



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO
SEMIÁRIDO**

Aionne de Souza Leite Guimarães

**USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CROTON NEPETIFOLIUS*
BAILL NA PENETRABILIDADE CERVICAL EM OVELHAS
MISTIÇAS DE DORPER E SANTA INÊS**

Petrolina – PE
2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO
SEMIÁRIDO**

Aionne de Souza Leite Guimarães

**USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CROTON NEPETIFOLIUS*
BAILL NA PENETRABILIDADE CERVICAL EM OVELHAS
MISTIÇAS DE DORPER E SANTA INÊS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior.

Petrolina – PE
2016

	Guimarães, Aionne de Souza Leite
G963u	Uso do óleo essencial de <i>croton nepetifolius</i> baill na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças de dorper e santa Inês / Aionne de Souza Leite Guimarães. -- Petrolina, 2016. 67f.: il.
	Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2016.
	Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior. Referências.
	1. Ovino. 2. Cérvix. 3. Marmeleiro. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco
	CDD 665.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO
SEMIÁRIDO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aionne de Souza Leite Guimarães

**USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CROTON NEPETIFOLIUS*
BAILL NA PENETRABILIDADE CERVICAL EM OVELHAS
MESTIÇAS DE DORPER E SANTA INÊS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.


Edilson Soares Lopes Júnior, Doutor, UNIVASF


Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, Doutor, UNIVASF


Mabel Freitas Cordeiro, Doutora, UNIVASF

Petrolina, 29 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida e pela presença constante em meus dias.

Aos meus pais Edésio e Francinete, meu esposo Washington Luiz, às minhas irmãs Christiane, Jacqueline e Elcienne pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Aos meus pais, pelo amor, por me mostrarem a direção correta, me ensinarem a ter fé na vida, por sempre me ajudarem e me apoiarem em qualquer que fosse a situação em que eu estivesse e por sempre torcerem para que todos os meus projetos dessem certo.

As minhas irmãs (Christiane, Jacqueline e Elcienne) e a meus sobrinhos (Matheus, Vinicius e Mariana), pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Eles (as) sempre me impulsionaram em direção às vitórias dos meus desafios, tornando os momentos difíceis em sorrisos, abraços e aprendizado e me apoiaram em todas as circunstâncias, mesmo, muitas vezes, não entendendo o porquê, quando eu vivia o mestrado e “esquecia a família”, estando sempre presentes.

Aos meus tios, primos, avós, cunhados e sogros, por todo carinho e que sempre torceram pelo meu sucesso.

À Washington Luiz, meu amor, que, desde o início, sempre esteve ao meu lado como amigo, namorado, noivo e, hoje, como marido. Você, mais do que ninguém, me apoiou e me ajudou nos momentos mais angustiantes do mestrado, me dando conselhos, quando, em vários momentos, meu pensamento era desistir e você estava ali, do meu lado, me mostrando o quão sou capaz de ser uma excelente profissional. Devo muito a você. TE AMO infinitamente!

Ao meu orientador Tatá, cujo carinho vai além da pesquisa. És um amigo que sei que sempre poderei contar, que soube compreender a minha ausência (sem querer...rsrs), sei o quanto o senhor queria que eu estivesse mais presente dentro do laboratório, mas, devido ao trabalho, não foi possível. Mesmo assim, o senhor me auxiliou em todos momentos que precisei, quando meu pensamento foi de aflição, devido ao mestrado tão conturbado quanto foi este meu, me mostrando que podíamos sim concluir o mestrado, que nunca existe um “não” para quem corre atrás e que Deus nunca fecha uma porta sem ter outra para abrir. O meu sincero obrigado, Tatá.

À Professora Mabel, meu carinho e agradecimento vai muito além das portas da Universidade. Palavras são insuficientes para agradecer a sua ajuda, seu carinho, seus abraços, que sempre vinham em momentos que eu precisava, quando eu chegava no laboratório e recebia o seu abraço, sem a senhora perceber, isso me encorajava cada vez mais a seguir em frente. Muito obrigada.

Ao Lafibrianos, à equipe do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal – LAFIBRA, à família LAFIBRA, que não só ajudou, mas tornou possível a execução do meu projeto de mestrado, que digo não é apenas meu e sim nosso, pois se não fosse o apoio, carinho, comprometimento de vocês não teria conseguido. Laisa, meu braço esquerdo, direito, minhas pernas, minha filhotinha, só tenho a te agradecer pela imensa ajuda nos orçamentos da vida, para cotar os equipamentos e materiais para o experimento, quando, mesmo sem nem saber, às vezes, que material era, você corria atrás e conseguia. Infelizmente, o primeiro experimento não deu certo, mas você foi chave essencial. Eldo e George, nem se conheciam direito, mas se tornaram grandes amigos. Eldo, que, na ausência de Laisa, se tornou meu filho postiço e que, junto a George, não mediu esforços para encontrar os animais em tempo recorde. Agradeço pela ajuda no projeto, que vocês abraçaram como se fosse de vocês, que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos, sendo peças fundamentais para conclusão do experimento, que sugou todas nossas forças. Agradeço a Bruninha, por ajudar na execução, mesmo com o cansaço estampado no rosto, estava ali pronta para ajudar. Também agradeço a Helder, que, pelo mesmo motivo que eu, não podia sempre estar presente devido ao trabalho e, assim, me ajudou sempre que podia, seja na prática seja tentando desvendar os resultados, hein...rsrs. Obrigado, Morceção. E à Arlete, que, com seu jeito sempre pronta pra ajudar, sempre que podia, estava ali para me ajudar. Obrigado, Lafibrianos.

Ao professor Dr. Jackson Guedes, pela ajuda na obtenção do óleo, sempre me acalmando quando eu ia tensa para as conversas no seu laboratório ou na sua sala, achando que não daria certo e ele sempre com uma palavra que acalma até a alma. Meu muito obrigado, professor.

Ao professor Dr. Edilberto Rocha Silveira pelo fornecimento do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill.

Ao professor Fernando Medina (*in memoriam*), professor do IF-SERTÃO. Eu queria que estivesse presente nesse momento tão especial da minha vida, pois sei o

quanto o senhor torcia por este dia. Um profissional exemplar que não mediu esforço para que meu mestrado fosse concluído, parecendo, muitas vezes, mais um colega de profissão do que mesmo um professor, arregaçando as mangas e segurando os animais, estando presente na execução no projeto. Os bons sempre vão cedo, mas sei que onde o senhor estiver, estará olhando e torcendo para a conclusão do meu mestrado. Obrigado por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

A Dr. Osvaldo Coelho (*in memoriam*), pelo fornecimento dos animais para execução do projeto.

À UNIVASF, que me tornou Médica Veterinária e, agora, se Deus quiser, Mestre em Ciências Veterinárias do Semiárido do São Francisco.

Aos professores do Colegiado de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Semiárido – CPGCVS, pelo amplo conhecimento passado nas diversas áreas, o que tornou possível um aproveitamento intenso do curso.

As minhas amigas de mestrado Bruna, Thae, Aline, que foram parceiras efetivas na caminhada e que essa amizade, que vem desde a graduação, seja pra sempre.

