminador. Las Sillas, P. 5.

Carvalho, M., Maia, G. & Sousa, P. 2006. Água-De-Coco: Propriedades Nutricionais, Funcionais E Processamento. Semina: Ciências Agrárias, 27(3), Pp. 437-452.

Chávarri, F.2017. Determinación De La Eficiencia Del Mr- A 3 Días Y El Agua De Coco Para La Conservación De Semen Porcino (Tesis Licenciatura).Tacna-Perú: S.N.

Coz Le, P., 2007.3tres3.[EnLínea]Available At: <https://www.3tres3.com/articulos/la-dilucion-y-la-conservacion-del-semen-4032/> [Último Acceso: 2019 Enero 21].

Cuenca, C. Y. A. C. 2017. Diluyentes Utilizados En Inseminación Artificial Porcina. Redvet, 18(9), Pp. 6-7.

De La Torre Sánchez, J., Villanueva Avalos, J. Rubio Ceja, J. 1993. Manual Técnico Para Bovinos. Inifap, Issue 2, P. 2.

Díaz, D. 2002. Composición Física, Química Y Actividad Antioxidante Del Agua De Dos Variantes De Coco (Cocus Nucifera L.). (Tesis Licenciatura). Tingo María- Perú: S.N.

Díaz, P., Fonseca, V., Martínez, P. Rey, A. 2013. Inseminación Artificial En Bovinos. Biblioteca Virtual Universal, P. 5.

Díaz, J., Urriola, L., Zambano, C. Peraza, J. Y. P. 2014. Crio Preservación De Semen Ovino Con Diluyentes Convencional Y Agua De Coco-Leche Descremada. Unell.Cienc.Tec. Volumen 32, Pp. 59-64.

Dinatolo, E., 2011. Efecto De La Trehalosa En La Viabilidad De Semen Ovino Refrigerado.[EnLínea]AvailableAt:<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/greenstone/cgi-bin/library.cgi?A=D&C=Tesis&D=Efecto-Trehalosa-Viabilidad-Semen> [Último Acceso: 18 Enero 2019].

Evans, G. Y. M. 1990. Inseminación Artificial De Ovejas Y Cabras. Zaragoza: Acribia.

Foot, R. 2002. The History Of Artificial Insemination: Selected Notes And Notables. En: The History Of Artificial Insemination: Selected Notes And Notables. Ithaca N.Y: American Society Of Animal Science, Pp. 1-2.

Gadea.2003. Los Diluyentes De Inseminacion Artificial Porcina.. [En Línea] AvailableAt:<Http://Www.Agrodigital.Com/Upload/Gadea%20sjar2003-Espa%C3%B1ol.Pdf> [Último Acceso: 19 Enero 2019].

Gadea, J. 2007. Los Diluyentes De Inseminacion Artificial Porcina. [En Línea] Available At: [Http://Www.Engormix.Com/S\\_Articles\\_View.Asp?Art=281](Http://Www.Engormix.Com/S_Articles_View.Asp?Art=281)[Último Acceso: 20 Diciembre 2018].

Galina, C. 2006. Reproducción De Los Animales Domésticos. 2a Ed. México, D.F.: Limusa, S.A De C.V.

Giraldo, G. J. 2007. Una Mirada Al Uso De La Inseminación Artificial En Bovinos. Lasallista De Investigación, 4(1), Pp. 51-57.

González, L. Y. 2013. Eficiencia Comparativa Entre Dos Diluyentes Para La Criopreservación De Semen En Toros Brahmán En El Departamento De Antioquia. Bogotá-Colombia: S.N.

Graham, G. B.1978. Current Status Of Semen Preservation In The Ram, Boar And Stallion. S.L.:J. Anim. Sci., Pp. 80-119.

Hafez, E. 2000. Inseminación Artificial. En: Reproducción E Inseminación Artificial En Animales. México: Mc Graw Hill, P. 387.

Hernández, J., 2009. Evaluación De Un Nuevo Diluyente Para Semen Porcino.. Redvet, 10(4), Pp. 1-5.

Hormaechea, S., Giordano, A. Cabodevila, J. 2016. Inseminación Artificial Post Cervical En Cerdas (Tesina Licenciatura).Tandil: S.N.

Julca, A., 2014. "Conservación De Semen Porcino En Refrigeración Usando Agua De Coco Como Dilutor. En: "Conservación De Semen Porcino En Refrigeración Usando Agua De Coco Como Dilutor. Perú: S.N., P. 11.

