



Congelamento do sêmen de pequenos ruminantes sem uso de gema de ovo utilizando bases vegetais em substituição à gema de ovo

Small ruminant's sperm freezing without egg yolk using vegetable bases instead of egg yolk

Bárbara Mara Bandeira Santos¹, Bruna Farias Brito², Luis Carlos Pinheiro Maia³, Renata Sá de Castro Pires³, Cristiane Clemente de Mello Salgueiro^{1,3,4}, José Ferreira Nunes^{1,2,3,5,†}

¹Rede Nordeste de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

³Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴ACP Biotecnologia, IncubaUECE, Fortaleza, CE, Brasil.

Resumo

Na conservação seminal é necessária a utilização de diluentes que forneçam nutrientes e protejam as células espermáticas contra o choque térmico. Os aditivos de origem animal, como a gema de ovo e o leite, amplamente empregados na preservação do sêmen, representam um risco potencial de contaminação. Com o intuito de reduzir esses impactos quanto ao uso de substâncias de origem animal, esta revisão teve como objetivo abordar os principais pontos acerca da utilização de diluentes para congelamento do sêmen de pequenos ruminantes livres de gema de ovo, um diluente constituído 100% por produtos de origem vegetal.

Palavras-chave: crioprotetor, espermatozoides, água de coco em pó, óleo de coco, moringa.

Abstract

For semen conservation, it is necessary to use extenders that provide nutrients and protect the spermatozoa against thermal shock. Animal source additives, such as egg yolk and milk, widely used in semen preservation, represent a potential contamination risk. To reduce impacts related to the use of animal origin substances, this review aimed to address the main points about the use of extenders for small ruminant sperm freezing free of egg yolk, an extender composed by 100% vegetable origin products.

Keywords: cryoprotectant, spermatozoa, powdered coconut water, coconut oil, moringa.

Introdução

A criopreservação seminal tem papel fundamental nos programas de reprodução, inseminação artificial e produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. Porém, as mudanças repentinas de temperatura, devido à refrigeração e reaquecimento, bem como a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento-descongelamento, afetam a integridade funcional e física das células espermáticas. É necessário que o diluente forneça energia, proteja as células contra danos relacionados às baixas temperaturas e mantenha um ambiente adequado para a sobrevivência espermática (Evans e Maxwell, 1987). Portanto, diferentes diluentes têm sido utilizados para minimizar esses danos.

Em geral, poucos avanços foram obtidos em relação aos componentes dos diluentes seminais desde a incorporação da gema de ovo ou leite (crioprotetores não penetrantes) ou mesmo glicerol (crioprotetor penetrante), visando a proteção dos espermatozoides durante a refrigeração e congelamento (Del Valle et al., 2013).

Conforme Gil et al. (2003), o uso de aditivos de origem animal na diluição seminal, como gema de ovo e leite, pode implicar em riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto, além de uma subsequente produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozoides (Bittencourt et al., 2008).

Outras desvantagens referentes à utilização da gema de ovo são atribuídas à opacidade óptica causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato através da avaliação microscópica, além do prejuízo à respiração dos espermatozoides e diminuição da motilidade (Bousseau et al., 1998; Martin, 2005).

A água de coco, produto de origem vegetal, possui características que a classificam como um bom diluente, pois fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos (Blume e Marques Jr, 1994). Entretanto, é necessário também a utilização de crioprotetores não penetrantes e penetrantes para obter sucesso na congelamento seminal.

[†]Correspondência: nunesuece@gmail.com

Recebido: 19 de setembro de 2018

Aceito: 29 de março de 2019



Desta forma, pesquisas por novos crioprotetores que pudessem substituir o uso da gema de ovo e do leite desnatado, formulando um diluente livre de potenciais patógenos de origem animal, tornaram-se necessárias, tendo sido realizada esta breve revisão de literatura sobre a utilização de diluente 100% vegetal para criopreservação seminal de pequenos ruminantes.

Congelação seminal

O processo de congelação seminal, além de possibilitar a utilização do sêmen por períodos mais longos, reduz custos com a aquisição e transporte de reprodutores e favorece a rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes (Castelo et al., 2008).

Entretanto, o sucesso da criopreservação seminal é apenas parcial, uma vez que a viabilidade do sêmen congelado/descongelado em geral é menor quando comparada ao sêmen refrigerado, devido ao grande número de espermatozoides que sofrem crioinjúrias durante o processo de congelação (Watson, 2000).