E o que falar delas (Lívia, Mayara e Thaís), que comigo formavam e formam o meu “quarteto fantástico”? Cada uma com sua personalidade que completa a outra. Somos verdadeiras irmãs que o LAFIBRA uniu e nossa amizade será pra sempre. Seus ombros quantas vezes me escutaram, me deram conselhos, quando eu estava a ponto de explodir. Cada palavra, que me ajudou nos momentos tensos do mestrado, foi de grande valia para que eu pudesse seguir em frente. Obrigado por me mostrarem quando estou errada e por fazerem parte dos melhores momentos da minha vida, pelos ensinamentos e risadas que, mesmo distante, a gente consegue se comunicar e uma ajudar a outra, como se estivéssemos no mesmo local. Vocês são minhas e são caras. Amo cada uma.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante essa caminhada que iniciou lá no ensino médio, Preto (Eldin), Gaozeta (Glaucia), Poia (Sandra), Melesketi (Ana Claudia), que também, quantas vezes, não aguentavam ouvir falar do meu experimento ou dissertação...rsrs. À Camila Araújo (minha coruja querida), que foi crucial nessa minha nova jornada...quantas vezes me tirou dúvidas a respeito

dos métodos de extração do óleo?...rsrs. Jú preta, Jú branca e Naiara (minhas Amigas), com as quais sempre pude contar e aos amigos que construí durante minha graduação e se tornaram meus amigos para vida toda, em especial, à Ana Maria, Anita, Gabi e Geandre, que, mesmo não estando sempre juntos (as), sempre nos mantivemos unidos (as). Obrigado por tudo.

A minha nova família, que construí durante o mestrado, que foi a AMVS. Em especial, a Jarbas, que sempre foi flexível nos horários e sempre me permitiu um horário flexível para que eu pudesse terminar meu mestrado. E o que falar de Rosa (Rosângela), Marmota (Valeriana), Maiana (minha farmacêutica predileta), Novaes (Heberton)? Que sempre me entendiam quando eu falava sobre as dificuldades do mestrado, sempre me colocando pra cima, nem que fosse tentar chamar pra “tomar uma”, neh, Maiana e nunca conseguir...kkkkkk. Enfim, agradeço a toda equipe da vigilância sanitária, pelo aprendizado e amizade construída nesses dois anos.

Obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente da realização deste objetivo.

MUITO OBRIGADA A TODOS VOCÊS!!!!

Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa.

RESUMO

A fim de avaliar o uso do óleo essencial de *Croton nepetifolius* Baill na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças, 40 ovelhas Dorper e Santa Inês foram distribuídas ao acaso em quatro grupos experimentais (n=10): CONTROLE, MISOPROSTOL, OECn50 e OECn100, para facilitar a passagem transcervical de uma pipeta de inseminação. Após a sincronização do estro, utilizando CIDR e eCG (200UI), a profundidade de penetração da cérvix foi mensurada utilizando uma pipeta de inseminação artificial de bovino graduada, no período de 0 h até 72 h após a retirada do CIDR. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão, submetidos à Análise de Variância e comparados pelo teste de Tukey, enquanto os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste de Fisher e Qui-quadrado. Nenhuma diferença significativa ($P>0,05$) foi encontrada quanto ao grau de penetrabilidade (cm) da cérvix entre os grupos de tratamento. No que diz respeito ao tempo de passagem (minutos), este foi significativamente afetado pelo tratamento ($P<0,05$). Os grupos Misoprostol e OECn100 apresentaram um menor tempo de penetrabilidade às 60 horas ($1,7 \pm 0,6$ e $1,5 \pm 0,6$ min, respectivamente), quando comparados ao grupo Controle ($4,1 \pm 0,6$ min) e este não diferiu significativamente do grupo OECn50 ($2,3 \pm 0,6$ min). Portanto, o uso do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill (OECn) nas concentrações de 50 μ g e 100 μ g, facilita o tempo de penetrabilidade cervical (minutos) ovina, 60 horas após o final de um tratamento progesterônico de sincronização do estro.

Palavras-chave: cérvix, dilatação, marmeleiro, ovino.

ABSTRACT

In order to evaluate the use of essential oil of *Croton nepetifolius* Baill cervical penetration in crossbred sheep, 40 sheep Dorper and Santa Inês were randomly allocated to four groups (n = 10): CONTROL, MISOPROSTOL, OECn50 and OECn100 to facilitate transcervical passing an insemination pipette. After synchronization of estrus using CIDR and eCG (200IU), the depth of penetration of the cervix was measured using a pipette graduated bovine insemination in 0 hour period until 72 h after CIDR. The results were expressed as mean \pm standard error, submitted to ANOVA and Tukey test, while the data expressed in percentage were submitted to Fisher test and chi-square. No significant differences ($P > 0.05$) found in the degree of penetration (cm) of the cervix between treatment groups. With regard to transit time (minutes), it was significantly affected by treatment ($P < 0.05$). The Misoprostol and OECn100 groups had a shorter time of penetration to 60 hours (1.7 ± 0.6 and 1.5 ± 0.6 min, respectively) when compared to control group (4.1 ± 0.6 min) and this did not differ significantly from OECn50 group (2.3 ± 0.6 min). Therefore, the use of essential oil *Croton nepetifolius* Baill (OECn) at concentrations of 50 μ g and 100 μ g, cervical facilitates penetration time (minutes) ovine, 60 hours after the end of treatment progesteronic estrus synchronization

Keywords: cervix, dilated, sheep, quince

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Diferentes partes do trato reprodutivo (Fonte: Adaptado de Granados; Dias; Sales, 2006).....	20
Figura 2 – Classificação do grau da cérvix em ovelhas (A) Grau I, (B) Grau II e Grau III (C). As setas amarelas ilustram a direção e profundidade máxima de penetração (Adaptado de Kershaw et al., 2005).....	21
Figura 3 – Classificação da aparência do óstio cervical externo da ovelha. (A) Bico de pato, (B) Fenda (Lisa), (C) Roseta, (D) Papila (Espiral), (E) Flap (Adaptado de Kershaw et al., 2005).....	23
Figura 4 – Fases do ciclo estral da ovelha (Fonte: Adaptado de Fonseca, 2005).....	25
Figura 5 – Efeito do tratamento com ocitocina antes da IA sobre a distribuição de profundidade da deposição de sêmen em caprinos Murciano-Granadina. Letras sobrescritas diferem entre si. V= vaginal; U= uterina (Adaptado de Viudes-de-Castro et al., 2009).....	31
Figura 6 – Figura 6 – Amostras de <i>C. nepetaefolius</i> Baill. (a) folhas com limbo triangular, oval e agudo; (b) frutos; (c) caule internamente avermelhado; (d) flores pequenas reunidas em inflorescência do tipo cacho (Fonte: Adaptado de Pereira, 2006).....	37
Figura 7 – (A) Introdução do espéculo vaginal para visualização da cérvix; (B) administração no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, com auxílio de uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial.....	44
Figura 8 – Avaliação da profundidade e tempo de penetrabilidade cervical.....	44
Figura 9 – (A) Swab do muco cervical; (B) Avaliação da lâmina, para classificação dos padrões de cristalização do muco cervical.....	46

Figura 10 – Percentual de ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês) exibindo estro de acordo com o grupo (Controle vs. Misoprostol vs. OECn50 vs. OECn100)..... 49

Figura 11 – Padrões de cristalização no muco cervical coletados em momentos diferentes em ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês. Cristalização do muco cervical a partir da retirada do CIDR: (A) 0 h; (B) 24 h, cristalização completa e incompleta; (C) 48 h, máxima cristalização no muco coletado; (D) 54 h, cristalização incompleta e início da degradação da cristalização; (E) 60 h, (F) 66 h e (G) 72 h, degradação de cristalização completa..... 51

