

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ANTIBIÓTICAS ADICIONADAS AO DILUENTE DE SÊMEN SUÍNO

(Different antibiotic concentrations added to the swine semen extender)

Ricardo TONIOLLI, R.*; Luciana de Souza TONIOLLI; Lina Raquel Santos
ARAÚJO; Tatyane Bandeira BARROS; Daianny Barboza GUIMARÃES

Laboratório Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará. Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus do Itaperi,
Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000. *E-mail: ricardo.toniolli@uce.br

RESUMO

Devido a contaminação bacteriana, utiliza-se antibióticos nos diluentes de sêmen para inibir o crescimento bacteriano durante a sua estocagem. Assim, este trabalho teve por objetivo determinar o limite de toxicidade de diferentes concentrações antibióticas da penicilina/estreptomicina adicionadas ao meio diluente do sêmen e investigar a influência sobre a motilidade espermática. Para isso, o sêmen de cinco reprodutores híbridos comerciais foi coletado uma vez por semana, durante nove semanas, através da técnica da mão enluvada. Cada ejaculado foi distribuído de forma igual entre todos os tratamentos, que consistiram em diferentes concentrações de solução de antibióticos, sendo: T1 = 0,0g/L (controle); T2 = 4,2g/L; e T3 = 12,6g/L. O sêmen diluído em água de coco em pó (ACP-103®) foi conservado por cinco dias e analisado nos dias: D0 (dia da coleta), D2 e D4 (último dia de conservação) quanto ao vigor e à motilidade espermática. Em D0, o sêmen conservado em diluente acrescido de 12,6g de solução antibiótica apresentou menor valor de vigor espermático em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Já em D2 e D4, os tratamentos contendo antibióticos apresentaram resultados de vigor aquém dos obtidos no grupo controle ($p < 0,05$). Em relação à motilidade espermática, os maiores percentuais de células móveis foram observados nas amostras de sêmen conservadas em ACP 0,0g/L (controle) quando comparados aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Conclui-se que as concentrações antibióticas utilizadas no estudo (4,2 e 12,6 g/L) mostraram efeitos tóxicos logo após a diluição do sêmen suíno, afetando de forma negativa parâmetros seminais durante a conservação a 17 °C.

Palavras-chave: Diluente, antibiótico, sêmen suíno, conservação.

ABSTRACT

Due to bacterial contamination, antibiotics are used in semen extenders to inhibit bacterial growth during storage. Thus, the present study aimed to determine the toxicity limit of different antibiotic concentrations of penicillin/streptomycin added to the semen extender and investigate the influence on sperm motility. For this purpose, semen from five commercial hybrid breeders was collected once a week for 9 weeks, using the gloved hand technique. Each ejaculate was distributed equally among all treatments, which consisted of different concentrations of antibiotic solution: T1 = 0.0g/L (control); T2 = 4.2g/L; T3 = 12.6g/L. The semen diluted in powdered coconut water (ACP-103®) was kept for 5 days and analyzed on the following days: D0 (collection day), D2, and D4 (last conservation day) for sperm vigor and motility. In D0, the semen preserved in the diluent added with 12.6 g of antibiotic solution showed a lower sperm vigor value compared to the other treatments ($p < 0.05$). In D2 and D4, treatments containing antibiotics presented vigor results below those obtained in the control group ($p < 0.05$). Regarding sperm motility, higher percentages of mobile cells were observed in semen samples conserved in ACP 0.0 g/L (control) when compared to the other treatments ($p < 0.05$). It is concluded that the antibiotic concentrations used in the study (4.2 and 12.6 g/L) showed toxic effects soon after the swine semen, negatively affecting seminal parameters during storage at 17 °C.

Keyword: Extender, antibiotic, swine semen, conservation.

Recebido: jan./2022.

Publicado: mar./2023.