As crioinjúrias podem ser minimizadas quando se adiciona crioprotetores penetrantes e não penetrantes ao diluente, a fim de evitar a formação dos cristais de gelo. Na espécie ovina e caprina, o crioprotetor penetrante mais utilizado é o glicerol e o não penetrante é a gema de ovo (Purdy, 2006).

Um bom diluente deve apresentar ausência de toxicidade à célula espermática, isotonicidade, poder nutritivo e tamponante, ação estabilizadora de membrana, potencial hidrogeniônico (pH) que favoreça a sobrevivência espermática e ainda ser de fácil preparo e baixo custo (Fontbonne, 1993).

Os meios diluentes são utilizados com o objetivo de proteger as células espermáticas de efeitos deletérios do processo de refrigeração e/ou congelação, visando estabilizar a membrana plasmática (Jasko, 1994).

Meio de conservação seminal à base de água de coco

A água de coco (*Cocos nucifera* L.) é uma solução natural, ácida e estéril, composta de sais, proteínas, carboidratos, vitaminas, gorduras neutras e uma pequena quantidade de fosfolípidios, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos (Marques, 1982; Nunes, 1998). Dessa forma, possui características que a classificam como um bom diluente, pois fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos (Blume e Marques Jr, 1994).

Nunes (1986, 1987), avaliando o sêmen caprino após duas horas de incubação a 37°C, observou que tanto a motilidade progressiva (MP) quanto à percentagem de espermatozoides móveis (PEM) eram superiores quando o sêmen era diluído em uma solução à base de água de coco em comparação ao leite desnatado. A MP dos espermatozoides diluídos em água de coco quando comparados aos diluídos em solução leite-glicose também foi superior ao final de duas horas de incubação (Nunes e Salgueiro, 1999).

O ácido 3-indol acético (IAA), uma molécula pertencente ao grupo das auxinas vegetais, foi isolado da fração ativa da água de coco, tendo ação no metabolismo dos espermatozoides (Nunes et al., 1994). A adição do IAA na composição de outros meios diluentes aumentou a taxa de motilidade, fertilidade e tempo de conservação do sêmen de diferentes espécies (Nunes e Salgueiro, 1999).

Com o intuito de simplificar a utilização da água de coco como diluente, a mesma foi padronizada na forma de pó, recebendo a denominação de ACP, permitindo a conservação de suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se dispõe do fruto (Nunes e Salgueiro, 1999).

A ACP tem sido utilizada na biotecnologia da reprodução animal, obtendo-se bons resultados na preservação do sêmen de animais domésticos como caprinos (Oliveira et al., 2009), ovinos (Cavalcante et al., 2014), suínos (Guimarães et al., 2018) e canídeos (Uchoa et al., 2012).

Para a criopreservação do sêmen caprino, a formulação ACP-101c foi desenvolvida (pH 6,68; 342 mOsm/L; ACP Biotecnologia, Fortaleza-CE), enquanto para conservação do sêmen ovino foi desenvolvida a formulação ACP-102 (pH 7,00; 300-342 mOsm/L; ACP Biotecnologia, Fortaleza-CE).

Crioprotetores seminais

Os crioprotetores são utilizados com a finalidade de reduzir os danos físicos e químicos resultantes dos processos de refrigeração, congelação e descongelação das células espermáticas (Purdy, 2006). A caseína do leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol são os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen (Evans e Maxwell, 1987). Eles podem ser classificados como crioprotetores penetrantes (intracelular) e crioprotetores não penetrantes (extracelular).

Em relação ao crioprotetor não penetrante, este não consegue atravessar a membrana plasmática e age extracelularmente. As substâncias ricas em lipoproteínas, como o leite e principalmente a gema de ovo, tem sido amplamente utilizadas como crioprotetores não penetrantes para criopreservação do sêmen de pequenos ruminantes (Purdy, 2006).

Já os crioprotetores penetrantes são permeáveis à membrana plasmática e agem intra e extracelularmente.



Promovem a desidratação do espermatozoide devido ao fluxo de água osmoticamente direcionado (Bezerra, 2010). Muitos crioprotetores penetrantes (glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etilenoglicol, propilenoglicol) e suas combinações têm sido testadas; todavia, o crioprotetor penetrante mais frequentemente utilizado continua sendo o glicerol, apresentando os melhores resultados (Bezerra, 2009).