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Efeito da idade e da fase do ciclo estral sobre a profundidade média (\pm e.p.) da cérvix ovina (Fonte: Adaptado de Kershaw et al., 2005).....	24
Tabela 2 – Transposição da cérvix e colheita transcervical de embriões, sem (T1) e com (T2) administração de Misoprostol como agente dilatador cervical em ovelhas Dorper (Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2009).....	32
Tabela 3 – Quantidade média de embriões resultante da colheita transcervical com administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_1 como agente dilatador cervical de ovelhas Santa Inês superovuladas com FSH (Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2007).....	32
Tabela 4 – Número e percentual de animais submetidos à colheita transcervical de embriões (número de animais colhidos), tempo gasto (média \pm e.p.; minutos) para a passagem da sonda e para a execução da colheita, além da taxa de recuperação (%) sem (Grupo Controle) e com administração de misoprostol (Grupo Misoprostol) como agente dilatador cervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês superovuladas com pFSH (Fonte: Adaptado de Guimarães et al., 2013).....	33
Tabela 5 – A penetrabilidade cervical, duração total do procedimento (DT), tempo final de tentativas (FT) e concentrações/proporções de estradiol/progesterona ($\text{E}_2:\text{P}_4$) para ovelhas cíclicas Rideau Arcott x Polled Dorset tratadas com Cervidil® e seus respectivos controles (Fonte: Adaptado de Candappa e Bartlewski, 2014).....	34
Tabela 6 – Composição química do óleo essencial de <i>Croton nepetifolius</i> Baill.....	42
Tabela 7 – Padrões de mudança, expressos em porcentagem, da cor do epitélio vaginal e cervical, características do muco cervical em ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês em diferentes tempos (horas) após a retirada do dispositivo CIDR.....	47

Tabela 8 – Tempo de penetrabilidade (minutos) na cérvix (média ± erro padrão) de ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês de acordo com o grupo de tratamento: Controle, Misoprostol, OECn50 e OECn100.....	48
Tabela 9 – Profundidade (cm) da cérvix (média ± erro padrão) de ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês de acordo com o grupo de tratamento: Controle, Misoprostol, OECn50 e OECn100.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Colheita de embriões
CIDR	Controlled internal drug release (dispositivo interno de liberação controlada)
CL	Corpo lúteo
E ₂	Estradiol
eCG	Equine chorionic gonadotropin (gonadotrofina coriônica equina)
EBE _c	Extrato bruto da <i>Erythroxylum caatingae</i>
FSH	Follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)
GnRH	Gonadotrophin releasing hormone (hormônio liberador de gonadotrofina)
IA	Inseminação artificial
IF-SERTÃO	Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano
LH	Luteinizing hormone (hormônio luteinizante)
OEC _n	Óleo essencial <i>Croton nepetifolius</i> Baill
P ₄	Progesterona
pFSH	Porcine follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante suíno)
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
TE	Transferência de embriões
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. DESENVOLVIMENTO.....	20
2.1. Revisão de literatura.....	20
2.2. Justificativa.....	38
2.3. Objetivos.....	39
2.3.1. Objetivo geral.....	39
2.3.2. Objetivos específicos.....	39
2.4. Material e métodos.....	40
2.4.1. Aspectos éticos.....	40
2.4.2. Local de execução.....	40
2.4.3. Animais experimentais.....	40
2.4.4. Sincronização do estro.....	41
2.4.5. Detecção do estro.....	41
2.4.6. Obtenção do óleo essencial de <i>Croton nepetifolius</i> Baill (OECN).....	41
2.4.7. Delineamento experimental e mensuração da penetrabilidade cervical.....	43
2.4.8. Morfologia cervical e vaginal.....	45
2.4.9. Parâmetros avaliados.....	46
2.4.10. Análise estatística.....	46
2.5. Resultados.....	47
2.6. Discussão.....	52
3. CONCLUSÕES.....	56
4. REFERÊNCIAS.....	57
5. ANEXOS.....	67

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento da ovinocultura, existe um interesse em intensificar sua exploração econômica através de programas de melhoramento genético e aplicação das biotécnicas reprodutivas, permitindo, assim, avanços significativos no aumento da produtividade animal (SIMPLÍCIO et al., 2007; DEMINICIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Dentre as biotécnicas, a Inseminação Artificial (IA) é uma das principais tecnologias reprodutivas, que contribui em um grau mais elevado para melhoria genética do rebanho, através do uso de reprodutores geneticamente superiores. No entanto, os baixos índices reprodutivos desse método em ovelhas podem ser explicados pela conformação anatômica da cérvix, dificultando a deposição intrauterina do sêmen e diminuindo a taxa de penetração espermática em 50%, em função da variabilidade individual e habilidade do inseminador (VERBERCKMOES et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2013; PALACIOS; ABECIA, 2015).

Em decorrência da dificuldade de transpor os anéis cervicais, têm-se utilizado os dilatadores cervicais, permitindo assim a passagem do aplicador de IA. No entanto, alguns fármacos sintéticos, além de serem de alto custo e de difícil acesso, ainda apresentam resultados variáveis e inconsistentes. Com isso, tem-se buscado estudos a partir de plantas a fim de verificar a aplicabilidade de substâncias e que sejam de baixo custo, fácil aquisição e seguras para serem utilizadas em animais (CHIWORORO; OJEWOLE, 2009).

Atualmente, estudos têm sido desenvolvidos para verificar o efeito de substâncias naturais na reprodução animal, tais como o uso de extratos etanólicos brutos e óleos essenciais no relaxamento da musculatura cervical (PEREIRA, 2006). Como o semiárido do Nordeste brasileiro possui plantas que têm extratos e óleos essenciais com diversas funções na atividade reprodutiva, esta região se constitui como uma fonte alternativa para o desempenho reprodutivo dos animais nela explorados.

Croton nepetifolius Baill (Euforbiaceae) produz um óleo que possui diversos efeitos sobre a musculatura lisa, tendo efeito relaxante e antiespasmódico (CATUNDA JÚNIOR, 2003; CANUTO, 2005; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004; MORAIS et al., 2006; PEREIRA, 2006). Todavia, não existem estudos no tocante ao efeito do uso do óleo essencial de *C. nepetifolius* (OECn) sobre a dilatação cervical de ovelhas no momento da Inseminação Artificial.

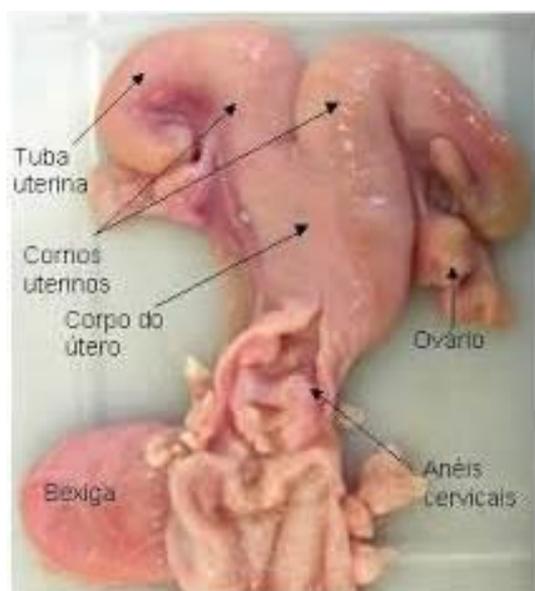
2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Revisão de literatura

2.1.1. Anatomia cervical e fisiologia reprodutiva da ovelha

O útero é constituído de cornos uterinos, um corpo e uma cérvix (Figura 1). Ele participa dos processos de implantação, gestação e parto, além de ser responsável pelo transporte dos espermatozoides desde a ejaculação até a fecundação e na regulação funcional do corpo lúteo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