León, V., 2006. Repositorio Digital Epn. [En Línea] Available At: <Http://Bibdigital.Epn.Edu.Ec/Bitstream/15000/2640/1/Cd-0438.Pdf> [Último Acceso: 16 Diciembre 2018].

Leboeuf, B. R. B. A. S. C., 2000. Production And Storage Of Goat Semen For Artificial Insemination. *Animal Reproduction Science*, Volumen 62, Pp. 113-141.

Magalhaes, P., Gomes.S.F, Modesta, D. & Matta, M. Y. C., 2005. Conservação De Água De Coco Verde Por Filtração Com Membrana. *Food Science And Technology* , 25(1), Pp. 72-77.

Maqueda, L. 2012. Conservación De La Calidad Del Semen: Diluyente, Empaques, Temperatura Y Transporte. [En Línea] Available At: <Http://Www.Pigsranch.Com.Ar/Modules.Php?Name=News&File=Article&Sid=23> [Último Acceso: 21 Enero 2019].

Martínez, P., 2005. Evaluación Del Agua De Coco (Cocus Nucifera), Opuntia Spp, Leche Y Sus Combinaciones Para La Criopreservación Del Semen Ovino (Tesis Maestría). Chihuahua, Chihuahua: S.N.

Milton, J., 2017. Efecto Del Uso De Dos Dilutores (Agua De Coco Y Leche Descremada) Para Viabilidad Espermática En Semen De Bovinos.(Tesis Licenciatura). Chachaponas-Amazonas: S.N.

Montenegro, V. Y. C. M., 2013. Evaluación De Dos Tipos De Diluyentes Comerciales En Semen Porcino Para Inseminación Artificial En Reproductoras De Tercer Y Cuarto Parto En El Canton Ibarra. (Tesis Licenciatura). Ibarra-Ecuador: S.N.

Morrow, D., 1986. *Current Therapy In Theriogenology 2*. Usa: W.B. Saunders Company.

Muiño, R. 2007. Universidad De Santiago De Compostela. [En Línea] At: <Https://Books.Google.Com.Ec/Books?Id=97rpdzofzdg&Pg=Pa68&Lpg=Pa68&DQ=Yema+De+Huevo+Semen&Source=Bl&Ots=ljsjx5i5dw&Sig=SzcV6tnugkhxza7sa22xmqrhai&Hl=Es&Sa=X&Ved=0ahukewiu0qw6eznahudfr4khttcjdkq6aeimdaf#V=Onepage&Q=Yema%20de%20huevo%20semen&F=False> [Último Acceso: 17 Enero 2019].

Nunes, J. 1993. El Agua De Coco Como Dilutor Del Semen Caprino. *Fcv-Luz*, 3(3).

Oliveira, K. M. 2011. Semen Coagulum Liquefaction, Sperm Activation And Cryopreservation Of Capuchin Monkey (*Cebus Apella*)

Semen In Coconut Water Solution (Cws) And Tes–Tris. *Animal Reproduction Science*, 123(1-2), Pp. 75-80.

Ombelet, W. 2010. History Of Human Artificial Insemination. En: *History Of Human Artificial Insemination*. S.L: F, V&V In Obgyn, Pp. 1-5.

Ombeletl, W. 2015. Artificial Insemination History: Hurdles And Milestones. *Facts Views*. En: *Artificial Insemination History: Hurdles And Milestones. Facts Views*. S.L: S.N. Pp. 137-143.

Ortuño, A. D. 2010. Manual de Inseminación Artificial De Ganado. En: *Manual De Inseminación Artificial De Ganado*. S.L:S.N. P. 6.

Paez, B., 2012. Universidad Nacional Abierta Y A Distancia. Escuela De Ciencias Agrícolas, Pecuarias Y De Medio Ambiente.. P. 150.

Pérez, G., 2011. Técnicas De Inseminación Artificial En Ovinos (Tesis Licenciatura). Torreón Coahuila: S.N.

Prades, A., Dornier, M., Diop, N. Pain, P. 2011. Coconut Water Uses, Composition And Properties: A Review. *Fruits*, 62(2), Pp. 87-107.

Prathima, T., Ranjani, S, And Pandiyan, N. 2015. From De Pages Of History. *History Of Semen Analyses.. Chettinad Health City Medical Journal*, 4(1), Pp. 63-64.

Reggio, E. 1999. From De First Insemination Artificial To The Morden Reproduction Biotechnoligies: Tradiotional Ways And News Frontiers Of Animal Productions.. S/N, P. 24.

Rehman, F. U. 2013. Semen Extenders Anda Artificial Insemination In Rumiants. *Openaces Journal*, 1(1), Pp. 1-8.