Crioprotetor seminal alternativo – óleo de coco

O óleo de coco, assim como o coco (fruto), tem sido uma importante fonte de alimentação para humanidade por milhares de anos. O óleo de coco é rico em ácidos graxos saturados, representando mais de 90% de sua composição. A maioria apresenta cadeia média (60 a 63%), sendo principalmente constituídos pelos ácidos láurico (46 a 48%) e mirístico (13 a 19%) (Marina et al., 2009). Outros ácidos graxos saturados presentes no óleo de coco são: capríco, caprílico, cáprico, palmítico e esteárico, e os insaturados são: oléico e linoléico. No plasma seminal ovino os ácidos graxos capríco, caprílico e cáprico estão presentes em baixíssimas quantidades (Cardoso et al., 2011).

A "fração não lipídica" ainda não foi elucidada; no entanto, sugere-se que a mesma contém compostos fenólicos de ação antioxidante (Hettiarachchi e Jeewandara, 2011).

Atualmente, o óleo de coco extra virgem está com alta notoriedade no meio científico, pois acredita-se que possui muitos benefícios, apresentando componentes bioativos como a vitamina E e os polifenóis (Nevin e Rajamohan, 2004).

Uma dieta enriquecida com óleo de coco virgem em ratos melhorou a capacidade antioxidante, aumentou às atividades de catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase no fígado, coração e rins (Arunima e Rajamohan, 2013). O óleo de coco virgem também preveniu o estresse oxidativo, indicado pela diminuição da formação de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (Arunima e Rajamohan, 2013).

Del Valle et al. (2013), estudando a função dos espermatozoides ovinos congelados, utilizaram diluentes complementados com caseína e óleos vegetais (palma e coco), e observaram que nenhum dos meios quimicamente definidos utilizados no estudo pós-descongelação obtiveram resultados melhores quando comparados ao diluente contendo gema de ovo.

Andreeva et al. (2008), ao avaliarem o efeito de lipídios na formação de cristais de gelo durante a congelação de espermatozoides de Truta, observaram que eles são capazes de impedir o crescimento dessas estruturas de cristais de gelo, e recomendam a sua utilização como aditivos para melhorar as propriedades crioprotetoras do meio diluente utilizado.

A qualidade seminal de espermatozoides bovinos pós-descongelação foi superior quando o diluente a base de TRIS - 20% de gema de ovo foi complementado com 8% de óleo de coco extra virgem (Tarig et al., 2017).

Em caprinos, foi avaliado o efeito da substituição da gema de ovo pelo óleo de coco extra virgem, adicionado em diferentes concentrações (2,5%, 4%, 10% e 20%) ao meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-101c) para criopreservação do sêmen caprino. Não foram verificados resultados superiores ao meio de conservação contendo a gema de ovo como crioprotetor. Entretanto, o óleo de coco extra virgem apresentou um potencial crioprotetor quando da adição das concentrações de 2,5 e 4%, sugerindo mais estudos (Santos, 2013).

Ao comparar a viabilidade espermática do sêmen ovino criopreservado, foi observado que o percentual de 10% de óleo de coco extra virgem adicionado ao diluente à base ACP-102c + 7% de glicerol não diferiu estatisticamente dos seguintes tratamentos com gema de ovo: TRIS + 20% gema de ovo + 7% glicerol e ACP-102c + 20% gema de ovo + 7% glicerol, sendo dessa forma passível de substituição sem efeito prejudicial às membranas espermáticas (Pontes et al., 2017).

Em estudos previamente realizados pelo Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, avaliando a adição de 2,5%, 5%, 10% e 20% de óleo de coco extra virgem ao meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) em sêmen ovino criopreservado, foi observada ação crioprotetora quando adicionadas as concentrações de 10 e 20% (Nunes, 2018 – informação pessoal).

Outros produtos vegetais com potencial crioprotetor

As folhas e sementes da Moringa (*Moringa oleifera*) apresentam potencial nutricional e fornecem uma grande variedade e quantidade de proteínas essenciais, vitaminas e minerais. A Moringa é uma rica fonte de aminoácidos essenciais. Ela também contém uma quantidade significativa de vitaminas, tais como: vitamina A, vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B6, ácido fólico e ácido ascórbico (vitamina C). A riqueza mineral da Moringa inclui cálcio, potássio, ferro, magnésio, fósforo e zinco. Contém muito baixa quantidade de gorduras e não oferece nenhum colesterol nocivo (Ferreira et al., 2008).