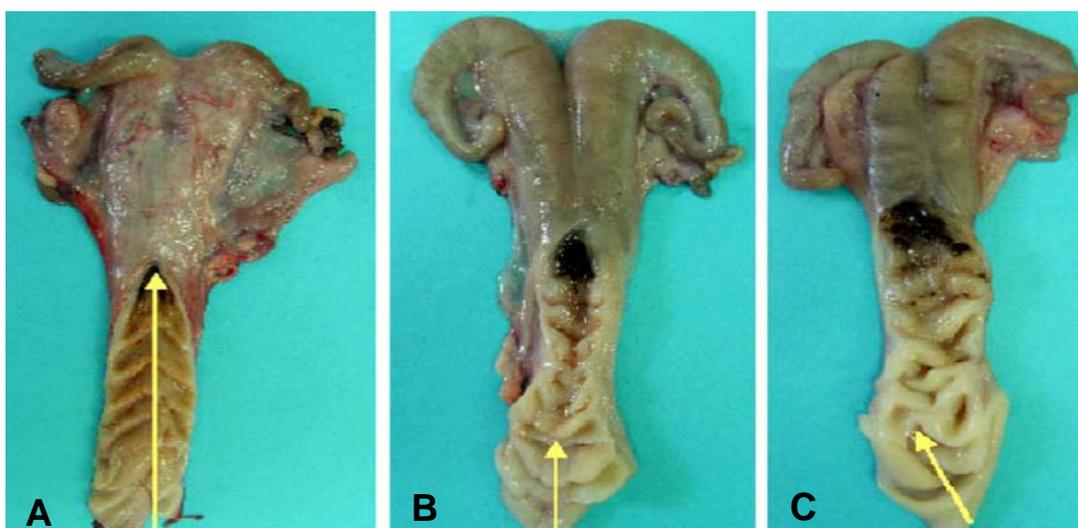
Figura 1 – Diferentes partes do trato reprodutivo (Fonte: Adaptado de Granados; Dias; Sales, 2006).



No que diz respeito à anatomia da cérvix ovina, ela é tortuosa, tubular, longa, de lúmen estreito, sendo composta, predominantemente, de tecido conjuntivo, além de uma pequena quantidade de feixes musculares lisos que se estendem longitudinalmente e transversalmente. O lúmen cervical ovino pode apresentar obstrução devido à presença de 4 a 7 anéis cervicais, que funcionam como uma barreira física contra agentes ambientais e físicos, permanecendo quase sempre fechada, exceto durante o período estral, quando a cérvix relaxa levemente, permitindo, assim, a passagem dos espermatozoides para o útero; durante o parto, para passagem do feto; ou em casos de infecção uterina (HAFEZ, 1993; KERSHAW et al., 2005; CRUZ JR, 2006).

A irregularidade dos anéis cervicais é o principal fator do insucesso da Inseminação Artificial (IA) pela via transcervical em ovelhas. Com isso, entender a anatomia cervical é crucial para o sucesso da IA. Estudos realizados por Kershaw et al. (2005), utilizando cérvices ovinas provenientes de abatedouros, classificaram os anéis cervicais quanto à morfologia, segundo a integralidade e interdigitação entre eles, classificando-os em 3 graus: Grau I (anéis cervicais completos e alinhados em todo o lúmen e sem interdigitação); Grau II (mistura de anéis completos, como no Grau I, e anéis cervicais incompletos com alguns obstruindo o lúmen central) e Grau III (anéis cervicais predominantemente incompletos, sem alinhamento e interdigitantes) (Figura 2), sendo seu comprimento influenciado por diversos fatores, tais como: raça, idade, ordem e estado fisiológico. Moura et al. (2011), trabalhando com cérvix de ovelhas, na sua maioria da raça Santa Inês e oriundas de matadouros, observaram que o número de peças que apresentavam o Grau II de integralidade e interdigitação entre os anéis das pregas cervicais foi maior (n = 32, 39,5%) do que o Grau I (n = 28, 34,6%) e III (n = 21, 25,9%). O grau de integralidade e interdigitação entre os anéis das pregas cervicais foi correlacionado, positivamente, ao tipo de abertura externa da cérvix.

Figura 2 – Classificação do grau da cérvix em ovelhas (A) Grau I, (B) Grau II e Grau III (C). As setas amarelas ilustram a direção e profundidade máxima de penetração (Fonte: Adaptado de Kershaw et al., 2005).



Kershaw et al. (2005) classificaram o óstio cervical externo em cinco tipos de abertura cervical: Bico de pato (duas dobras opostas de tecido protuberante cervical,

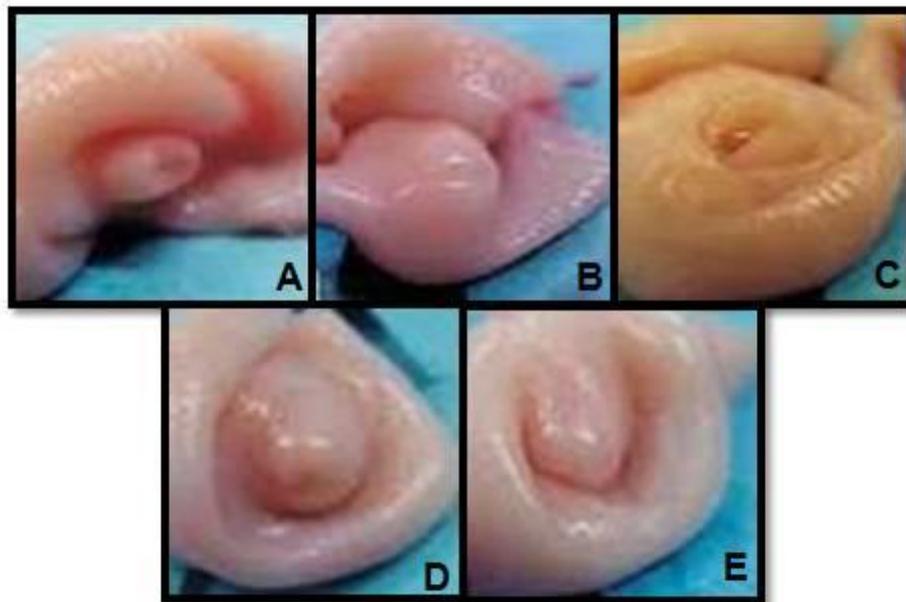
sobressaindo em direção a vagina com uma fenda horizontal central como óstio cervical externo); Fenda (sem saliências, sobressaindo em direção à vagina, com uma fenda como abertura no óstio da cérvix, dando entrada para o canal cervical); Roseta (um conjunto de pregas cervicais protuberante, sobressaindo em direção a vagina, obscurecendo o óstio cervical externo); Papila (papila protuberante para dentro da vagina anterior com o óstio cervical externo em seu ápice) e Flap (uma dobra de tecido cervical protuberante para dentro da vagina anterior e completamente ou parcialmente sobrepondo o óstio cervical externo criando a aparência de uma aba) (Figura 3).

Halbert et al. (1990), utilizando diversas raças ovinas, dentre elas, Suffolk, Cheviot, Dorset, já tinham realizado uma prévia classificação do canal cervical em apenas quatro tipos básicos, flap ou aba, bico de pato, espiral e roseta. Os mesmos verificaram uma maior frequência do tipo roseta e flap (35%) e os tipos bico de pato e espiral representaram 30% do total. No entanto, este estudo não indicou uma clara relação entre o tipo de cérvix, comprimento, quantidade de anéis e largura da cérvix. Cruz Jr (2006) e Franco et al. (2014) também identificaram a predominância do tipo bico de pato na proporção de 69,12% e 46%, respectivamente, contrariando os achados de Moura et al. (2011) que obtiveram uma porcentagem maior do tipo fenda ($n = 31$; 38,3%), o qual foi o dobro dos demais: bico de pato ($n = 12$, 14,8%), roseta ($n = 14$; 17,3%), papila ($n = 11$; 13,6%) e flap ($n = 13$; 16%).