Rodríguez, L. & Mera, I. 2017. Agua De Coco Como Diluyente De Semen Porcino A Diferentes Temperaturas Sobre La Respuesta Reproductiva Con Inseminación Artificial En Cerdas. *Calceta:S.N.*

- Rondon, R. 2008. Uso Da Água De Coco Pó (Acp) Em Diferentes Temperaturas Como Diluyente De Espermatozoides De Capote (Numida Meleagris). Rev. Bras. Saúde Prod. An., 9(4), Pp. 848-854.
- Rosero, M., Nuñez, O. Lozada, E. 2018. Evaluación De Tres Diluyentes Naturales Para Semen Fresco De Conejo En La Inseminación Artificial. Journal Of The Selva Andina Animal Science.
- Rueda, M. 2009. Optimización De La Conservación Del Semen Porcino Con El Diluyente Cubano Dicip. Revista Computadorizada De Producción Porcina, 16(1), Pp. 26-29.
- Salomon, S. 2000. Storage Of Ram Semen.. Animal Reproduction Science, 62(1), Pp. 77-111.
- Santiani, A. 2003. Criopreservación De Semen Ovino: Efecto De La Adición De Antioxidantes Al Diluyente(.Tesis Maestría). Temuco-Chile: S.N.
- Silva, M. 2011. Recovery And Cryopreservation Of Epididymal Sperm From Agouti (Dasiprocta Aguti) Using Powdered Coconut Water (Acp-109c) And Tris Extenders. Theriogenology, 76(6), Pp. 1084-1089.
- Silva, M. 2012. Cryopreservation Of Collared Peccaries (Tayassu Tajacu) Semen Using A Powdered Coconut Water (Acp-116c) Based Extender Plus Various Concentrations Of Egg Yolk And Glycerol. Theriogenology, 78(3), Pp. 605-611.
- Suárez, S., 2015. Fertilidad De Semen Congelado De Toros Nacionales Holstein Usando Los Dilutores Leche-Yema, Tris-Yema Y Triladyl (Tesis Maestría). Lima-Perú: S.N.
- Tardif A., F. P.-T. 1997. Computer-Assited Sperm Analysis For Assessing Initial Semen Quality And Changes During Storage At 5°C. Jornal Of Dairy Science., 80(8).
- Trejo, C., Antonio, E., Cisneros, C. 2013. Agua De Coco (Cocus Nucifera) Como Diluyente Para Semen Fresco En Conejo En La Inseminación Artificial. Arch.Zootecnico, Volumen 62, Pp. 299-302.
- Trigoso, J., 2017. Efecto Del Uso De Dos Dilutores (Agua De Coco Y Leche Descremada) Para La Viabilidad Espermática En Semen Fresco De Bovinos. Chachapoyas-Perú: S.N.

Vaca, L. 2017. Evaluación De Tres Diluyentes Naturales Para Semen Fresco De Conejo (*Oryctolagus Cuniculus*) En La Inseminación Artificial. Cevallos-Ecuador: S.N.

Valencia, L. 2006. Elaboración De Diluyente De Semen Porcino. [En Línea] Available At: [Http://Bibdigital.Epn.Edu.Ec/Handle/15000/2640](http://Bibdigital.Epn.Edu.Ec/Handle/15000/2640)[Último Acceso: 20 Diciembre 2018].

Vargas, C. 2015. Efecto Del Facto Diluto Y Raza En La Integridad De La Membrana Espermatica Y Acrosomal En Semen Crioconservado De Carneros. (Tesis Licenciatura). Puno-Perú: S.N.

Verma, O., Kumar, R., Kumar, A. S. 2012. Assisted Reproductive Techniques In Farm Animal - From Artificial Insemination To Nanobiotechnology. *Vet. World*, 5(5), Pp. 301-310.

Viveiros, A. M. 2008. Powder Coconut Water (Acp) As Extender For Semen Cryopreservation Of Brazilian Migratory Fish Species. *Cybium*, 32(2 Suppl.), P. 215.

Viveiros, A. 2010. Motility And Fertility Of The Subtropical Freshwater Fish Streaked Prochilod (*Prochilodus Lineatus*) Sperm Cryopreserved In Powdered Coconut Water. *Theriogenology*, 74(4), Pp. 551-556

Yong, W., Ge, L., Tan Ngi, Y. 2009. The Chemical Composition And Biological Properties Of Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Water. *Molecules*, Volumen 14, Pp. 5144-5164.

Zhou, W. 2013. Experimental Study On Storage Stability And Rheological Property Of Coconut Water Beverage. *Agr. Eng. And Sustainability*, 29(19), Pp. 262-267.