INTRODUÇÃO

A contaminação bacteriana é um fenômeno frequente durante a coleta e o processamento do sêmen suíno (GROSSFELD *et al.*, 2016; BENNEMANN *et al.*, 2018). Cerca de 86% das amostras de sêmen *in natura* encontram-se contaminadas por um ou mais microrganismos. Segundo Goldberg *et al.* (2013), a presença de mais de 10^2 UFC/mL-1 de mesófilos aeróbios no sêmen indica uma amostra altamente contaminada, o que pode afetar a qualidade do sêmen.

A água utilizada no processamento do sêmen é uma das principais fontes de contaminação. Segundo Bennemann *et al.* (2018), 85,7% das centrais de inseminação avaliadas em seu estudo apresentavam pelo menos um ou mais microrganismos nas amostras de água. Já Reicks (2003) relatou que, entre 15 espécies bacterianas isoladas do sêmen, o sistema de água foi a fonte primária dos três gêneros mais comuns, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Também, Payne *et al.* (2008) observaram que a contaminação do sistema de destilação de água com *Achromobacter xylosoxidans*, uma bactéria semelhante à *Pseudomonas*, causou endometrite em fêmeas inseminadas.

Dessa forma, todos os procedimentos realizados antes da utilização do sêmen devem estar sob controle para evitar a contaminação bacteriana, a qual pode ter diversas origens (WEITZE, 1995). A contaminação do sêmen pode prejudicar a performance reprodutiva (HANSEN-SECUADRO, 2000), por esse motivo são adicionados diferentes antibióticos ao diluente para inibir o crescimento bacteriano e manter a qualidade do sêmen (SCHULZE *et al.*, 2017). Assim, este trabalho teve por objetivo determinar o limite de toxicidade de diferentes concentrações antibióticas da penicilina, dentro do meio diluente do sêmen, e sua influência sobre a motilidade espermática.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e coleta do sêmen

Foram utilizados reprodutores que pertenciam ao Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), localizada a 03° 43' 02" de latitude S e 38° 32' 35" de longitude O, com altitude média de 21 metros acima do nível do mar, índice pluviométrico anual de 1600mm e temperatura média anual em torno dos 26 °C. Os cuidados e procedimentos com os animais utilizados para a coleta de sêmen foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE), sob o protocolo de nº 7157270/2015.

Os animais se encontravam em sistema rotineiro de coleta de sêmen semanal, mantidos em sistema de confinamento, em baias individuais. A dieta fornecida apresentava os níveis proteicos, energéticos e minerais dentro dos padrões estipulados para a fase de reprodução (3.150 Kcal de energia metabolizável e 14% de PB), de acordo com a *National*

Research Council (NRC), com um consumo diário de 2,5Kg/dia, em dois arraçoamentos e água potável *ad libitum*.

O sêmen de cinco reprodutores híbridos comerciais foi coletado uma vez por semana, durante nove semanas (n=45), através da técnica da mão enluvada, em recipiente com capacidade de 500mL, coberto por gaze e protegido em copo térmico de coleta. Antes de cada coleta, era feita uma higienização externa dos flancos, do baixo ventre e do prepúcio, com água corrente e sabão neutro, seguida de esgotamento prepucial por pressão manual, no sentido caudo-cranial. Em seguida, as partes molhadas eram secas por meio de toalha de papel descartável. Após a coleta e retirada da parte gelatinosa retida pela gaze, o ejaculado identificado era levado ao laboratório para o seu processamento. A presença de sangue, de odor fétido ou urinoso, indicando uma possível contaminação do ejaculado, levava ao descarte de todo o material.