No que diz respeito ao comprimento do canal cervical, este pode variar de 57 mm a 100 mm, podendo ser influenciado pela raça, idade, número de partos e fase do ciclo estral. Franco et al. (2014), trabalhando com ovelhas Santa Inês adultas, com idade média de um ano e oriundas de abatedouro, verificaram que o tamanho da cérvix apresentou grande variabilidade, obtendo um comprimento médio de $41,33 \pm 16,38$ mm, tendo o menor comprimento de 24,95 mm e o maior 57,71 mm, resultados semelhantes também foram encontrados por Cruz Jr (2006), trabalhando com cérvix de ovelhas da raça Santa Inês de diferentes idades, verificou um comprimento médio de 46,8 mm, tendo comprimento mínimo de 30 mm e máximo 70 mm. Já Breda et al. (2007) obtiveram uma maior média do comprimento cervical de 7,2 cm em animais das raças Hampshire Down e em ovelhas mestiças Hampshire Down – Illê de France. Animais de 2 anos apresentam-se com cérvix mais curta e mais estreita, porém, com um maior número de anéis, quando comparado com cérvix de animais mais velhos. No entanto, animais de 3 ou 4 anos

não apresentam diferenças quanto a estas variações morfológicas, (KAABI et al., 2006).

Figura 3 – Classificação da aparência do óstio cervical externo da ovelha. (A) Bico de pato, (B) Fenda (Lisa), (C) Roseta, (D) Papila (Espiral), (E) Flap (Fonte: Adaptado de Kershaw et al., 2005).



No que se diz respeito ao estágio do ciclo estral, Kershaw et al. (2005) verificaram que tal parâmetro afeta a penetrabilidade cervical (Tabela 1), onde pôde ser verificada uma penetração de 4,6 mm maior em cérvix de ovelhas na fase folicular, quando comparada com a fase lútea. Isto pode ser explicado porque as ovelhas que estão na fase folicular permitem uma maior penetrabilidade, devido às concentrações de estradiol mais elevadas do que na fase lútea, tendo, assim, um maior relaxamento cervical.

Conhecer a fisiologia reprodutiva da ovelha é de suma importância para o uso das biotécnicas da reprodução e o conseqüente melhoramento genético. O termo fisiologia pode ser definido como um conjunto de complexos mecanismos e fenômenos que, através de linguagens bioquímicas, recebem comandos do sistema endócrino, promovendo a inter-relação dos órgãos (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006). O ciclo estral é regulado por diversas modificações neuroendócrinas, resultantes de interações entre hormônios hipotalâmicos e hipofisários, ovário e útero. Pode ser definido como um conjunto de acontecimentos reprodutivos que se

repetem em intervalos regulares, o qual se inicia no estro e termina no estro seguinte (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MORELLO; CHEMINEAU, 2008).

Tabela 1 – Efeito da idade e da fase do ciclo estral sobre a profundidade média (\pm e.p.) da cérvix ovina (Fonte: Adaptado de Kershaw et al., 2005).

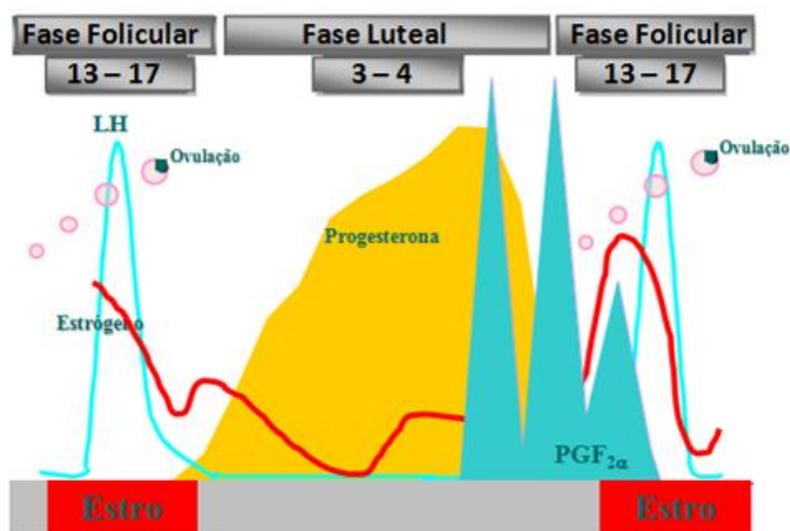
Idade	Fase do ciclo (n)	Profundidade máxima a partir do óstio externo (mm)	Penetração máxima a partir do óstio externo (%)
Ovelhas jovens	Luteal (14)	10,50 \pm 1,582 ^a	25,7 \pm 3,74 ^a
Ovelhas jovens	Folicular (23)	15,74 \pm 1,406 ^b	36,2 \pm 3,20 ^b
Ovelhas adultas	Luteal (106)	11,78 \pm 0,56 ^a	28,4 \pm 1,62 ^a
Ovelhas adultas	Folicular (22)	15,86 \pm 3,353 ^b	36,06 \pm 4,69 ^b

Nas colunas, valores com letras diferentes (a, b), diferem significativamente. Números entre parênteses representam o número total de animais no grupo.

O fotoperíodo é um fator importante no ciclo reprodutivo das ovelhas, já que são animais fotoperiódicos negativos, isto é, a atividade estral está interligada com o efeito da luz, iniciando durante o período em que diminui a duração da luz, ou seja, nos dias curtos do outono e inverno (JAINUDEEN et al., 2004; SENGER, 1999 apud CAVALCANTI, 2008, p. 15; PIRES et al., 2011). Ovelhas criadas no Nordeste podem ciclar durante todo o ano, por sofrerem menor ação do fotoperíodo; no entanto, fatores como a qualidade e disponibilidade de alimentos e o estresse térmico podem interferir diretamente na atividade reprodutiva (CUNHA et al., 2001; ROSA; SILVA; BRYANT, 2003; FONSECA, 2005).

Com relação ao ciclo estral da ovelha, ocorrem profundas transformações tanto ao nível hormonal e anatômico quanto no comportamento da fêmea. A duração deste período é, em média, de 17 dias, podendo variar de 14-18 dias. O ciclo pode ser dividido em duas fases: luteal ou progesterônica, compreendendo de 13 a 17 dias; e a folicular ou estrogênica, com 3 a 4 dias (Figura 4) (RUBIANES, 2000; FONSECA, 2005).

Figura 4 – Fases do ciclo estral da ovelha (Fonte: Adaptado de FONSECA, 2005).



A fase luteal inicia-se logo após a ovulação, ocorrendo a formação do corpo lúteo (CL), o qual produz um volume crescente de progesterona (P_4), inibindo a pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e a secreção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) nos primeiros dias desta fase. O corpo lúteo atinge o pico de produção de P_4 (3-4 ng/mL) entre o 6º e 8º dias do ciclo e mantém um nível constante de secreção até a luteólise. A duração da fase luteal depende da ovelha se tornar ou não gestante, porém, no seu final, as concentrações de P_4 caem para níveis basais em fêmeas não gestantes, no período médio do ciclo estral os folículos secretam estradiol, que estimula a síntese de receptores de ocitocina no endométrio. O corpo lúteo secreta ocitocina que age sobre as células glandulares do endométrio estimulando a secreção de $PGF_{2\alpha}$. Dessa forma, segue-se a lise do corpo lúteo com a subsequente queda dos níveis de progesterona (RUBIANES, 2000; MORAES; SOUZA; GONÇALVES, 2002; MORELLO; CHEMINEAU, 2008).

Aproximadamente um dia após o pico de LH, ocorre elevação das concentrações de FSH e o aumento da pulsatilidade de LH, dando início ao desenvolvimento da primeira onda de crescimento folicular (LIMA, 2013). A fase folicular corresponde ao período que vai da luteólise até a ovulação, se caracterizando pela secreção gradual de estrógeno e alteração da mucosa uterina e vaginal, sendo nessa fase que o animal apresenta sinais de estro (CAVALCANTI, 2008). Os mecanismos exatos que regulam o amolecimento cervical, que ocorrem durante a fase folicular, podem variar daqueles da dilatação da cérvix induzida pelo

parto. No entanto, durante o estro, o amolecimento cervical pode também ser mediado pela PGE₂. A expressão do receptor mRNA da prostaglandina E (EP₂) é maior antes do aumento repentino de LH, embora os receptores EP₂ e EP₄ da PGE₂ são expressos em todo o ciclo estral em ovelhas (KERSHAW et al., 2009).