Folhas de *M. oleifera* e sementes são excelentes fontes de antioxidantes. Seu extrato exerce efeitos protetores diminuindo os peróxidos lipídicos do fígado e aumentando os antioxidantes (Asma et al., 2005; Lala e Tsaknis, 2002). Diante disso, tem se pesquisado o efeito antioxidante da Moringa.

Em ratos criptorquídicos, o extrato metanólico das folhas de moringa foi utilizado com intuito de diminuir



o estresse oxidativo proveniente do testículo presente na cavidade abdominal e foi observado uma melhora na perda de células germinativas e a diminuição do estresse oxidativo associados ao criptorquidismo (Afolabi et al., 2013).

Em coelhos, quando o extrato em pó de Moringa foi administrado via oral por um período de 21 dias, houve melhora na atividade antioxidante do trato reprodutivo masculino, sendo indicado essa dieta como manejo nutricional para melhorar a produção espermática (El-Harairy et al., 2016).

Diante dos seus constituintes, de seu potencial antioxidante e visando a busca por novos crioprotetores vegetais, tem-se realizado testes de toxicidade com o óleo de moringa para utilização na criopreservação seminal de pequenos ruminantes.

Verificou-se que o óleo de moringa nas concentrações de 2,5%, 5,0 % e 15,0% não apresentou efeito tóxico para os espermatozoides caprinos diluídos em meio à base de ACP-101 em uma concentração de 400×10^6 espermatozoides/ml e mantidos entre 4-5°C por até 72 horas. Com 72 horas de refrigeração, a qualidade espermática do sêmen diluído em meio à base de ACP-101 adicionado de 15,0% do óleo foi semelhante ao controle (ACP-101), resultado esse que comprova a ausência de toxicidade e estimula o desenvolvimento de novas metodologias para confirmar o potencial crioprotetor desse óleo (Nunes, 2018 – informação pessoal).

Considerações finais

O estudo sobre a utilização de diluente 100% vegetal mostrou-se um processo inovador para as biotécnicas relacionadas às tecnologias de criopreservação do sêmen de pequenos ruminantes, pois não mostrou nenhum grau de toxicidade às células espermáticas; podendo atuar na redução do estresse oxidativo e nutricional, fornecendo fatores de crioproteção para os espermatozoides caprinos e ovinos, diante de suas características físico-químicas.

A constituição de um diluente de origem exclusivamente vegetal tornará possível a substituição de produtos de origem animal, diminuindo assim os riscos sanitários para os animais.

Referências

- Afolabi AO, Aderoju HA, Alagbonsi IA.** Effects of methanolic extract of “Moringa oleifera” leaves on semen and biochemical parameters in cryptorchid rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, v.10, p.230-235, 2013.
- Andreeva AA, Sadikova DG, Labbe C, Anan’ev VI, Kurchikov AL.** Influence of lipids on ice formation during the freezing of cryoprotective medium. *Biofizika*, v.53, p.598-601, 2008.
- Arunima S, Rajamohan T.** Effect of virgin coconut oil enriched diet on the antioxidant status and paraoxonase 1 activity in ameliorating the oxidative stress in rats – a comparative study. *Food Function*, v.9, n.4, p.1402-1409, 2013.
- Asma S, Anwar F, Manzoor M, Fatima A.** Antioxidant activity of different solvent extracts of “Moringa oleifera” leaves under accelerated storage of sunflower oil. *Asian J Plant Sci*, v.6, p. 630-635, 2005.
- Bezerra FSB.** Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN, 2009.
- Bezerra FSB.** Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelamento. *Acta Vet Bras*, v.4, p.20-25, 2010.
- Bittencourt RF, Ribeiro Filho AL, Chalhoub, MCL, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE, Leal LS, Oba E.** Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.45, p.305-312, 2008.
- Blume H, Marques Jr APV.** Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.18, p.97-104, 1994.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus B, Lechat M.** Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*, v.50, p.699-706, 1998.
- Cardoso PBS, Nichi M, Zogno MA, Fujiwara H, Barnabe VH, Barnabe RC.** Comparação da eficácia de dois métodos de extração para determinação do perfil lipídico de ácidos graxos do sêmen ovino por meio da cromatografia líquida de alta eficiência. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.48, p.486-494, 2011.
- Castelo TS, Frota TR, Silva AR.** Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*, v.2, p.67-75, 2008.
- Cavalcante JMM, Brasil O, Salgueiro CCM, Salmito-Vanderley CSB, Nunes JF.** Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP-102c). *Cienc Anim Bras*, v.15, n.3, p.344-353, 2014.
- Del Valle I, Souter A, Maxwell WMC, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez, JA.** Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Anim Reprod Sci*, v.138, p.213-219, 2013.
- El-Harairy MA, Shamiah SHM, Ghodai AE.** Influence of oral whole extract from “Moringa oleifera” on semen characteristics of rabbits. *J Anim Poult Prod*, v.7, n.6, p.217-224, 2016.
- Evans G, Maxwell WMC.** Salamon’s artificial insemination of sheep and goats. London: Butterworth, 1987, 194p.
- Ferreira PMP, Farias DF, Oliveira, JT, Carvalho AFU.** “Moringa oleifera”: compostos bioativos e