Avaliação do sêmen *in natura*

A qualidade do ejaculado *in natura* era aferida, segundo as seguintes características: temperatura (°C) com termômetro digital; volume (mL) em balança digital; concentração ($\times 10^6$ sptz/mL) em espectrofotômetro; total de espermatozoides ($\times 10^9$ sptz); vigor espermático (0 a 5 – TONIOLLI, 1996); e motilidade espermática (0 a 100% - MARTIN RILLO *et al.*, 1996). Para as duas últimas características, uma amostra do sêmen (15 μ L) foi colocada entre lâmina e lamínula e foi feita a leitura em microscopia óptica com um aumento de 200 vezes. Foram avaliados, para cada característica, no mínimo três campos de microscópio. As análises serviram para avaliação e controle de cada ejaculado durante o período experimental. Somente os ejaculados que apresentassem valores $\geq 3,0$ para o vigor e $\geq 80\%$ de motilidade eram utilizados nos protocolos experimentais (CBRA, 2013).

Conservação do sêmen e tratamentos experimentais

Cada ejaculado, de cada reprodutor, foi distribuído de forma igual entre todos os tratamentos, sendo utilizado um total de $533,3 \times 10^6$ sptz/tratamento. O volume total (sêmen + diluente), para cada tratamento, foi de 15mL a uma concentração de $35,5 \times 10^6$ sptz/mL. Após a retirada das alíquotas e a diluição, o sêmen era colocado em tubos de ensaio (cinco tubos com 3mL sêmen/tubo), fechados e conservados entre 15 e 17 °C. O sêmen foi conservado por cinco dias, de D0 (dia da coleta) a D4 (último dia de conservação), nos quais o sêmen era retirado da geladeira e reaquecido a 37 °C por dez minutos para posteriores análises. Utilizou-se o diluente de água de coco em pó (ACP-103[®]) para a diluição do ejaculado. O diluente ACP é oriundo da desidratação da água de coco *in natura*, pela técnica do *spray dry*, sendo reconstituída com água destilada nas seguintes proporções: 24g de ACP + 100mL de água destilada, com 310 de osmolaridade e 6,7 de pH. Ao diluente ACP, foi adicionado o antibiótico Pencivet[®], nas diferentes concentrações, formando os seguintes tratamentos experimentais: T1 = 0,0g/L (controle); T2 = 4,2g/L; e T3 = 12,6g/L.

Recebido: jan./2022.

Publicado: mar./2023.

Obs: Pencivet = Cada 4,2g contém: 750.000 UI de Benzilpenicilina G-Procaína; 750.000 UI de Benzilpenicilina G-Potássica; 1.500.000 UI de Benzilpenicilina G-Benzatina; 1,25g de Sulfato de Estreptomicina.

Análises do sêmen diluído e conservado

O sêmen diluído e conservado foi analisado em três diferentes dias (D0, D2, D4). A cada dia de análise, os tubos equivalentes a cada ejaculado/tratamento eram retirados da geladeira, em seguida, levados ao banho-maria a 37 °C e reaquecidos por dez minutos. Após esse período, eram analisados segundo as características vigor e motilidade.

Análise do vigor e da motilidade espermática

Visando a avaliação da qualidade espermática, foi analisado o vigor espermático (0 a 5 - TONIOLLI, 1996) e a motilidade espermática (% células móveis - MARTIN RILLO *et al.*, 1996), colocando-se uma gota de sêmen de 15µL entre lâmina e lamínula, com leitura em microscopia óptica a um aumento de 200 vezes.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso. A análise estatística foi feita por meio da avaliação das médias e desvios padrão. A análise das diferenças entre médias foi realizada por meio de uma variância multifatorial, usando-se o *General Linear Models* (GLM) do programa *Statistical Analysis System* (SAS 8, 2002). Os testes estatísticos propostos foram: Mann Whitney (variáveis não paramétricas) e o teste do Qui-quadrado (para os resultados expressos em porcentagem). Para a significância estatística, foi utilizado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Cada animal representou uma unidade experimental, com o número de ejaculados correspondendo ao número de repetições do experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando a Fig. 01, verificou-se que as concentrações crescentes de antibióticos no meio diluente influenciaram negativamente a movimentação espermática, apresentando uma ação inibitória sobre a mesma.