De acordo com Jainudeen et al. (2004), a ovulação da ovelha ocorre espontaneamente, próximo ao fim do estro, sendo que, no seu decorrer, podem acontecer mais de uma ovulação.

O início do estro é determinado pelo momento em que a fêmea se deixa ser coberta pela primeira vez, ou seja, quando a fêmea fica receptiva ao macho, ficando imóvel quando é montada por este. O período médio de receptividade sexual é de 24-30 horas, podendo ser reduzido se a cópula for realizada no início do estro e varia de acordo com a raça e a taxa de ovulação, além da idade, estação do ano e a presença do macho (BICUDO et al., 2005; DELGADILLO, et al., 2009).

2.1.2. Sincronização do estro e da ovulação

A sincronização do estro e da ovulação é uma valiosa ferramenta de manejo que tem sido utilizada com sucesso, melhorando a eficiência reprodutiva, principalmente em ruminantes, como, por exemplo, reduzindo o intervalo entre partos em uma determinada época desejada, permitindo que a fêmea tenha um maior número de crias/ano. É uma biotécnica fundamental em todos os protocolos de reprodução assistida e tem grande influência na eficiência destes programas, consistindo na manipulação do ciclo estral através da utilização de hormônios. Esses processos têm como princípios encurtar ou prolongar o ciclo estral, provocando a luteólise ou prolongando a fase lútea, de maneira que um grupo de animais entre em estro e/ou ovule durante um curto período de tempo ou, até mesmo, num único dia (KUSINA et al., 2000; SOUZA, 2002; BALDASSARRE; KARATZAS, 2004; MARQUEZINI et al., 2011).

Em pequenos ruminantes, há dois protocolos de sincronização do estro mais utilizados, sendo um conseguido através da redução do comprimento da fase luteal do ciclo estral, através da aplicação de prostaglandina (PGF_{2α}) e seus análogos ou estendendo a fase luteal, utilizando progesterona exógena ou progestágenos, seguido de uma aplicação de eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) para uma maior sincronização e aumento da taxa de ovulação. Também pode ser realizada a sincronização do estro e da ovulação, utilizando rufiões, pois o feromônio produzido

pelo macho estimula o início da estação reprodutiva e sincronizam as ovelhas (JAIUNUDEEN; WAHID; HAFEZ, 2000; KUSINA et al., 2000; CRUZ JR, 2006).

2.1.3. Inseminação Artificial (IA)

Cada vez mais verifica-se o crescimento na ovinocultura, bem como na ampliação do seu mercado, muitas vezes influenciados pelo investimento em pesquisas relacionadas ao melhoramento genético, e uma das formas de intensificar este melhoramento é através do uso de biotecnologias da reprodução, entre elas a inseminação artificial. Dentre as vantagens da IA, pode-se verificar o seu uso como forma de expansão de populações de animais com capacidade melhorada, permitindo a introdução de raças exóticas com elevado potencial produtivo (GUSMÃO; MOURA, 2005; FERANTI et al., 2013).

A IA pode ser realizada por três formas (vaginal, transcervical e laparoscópica). Na IA vaginal, a deposição do sêmen é realizada na parte anterior da vagina, com eficiência muito variável. Ainda assim, é uma técnica de fácil aplicação, apresentando bons resultados apenas com a utilização de 200 a 400 x 10⁶ espermatozoides decorrentes de sêmen fresco, obtendo taxa de concepção entre 40 e 65%. Devido à particular conformação cervical da ovelha, a técnica mais escolhida na espécie é a laparoscopia, por ser um procedimento que resulta em melhores taxas de gestação. No entanto, esta técnica necessita de equipamentos especiais e inviáveis em larga escala, profissional altamente qualificado, tempo de inseminação mais prolongado e pode haver riscos de complicações anestésicas decorrentes do pneumoperitônio (VANNOZI, 2002; DONAVAN et al., 2004; OLIVEIRA, 2009; SANTOS et al., 2013).

O método transcervical, é um método não cirúrgico e apresenta menor custo. O sêmen é depositado a partir do primeiro anel e requer utilização de sêmen com alta concentração de espermatozoides. Neste método, o inseminador localiza a cérvix com o auxílio de um espéculo e uma lanterna, através do uso de um aplicador, que, quando possível, é introduzido pelo canal cervical até atingir o corpo do útero e, assim, o sêmen é depositado e, quanto mais profundo for a penetração do aplicador na cérvix, maior será o percentual de resultados positivos. Porém, a tortuosidade dos anéis cervicais dificulta esta técnica (RABASSA et al., 2007; BIEHL, 2009).

A IA transcervical apresenta baixo custo e relativa facilidade de aplicação, podendo ser superficial ou profunda, a taxa de concepção é de 60 a 70%, utilizando sêmen fresco ou refrigerado; e 30 a 35%, utilizando sêmen congelado-descongelado (AX et al., 2000). Biehl (2009) alcançou uma taxa média de prenhez de 28,6%, trabalhando com inseminação artificial pela via transcervical, sendo seus resultados semelhantes aos encontrados por Pinna et al. (2008), que obtiveram uma taxa de prenhez de 25,5% em ovelhas submetidas à inseminação artificial pela via laparoscópica e aos achados de Monreal et al. (2011), em estudo com ovelhas nativas sincronizadas e inseminadas com sêmen criopreservado, por via transcervical (25,7%). Rabassa et al. (2007) compararam a IA pelo método de laparoscopia com o método transcervical, utilizando 70 ovelhas da raça Corriedale, obtendo uma taxa de 40% de prenhez em ambos os métodos, verificando que as eficiências das técnicas foram similares, embora, pela via transcervical, tenha havido um menor estresse para os animais. Já Machado et al. (2006) encontraram diferença significativa na taxa de prenhez, tendo médias de 35,7% para IA transcervical e 71,8% para laparoscópica. Essa superioridade pode ser devido à tração da cérvix, permitindo, assim, a manipulação para transpor os anéis e depositar o sêmen no corpo do útero, ocasionando trauma significativo no tecido pélvico, que é doloroso e pode interferir na fertilidade (DEROSSI et al., 2009).

Em razão da passagem do aplicador pela cérvix ser o principal entrave para realização de inseminação artificial transcervical na espécie ovina, algumas substâncias têm sido utilizadas com o objetivo de promover o relaxamento e abertura cervical (SANTOS, 2009).

2.1.4. Dilatadores cervicais

A dilatação cervical se dá naturalmente no período estral, em um momento em que a concentração plasmática de progesterona está baixa e a de 17β -estradiol e ocitocina estão elevadas (CHALLIS; SPRAGUE; PATRICK, 1983; LEETHONGDEE, 2010). Essa dilatação requer uma reorganização do colágeno do estroma cervical (fibroblastos e músculo liso), com a mudança de uma estrutura altamente organizada das fibrilas fortemente ligadas e sob a influência de elevados níveis de progesterona, para um arranjo muito frouxo, durante o estro e sob a influência do 17β -estradiol (ULDBJERG, 1983; CALDER, 1994; LEPPERT, 1995).

Wulster-Radcliffe; Costine; Lewis (2004) estabeleceram três métodos para minimizar essa dificuldade: o método mecânico, o físico e o químico. No método mecânico, utiliza-se uma vela do tipo Hegar para vencer as dificuldades físicas relacionadas com a cérvix ovina; o físico é realizado através do auxílio de uma pinça Allis ou Pozzi, onde a cérvix é tracionada e fixada com o objetivo de alinhar o canal cervical, diminuindo, assim, as obstruções; e o método químico, que é realizado utilizando fármacos de diferentes classes para relaxar a musculatura lisa cervical, conhecidos como dilatadores cervicais.