potencialidade nutricional. Rev Nutr, v.21, n.4, p.431-437, 2008.

Fontbonne A. L'insémination artificielle dans l'espèce canine. In: Reproduction Canine, 1993, Paris. Anaïs... Paris: Association pour l'Étude de la Reproduction Animale, p.6, 1993.

Gil JL, Niels SL, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology, v.59, p.1241-1255, 2003.

Guimarães DB, Barros TB, Cantanhêde LF, Feugang JMN, Souza LP, Tonioli R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação. Cien Anim Bras, v.19, p.1-16, 2018.

Hettiarachchi K, Jeewandara S. Coconut oil: It's good for you after all Health Impact News, 2011. Disponível em: <http://healthimpactnews.com/2011/new-research-highlights-high-antioxidant-activity-of-traditionally-made-coconut-oil/>. Acesso em 30 jun. 2018.

Jasko DJ. Procedures for cooling and freezing of equine semen. Ars Vet, v.10, p.156-165, 1994.

Lala S, Tsaknis J. Extraction and identification of natural antioxidant from the seeds of the "Moringa oleifera" tree variety of Malawi. JAOCS, v.79, n.7, 2002.

Marina AM, Cheman YB, Amin I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. Trends Food Sci Technol, v.20, p.481-487, 2009.

Marques ALV. Água de coco. Informativo Socego, v.2, p.92, 1982.

Martin CEG. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados. 2005. 26f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2005.

Nevin KG, Rajamohan T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. Clin Biochem, v.37, p.830-835, 2004.

Nunes JF. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: Simpósio da Caprinocultura do Estado do Rio. Niterói, RJ, Sn., 1986.

Nunes JF. Artificial insemination in goats. In: Conferência Internacional de Caprinos, 4., Brasília, DF, 1987.

Nunes JF, Combarnous Y, Priscila L. Utilisation d'une substance active "JYP" présent dans l'eau de coco pour la conservation *in vitro* et la fertilité des spermatozoïdes des mammifères. S.I.: Sn. 1994.

Nunes JF. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. Rev Bras Reprod Anim, v.22, p.109-112, 1998.

Nunes JF, Salgueiro CCM. Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. Rev Cient Prod Anim, v.1, p.17-46, 1999.

Oliveira RV, Nunes JF, Salgueiro CCM, Cavalcante JMM, Moura AAA. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. Cien Anim Bras, v.10, n.3, p. 862-869, 2009.

Pontes, KS, Brito BF, Santos BMB, Cabral LAR, Nunes TGP, Salgueiro CCM, Nunes JF. Avaliação da viabilidade espermática do sêmen ovino criopreservado em acp-102c adicionado de óleo de coco. In: Semana Universitária da UECE, 22, 2017, Fortaleza. Anais... Fortaleza: UECE, 2017.

Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rum Res, v.6, p.215-225, 2006.

Santos BMB. Criopreservação de sêmen caprino e ovino em diluente de origem vegetal à base de água de coco em pó sem adição de gema de ovo. 2013. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2013.

Tarig AA, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Goh YM, Baiee FH, Khumaram AM, Salman H. Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in Tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. Anim Reprod Sci, v. 182, p.21-27, 2017.

Uchoa DC, Silva TFP, Cardoso JFS, Mota Filho AC, Jucá RP, Silva AR, Silva LDM. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). Theriogenology, v.77, n.9, p.1959-1963, 2012.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci, v.60-61, p.481-492, 2000.