No D0, o tratamento com a maior concentração (12,6g/L) apresentou o valor de vigor mais baixo (1,9) ($p < 0,05$) em relação aos demais, repetindo-se durante toda a conservação do sêmen (1,2 e 1,0). Em D2 e D4, o tratamento controle (sem antibiótico) apresentou os melhores valores de vigor espermático (2,0 e 1,9; respectivamente) em relação aos outros tratamentos ($p < 0,05$). Constatou-se, também, que o tratamento sem antibiótico, no primeiro dia de conservação, foi melhor do que o tratamento com a maior concentração (12,6g/L, $p < 0,05$), possivelmente por uma ação tóxica do antibiótico sobre o vigor espermático. Por outro lado, a concentração de 4,2g/L não proporcionou nenhuma

Recebido: jan./2022.

Publicado: mar./2023.

melhora da característica estudada, igualando-se ao resultado do tratamento controle ($p>0,05$).

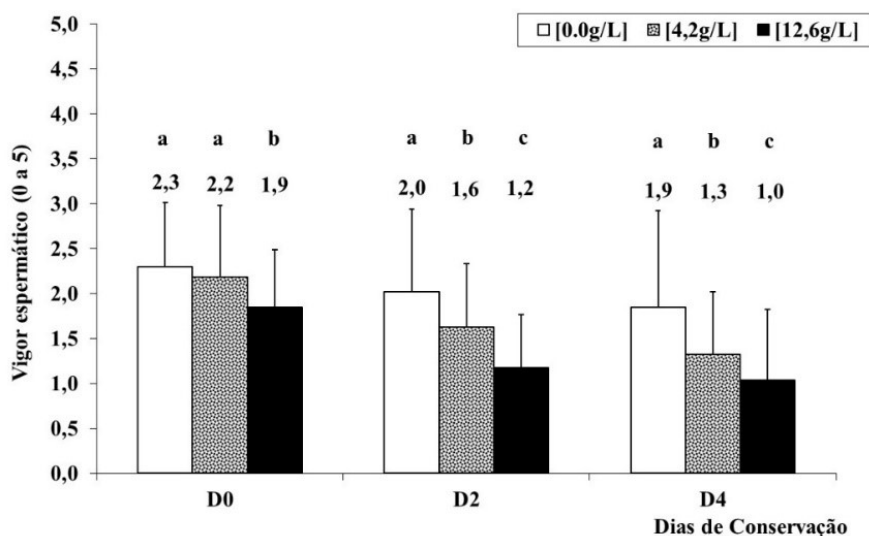


Figura 01: Efeitos de diferentes concentrações de penicilina/estreptomicina (g/litro) sobre o vigor espermático do sêmen do varrão conservado por cinco dias entre 15 e 17 °C.

Com o decorrer do período de conservação do sêmen, as duas concentrações antibióticas demonstraram-se prejudiciais aos espermatozoides, havendo uma diminuição significativa dos valores do vigor espermático em relação ao tratamento controle ($p<0,05$) nos dois momentos de análise. No tratamento controle (0,0g/L de antibiótico), houve uma pequena, mas esperada queda no vigor espermático durante a conservação. Por outro lado, uma queda bastante acentuada foi vista nos tratamentos com as duas concentrações antibióticas, sendo a maior concentração (12,6g/L) a mais danosa para a característica avaliada, com diferenças significativas ($p<0,05$) durante todo o período de conservação do sêmen. Esses resultados, comprovam a ação negativa dessas concentrações antibióticas sobre o vigor espermático.

Mesmo dentro da possibilidade de uma contaminação bacteriana, seja durante a coleta ou na manipulação do ejaculado, com o avançar do período de conservação, o tratamento controle (0,0g/L) mostrou-se superior aos demais tratamentos, indicando que as concentrações antibióticas testadas no experimento apresentaram uma ação negativa sobre a movimentação espermática, sugerindo não serem as ideais e não podendo ser utilizadas em doses de sêmen suíno diluído visando a sua conservação.