Alguns fármacos já foram utilizados como dilatadores, como o uso da relaxina (SALAMON; LIGHFOOT, 1970), uma combinação de PGE₂ associada ao 17β-estradiol (BARRY et al., 1990; McKELVEY et al., 1997), à ocitocina (SAYRE; LEWIS, 1996), à ocitocina associada ao 17β-estradiol (FLOHR; WULSTER-RADCLIFFE; LEWIS, 1999; WULSTER-RADCLIFFE; COSTINE; LEWIS, 1999), à PGF_{2α} (SOUSA, 1999), à interleucina humana (CROY et al., 1999), ao cloridrato de bromexina (ALMEIDA et al., 2002), à PGE₁ e ao 17β-estradiol (OLIVEIRA, 1992; ISHWAR; MEMON, 1996), PGE₁ associado ao sulfato de terbutalina (BARBAS et al., 2003).

Candappa; Bartlewski (2014) testaram a utilização de Cervidil® (dispositivo vaginal que contém 10 mg de dinoprostona) e verificaram que é um método eficiente para dilatação cervical, melhorando a penetrabilidade no processo de inseminação transcervical e transferência de embriões.

O uso de um dilatador cervical ideal para utilização na IA, CE ou TE para induzir a dilatação cervical em ovelhas deve ser de baixo custo, fácil aquisição e causar o mínimo de desconforto para ovelhas. Além disso, esse agente não deve ocasionar efeitos deletérios, como no transporte e viabilidade dos espermatozoides, bem como prejudicar o desenvolvimento da ovulação e qualidade dos oócitos. Portanto, não deve induzir efeitos uterinos indesejáveis, tais como a atonia ou hiperestimulação, as quais, por sua vez, podem contribuir para o fluxo retrógrado do sêmen depositado durante a IA, diminuindo, assim, consideravelmente, as possibilidades de fecundação. Por último, o agente deve ter a capacidade para induzir a dilatação durante uma variedade de estados reprodutivos (CANDAPPA; BARTLEWSKI, 2011).

Próximo do parto ocorre um aumento da relaxina, estimulando o afrouxamento do tecido conjuntivo da cérvix, possibilitando uma maior elasticidade

dos tecidos pélvicos (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Bagnell et al. (1993) relataram que os suínos apresentam grandes concentrações de relaxina no final da gestação. No entanto, Salamon e Lightfoot (1967) verificaram que a relaxina injetada 12 horas antes da IA, em ovelhas, não teve efeito da dilatação da cérvix e na profundidade de deposição do sêmen.

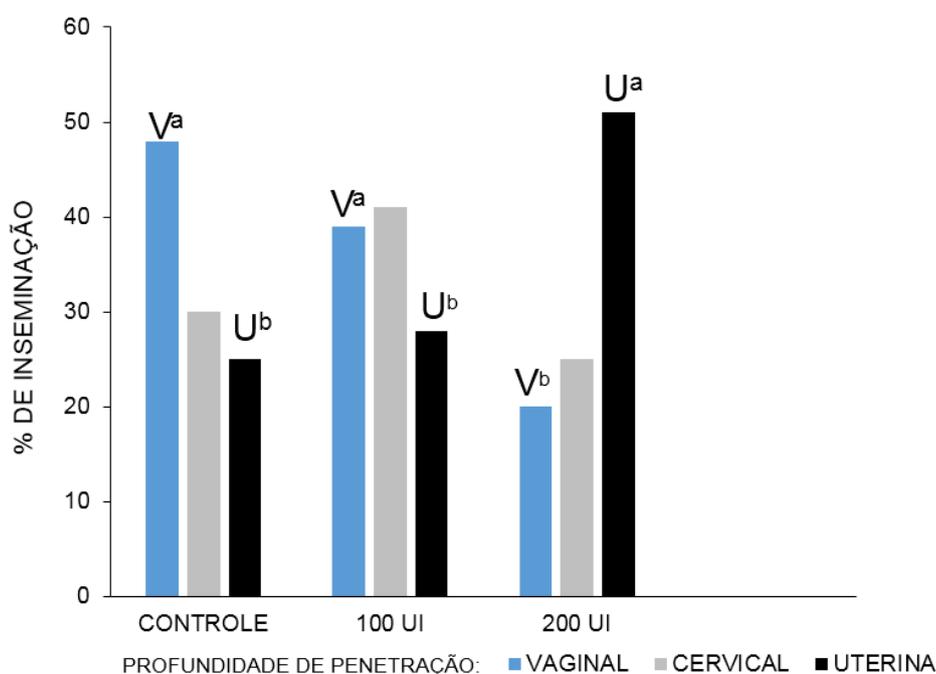
Já a ocitocina promove dilatação cervical, através das contrações uterinas e também devido ao processo enzimático e colagenótico (SAYRE; LEWIS, 1996). No entanto, Stellflug et al. (2001), utilizando a ocitocina como dilatador, verificaram que há uma diminuição na taxa de fertilidade, e Wulster-Radcliffe; Costine; Lewis (1999) verificaram que os riscos de perda embrionária aumentam com o intervalo durante o qual a cérvix permanece dilatada, devido a contrações tetânicas uterinas, cuja duração é em função da dose administrada. Stellflug et al. (2001) também observaram redução da taxa de gestação para animais tratados com ocitocina e inseminados pela via transcervical de 59% para 47%.

Viudes-de-Castro et al. (2009) obtiveram 48,5% com deposição de sêmen em cabras que receberam 200 UI de ocitocina, 15 minutos antes de serem inseminadas pela via transcervical, 25,4%, utilizando 100 UI de ocitocina no grupo que não utilizou qualquer fármaco para dilatar a cérvix, diferente do que foi verificado na porcentagem de inseminação pelas outras duas técnicas (Figura 5). No entanto, outros estudos indicaram um efeito prejudicial da ocitocina sobre a taxa de fertilidade (STELLFLUG et al., 2001; KING et al., 2004). Mesmo a ocitocina dilatando a cérvix e facilitando a passagem da pipeta de inseminação, o mecanismo de ação não é bem conhecido em certo ponto, podendo ter um efeito negativo sobre a fertilidade com doses mais elevadas (VIUDES-DE-CASTRO et al., 2009).

Falchi et al. (2012), avaliando o efeito da administração intracervical do hormônio folículo estimulante (FSH), ocitocina e o misoprostol, isoladamente e em várias combinações, verificaram que não houve diferença significativa entre os grupos tratados. Gusmão et al. (2009) constataram que a deposição de 200 µg de misoprostol no fundo de saco vaginal de ovelhas Santa Inês e Dorper, 5 horas antes da colheita, associada à tração e dilatação mecânica (com o uso da PGE₂, tração cervical com pinça de Pozzi e velas tipo Hegar) da cérvix, possibilitou a transposição cervical, alcançando 94,83% de taxa de sucesso na transposição do canal cervical em ovelhas da raça Dorper, enquanto que, nos animais que não receberam o misoprostol, foi impossível a colheita em 100% (Tabela 2), sendo superior aos

descritos por McKelvey et al. (1997) (MCKELVEY et al., 1997 apud GUSMÃO et al., 2009, p. 315), que utilizaram quatro dias de tratamento com PGE₂ e estradiol e conseguiram 33,0% de eficiência na transposição do canal cervical de ovelhas Suffolk, superando também os resultados encontrados por Croy et al. (1999) (CROY et al., 1999 apud GUSMÃO et al., 2009, p. 315), que, utilizando a interleucina humana, só alcançaram transposição cervical parcial das fêmeas tratadas.

Figura 5 – Efeito do tratamento com ocitocina antes da IA sobre a distribuição de profundidade da deposição de sêmen em caprinos Murciano-Granadina. Letras sobrescritas diferem entre si. V= vaginal; U= uterina (Fonte: Adaptado de Viudes-de-Castro et al., 2009).