Analisando a característica motilidade espermática (Fig. 02), verificou-se uma maior proximidade dos resultados no tratamento controle e na menor concentração antibiótica (4,2g/L), não havendo diferenças significativas durante toda conservação do sêmen ($p>0,05$).

Mais uma vez, a maior concentração (12,6g/L) apresentou os piores resultados, sendo a motilidade significativamente menor do que nos outros dois tratamentos ($p < 0,05$), durante todo o período de conservação do sêmen.

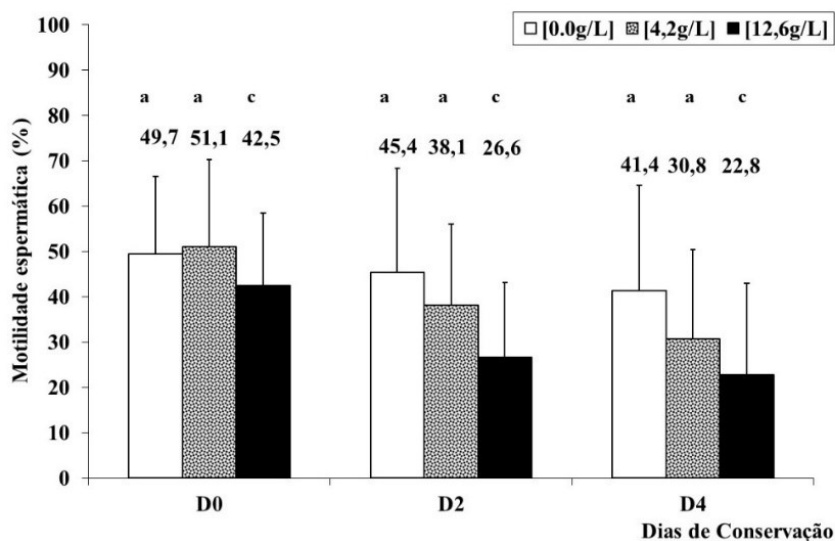


Figura 02: Efeitos de diferentes concentrações de penicilina/estreptomicina (g/litro) sobre a motilidade espermática do sêmen do varrão conservado por cinco dias entre 15 e 17 °C.

Neste estudo, não foram evidenciados efeitos benéficos da adição de antibióticos sobre o vigor ou motilidade espermática nas concentrações estudadas. Entretanto, segundo Toniolli *et al.* (2001), substâncias antimicrobianas devem ser adicionadas aos meios diluentes do sêmen do varrão, levando-se em consideração as diferentes sensibilidades dos agentes patogênicos, para se determinar um antibiótico e uma concentração, que permitam um melhor equilíbrio entre o seu efeito antimicrobiano e o seu efeito tóxico para a célula espermática.

No entanto, esses mesmos autores, utilizando a penicilina e a estreptomicina, obtiveram resultados semelhantes ao tratamento controle (sem antibióticos), evidenciando que essa combinação de antibióticos não foi eficiente no controle da contaminação bacteriana da dose inseminante. A fraca atividade antimicrobiana dessa combinação também foi demonstrada por Bennemann *et al.* (2018), que observaram elevada resistência à penicilina em microrganismos habitualmente isolados no sêmen suíno, prejudicando assim a qualidade e a longevidade espermática.

Quando analisado o comportamento do sêmen dentro de cada tratamento separadamente, observou-se claramente em todos eles uma diminuição significativa dos valores para ambas as características estudadas durante o período de conservação. Esta tendência de forte queda da motilidade durante a conservação, foi menor no tratamento controle, não havendo diferença significativa entre D0 e D2 para o vigor espermático (Fig. 03) e a motilidade espermática (Fig. 04) ($p > 0,05$); nos tratamentos em presença de antibiótico (T2 e T3) diferenças significativas apareceram desde D2 ($p < 0,05$).

Recebido: jan./2022.

Publicado: mar./2023.

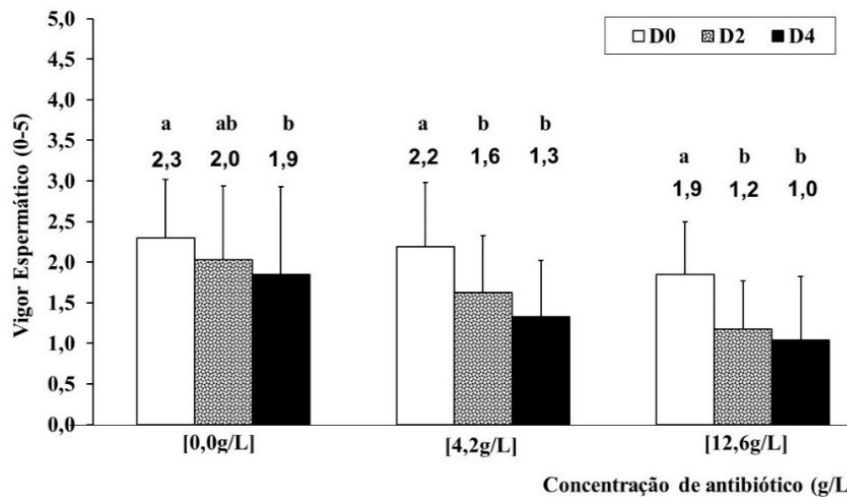


Figura 03: Efeito do tempo de conservação (D0, D2 e D4) do ejaculado suíno sobre o vigor espermático, utilizando-se diferentes concentrações de penicilina/estreptomicina (g/litro) adicionadas ao diluente.

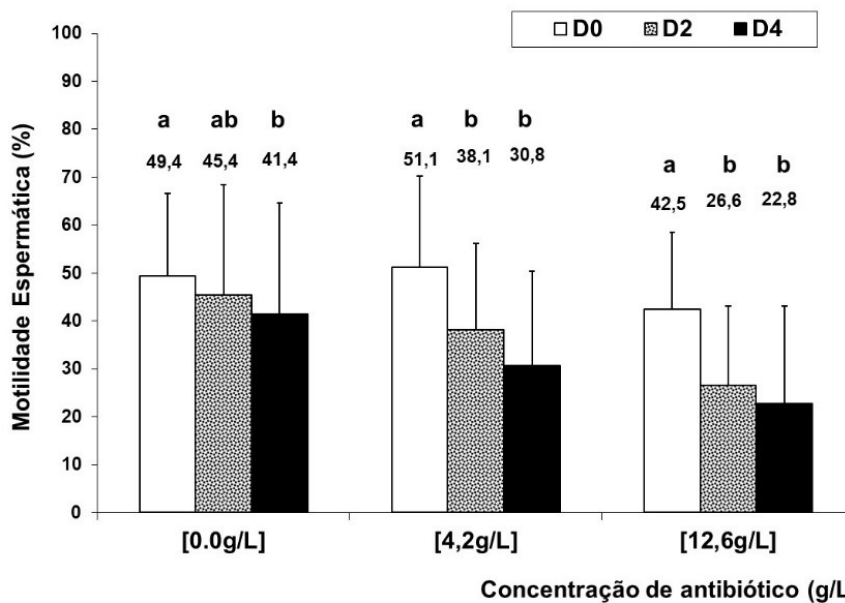


Figura 04: Efeito do tempo de conservação (D0, D2 e D4) do ejaculado suíno sobre a motilidade espermática, utilizando-se diferentes concentrações de penicilina/estreptomicina (g/litro) adicionadas ao diluente.

Atualmente os antibióticos de largo espectro são mais comumente utilizados a fim de reduzir a contaminação bacteriana nas doses de sêmen, sendo a gentamicina um dos mais comuns (SCHULZE *et al.*, 2017; JOTANOVIĆ *et al.*, 2019). Além de gerar resistência bacteriana, o uso de antibióticos tem sido associado com o efeito tóxico, sendo que o mecanismo celular responsável por esse efeito ainda não é totalmente conhecido, no entanto, pode afetar a funcionalidade e integridade da membrana plasmática dos

Recebido: jan./2022.

Publicado: mar./2023.

espermatozoides (ABREU *et al.*, 2021). Silva *et al.* (2003) observaram efeitos prejudiciais à membrana plasmática de espermatozoides logo após o resfriamento, em diluente contendo antibiótico beta-lactâmico (cefalotina).

Neste estudo, a queda nos valores de vigor e motilidade espermática parece estar relacionada com um possível efeito tóxico das concentrações antibióticas utilizadas, como já relatado para a associação sulfametoxazol e trimetoprim, eritromicina e azitromicina por Abreu *et al.* (2021), evidenciando-se menores valores para as características avaliadas, já no primeiro dia de análise, no sêmen diluído em meio com adição de maiores concentrações de antibiótico.

Dessa forma, concentrações crescentes de antibióticos no meio diluente tem efeitos tóxicos para os espermatozoides, devendo-se, assim, ser bem estabelecidas de forma a proporcionar uma boa cobertura antimicrobiana à dose de sêmen ou, ainda, buscar alternativas que contenham o crescimento microbiano durante o armazenamento, como as baixas temperaturas (WABERSKI, 2019; PASCHOAL, 2020) ou o uso de outras substâncias que inibam o crescimento bacteriano (SANCHO *et al.*, 2017; FRYDRYCHOVA *et al.*, 2019).

CONCLUSÕES

As concentrações antibióticas utilizadas no estudo (4,2 e 12,6g/L) mostraram efeitos tóxicos logo após diluição do sêmen suíno afetando de forma negativa parâmetros seminais, havendo então necessidade de estudos complementares para determinação de uma concentração ideal que atue contra possíveis microrganismos sem os efeitos indesejados das concentrações mais altas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A.C.M.R.; WEISS, R.R.; BUSATO, E.M., DITTRICH, R. Control of *Neospora caninum* in semen of bull. **Archives of Veterinary Science**, v.26, n.1, p.80-91, 2021.
- ALTHOUSE, G.C.; KUSTER, C.E.; CLARK, S.G.; WEISIGER, R.M. Field Investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, v.53, n.5, p.1167-1176, 2000.
- BENNEMANN, P.E.; MACHADO, S.A.; GIRARDINI, L.K.; SONÁLIO, K.; TONIN, A.A. Bacterial Contaminants and Antimicrobial Profile of Boar Semen in Southern Brazil Studs. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Córdoba, v.23, n.2, p.6637-6648, 2018.
- FRYDRYCHOVA, S.; LUSTYKOVA, A.; SEIFERT, J.; KUCHAROVA, S.; TRUNECKOVA, J.; ROZKOT, M.; VYDRZALOVA, M.; MOSIO, P.; BROZKOVA, I.; MOTKOVÁ, P. The Effect of Various substances on inhibition of microorganisms and

Recebido: jan./2022.

Publicado: mar./2023.

sperm survival in short-term boar semen extender. **Research in Pig Breeding**, v.13, n.1, p.1-6, 2019.

GROSSFELD, R.; PERALTA, W.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Antibiotic-free hypothermic storage of boar semen in Androstar +5 extender results in similar fertility results compared to semen stored at 17 °C in extender with antibiotic content. **Animal Reproduction Science**, v.169, n.6, p.125-125, 2016.

GOLDBERG, A.M.G.; LAURA, E.A.; FACCIN, J.E.; LINCK, L.; BORTOLOZZO, F.P. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. **Research in Veterinary Science**, v.95, n.2, p.362–367, 2013.

REICKS, D. **Bacterial contamination and semen quality**. 2003. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy. Disponível em: <https://hdl.handle.net/11299/146365>. Acesso em: 23 nov. 2016.

ANSEN-DECUADRO, G. **Control sanitario de los verracos en un centro de produccion de semen**. In: V Seminário Internacional de Suinocultura, 2000. Anais, p.152-162, 2000.

JOTANOVIĆ, S.; PENO, B.; MANDIC, S.; DAVIC, D.; VEKIC, M.; JOVICIC, M. Effects of antibiotic diluent additives on the motility parameters and morphological integrity of boar sperm during six days of storage. **Contemp. Agriculture**, v.68, n.3/4, p.65-70, 2019.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ANTIGA, C.; DE ALBA, C. Boar semen evaluation in practice. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, n.3, p.519-526, 1996.

PAQUIGNON, M.; BUSSIERE, J.; BARITEAU, F. Résultats récents en matière de technologie de la conservation de la semence de verrat. **Journée de Recherche Porcine en France**, v.19, p.63-78, 1987.

PASCHOAL, A.F.L. Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5 °C. **Plos One**, v.15, n.6, p.1-14, 2020.

PAYNE, B.J.; CLARK, S.; MADDOX, C.; NESS, A. *Achromobacter xylosoxidans* in extended semen causes reproductive failure in artificially inseminated sows and gilts. **Journal of Swine Health Production**, v.16, n.6, p.316-322, 2008.

SILVA, K.M.G.; PAPA, FO; GABALDI, S.H.; CROCCI, A.J. Efeito dos antibióticos gentamicina e cefalotina e do aminoácido taurina em meio de gema de ovo (Baken), sobre a longevidade e fertilidade do sêmen resfriado de equino. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.10, n.2, p.81-87, 2003.

SANCHO, S.; BRIZ, M.; YESTE, M.; BONET, S.; BUSSALLEU, E. Effects of the antimicrobial peptide protegrin 1 on sperm viability and bacterial load of boar seminal doses. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, Suppl.4, p.69–71, 2017.

SCHULZE, M.; GROBBEL, M.; RIESENBECK, A.; BRÜNING, S.; SCHAEFER, J.; JUNG, M.; GROSSFELD, R. Dose rates of antimicrobial substances in boar semen

Recebido: jan./2022.

Publicado: mar./2023.

preservation time to establish new protocols. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, n.3, p.397-402, 2017.

SONE, M. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. **Veterinary Record**, v.111, p.11-14, 1982.

SONE, M.; CHIKYU, M.; YOSHUDA, M.; BAMBIA, K.; OGASA, A. Prolonged storage of boar semen in liquid form. **Journal of Swine Science**, v.29, p.41-50, 1982.

TONIOLLI, R. **Pouvoir fecondant des spermatozoides du) verrat: amèlioration des conditions de conservation**, 1996. 91p. (Thèse de Doctorat en Fisiologie de la Reproduction). Université François Rabelais de Tours, France. Disponível em: <https://revistas.ufg.emnuvens.com.br/vet/rt/printerFriendly/18885/201798/8>. Acesso em: 23 nov. 2016.

TONIOLLI, R.; FIÚZA, R.F.; JATAHY, P.C.; BARROS, D.Q.; SANTOS, B.S. Efeito do uso de diferentes antibióticos no controle bacteriano do ejaculado do varrão. **Ciência Animal**, v.11, n.1, p.33-38, 2001.

WABERSKI, D. Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. **Science Reproduction**, v.9, n.1, p.1-10, 2019.

WEITZE, K.F. **Timing of artificial insemination in breeding herds**. In: Proceeding of 3th International Conference of Boar Semen Preservation, 1995, Mariensee. Anais Mariensee, 1995. p.94. Abstract.