Barbas et al. (2003), avaliando o efeito da administração às 36 e 56 h após a remoção de dispositivos intravaginais, de vários fármacos sobre o relaxamento muscular cervical, observaram que a associação misoprostol (análogo sintético da PGE₁) e sulfato de terbutalina (agonista dos receptores β -adrenérgicos) aumentou, significativamente, a penetrabilidade cervical, 15 minutos após a sua administração, ocorrendo um efeito sinérgico desta associação sobre o relaxamento e a penetrabilidade cervical.

Tabela 2 – Transposição da cérvix e colheita transcervical de embriões, sem (T1) e com (T2) administração de Misoprostol como agente dilatador cervical em ovelhas Dorper (Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2009).

Variável	T1	T2
Animais (n)	10	58,0
Animais colhidos	0 ^a	55,0 ^b
Execução (min)	-	30,1 ± 9,0
Meio recuperado (%)	-	95,7

^{a, b} Valores com letras sobrescritas diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tuckey (P<0,05).

Gusmão et al. (2007) compararam as ações das prostaglandinas F_{2α} (PGF_{2α}) e E₁ (PGE₁) na colheita transcervical, em circuito fechado, de ovelhas Santa Inês superovuladas com FSH, constatando a eficiência da ação desses hormônios na transposição cervical (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantidade média de embriões resultante da colheita transcervical com administração de PGF_{2α} e PGE₁ como agente dilatador cervical de ovelhas Santa Inês superovuladas com FSH (Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2007).

	PGF _{2α}	PGE ₁	Sem Dilatador
Nº de animais tratados	17	19	13
Nº de animais colhidos não cirurgicamente	10 ^a	12 ^a	0 ^b
Tempo de execução (min) (% ± σ)	27,30 ± 7,65 ^a	32,75 ± 9,83 ^a	-
Quantidade de meio recuperado (%)	95,6 ^a	95,7 ^a	-
Quantidade de embriões viáveis (% ± σ)	3,30 ± 3,47 ^a	4,00 ± 4,33 ^a	-
Quantidade de estruturas degeneradas (% ± σ)	3,20 ± 2,44 ^a	2,50 ± 8,64 ^a	-
Quantidade de estruturas totais (%)	6,50 ± 2,01 ^a	6,50 ± 4,66 ^a	-

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas (P<0,05).

A Tabela 3 mostra que, utilizando a PGF_{2α} ou PGE₁, foi obtida uma permeabilidade da cérvix de 59% e 63%, respectivamente, o que não foi possível

quando não se utilizou nenhum fármaco como dilatador, mostrando, assim, que o uso de um dilatador possibilita uma transposição da cérvix, sem interferir de maneira negativa na produção e qualidade dos embriões.

Guimarães et al. (2013), também utilizando o misoprostol no fundo do saco vaginal, seis horas antes da colheita e acoplado uma sonda nasogástrica ao êmbolo do aplicador de inseminação artificial para bovinos para acessar o útero, obtiveram uma passagem cervical de 63,63% em ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês, enquanto que, nos animais do grupo Controle (sem misoprostol), foi impossível a passagem em 63,64% das doadoras (Tabela 4), demonstrando que, mesmo não havendo diferença entre os grupos estudados (Controle e Misoprostol), a técnica de colheita transcervical é possível em ovelhas e que, com a aplicação prévia do misoprostol e a utilização das pinças na tração da cérvix e a colocação do êmbolo do aplicador de inseminação artificial para bovinos, para auxiliar a dilatação mecânica do canal cervical, melhora a eficiência da colheita transcervical.

Tabela 4 – Número e percentual de animais submetidos à colheita transcervical de embriões (número de animais colhidos), tempo gasto (média \pm e.p.; minutos) para a passagem da sonda e para a execução da colheita, além da taxa de recuperação (%) sem (Grupo Controle) e com administração de misoprostol (Grupo Misoprostol) como agente dilatador cervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês superovuladas com pFSH (Fonte: Adaptado de Guimarães et al., 2013).

Variável	Grupos	
	Controle*	Misoprostol**
Nº de animais	11	11
Nº de animais colhidos (%)	4 (36,36)	7 (63,64)
Tempo (min)		
Passagem da sonda	23,06 \pm 6,49	15,69 \pm 1,91
Execução da colheita	114,77 \pm 10,71	72,03 \pm 10,29
***Taxa de recuperação	12,28 (21/171)	12,00 (21/175)

*Aplicação de solução fisiológica, seis horas antes da colheita transcervical no canal vaginal;

Aplicação de misoprostol, seis horas antes da colheita transcervical no canal vaginal; * (Número de estruturas colhidas / número de corpos lúteos) x 100 (P>0,05).

Outros estudos utilizando dilatadores têm sido realizados, como aquele realizado por Candappa; Bartlewski (2014), que observaram o efeito da Cervidil (PGE₂) intravaginal, como um mecanismo de liberação lenta desse hormônio, na dilatação cervical de ovelhas cíclicas, obtendo resultados positivos, uma vez que o fármaco em questão aumentou a taxa de penetração da cérvix (Tabela 5).

Tabela 5 – A penetrabilidade cervical, duração total do procedimento (DT), tempo final de tentativas (FT) e concentrações/proporções de estradiol/progesterona (E₂:P₄) para ovelhas cíclicas Rideau Arcott x Polled Dorset tratadas com Cervidil® e seus respectivos controles (Fonte: Adaptado de Candappa e Bartlewski, 2014).

Variável/Grupo	Tratamento		Controle	
	12-h (n = 5)	24-h (n = 6)	12-h (n = 6)	24-h (n = 5)
Penetrabilidade cervical	2/5 (40%)	4/6 (67%) ^a	1/6 (16%)	0/5 (0%) ^b
DT (seg)	168 ± 22	110 ± 29	170 ± 28	180 ± 26
FT (seg)	38 ± 23	27 ± 5	154	-
E ₂ - 24 h antes (pg/mL)	2,4 ± 0,4 ^A	1,8 ± 0,4	2,9 ± 0,4 ^A	1,5 ± 0,2
E ₂ - 12 h antes (pg/mL)	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,4	2,6 ± 0,5	1,6 ± 0,5
E ₂ - TCET (pg/mL)	1,7 ± 0,3 ^B	1,7 ± 0,4	1,9 ± 0,5 ^B	1,2 ± 0,2
P ₄ - 24 h antes (ng/mL)	3,4 ± 0,6	2,6 ± 0,4 ^A	2,7 ± 0,3 ^{Cc}	2,9 ± 0,6
P ₄ - 12 h antes (ng/mL)	3,8 ± 0,4	4,0 ± 0,7	3,5 ± 0,5 ^D	3,4 ± 0,6
P ₄ - TCET (pg/mL)	4,1 ± 0,5	3,8 ± 0,6 ^B	3,7 ± 0,6 ^d	3,6 ± 0,4
E ₂ : P ₄ - 24 h antes	0,9 ± 0,3 ^C	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2 ^E	0,6 ± 0,1
E ₂ : P ₄ - 12 h antes	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,07	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,3
E ₂ : P ₄ - TCET	0,4 ± 0,08 ^D	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2 ^F	0,4 ± 0,07

Devido aos baixos números de penetração das ovelhas controle, não há comparações de FT entre os grupos de tratamento e controle.

Uma diferença significativa (P<0,05) entre os dois valores indicados pelas letras: a, b, c, d – entre colunas; A, B, C, D, E, F – entre linhas.

No entanto, alguns fármacos sintéticos, além de serem de alto custo e de difícil acesso, ainda apresentam resultados variáveis e inconsistentes. Com isso, tem-se buscado estudos a partir de plantas a fim de verificar a aplicabilidade de substâncias provenientes de produtos naturais e que sejam de baixo custo, fácil

aquisição e seguras para serem utilizadas em animais (CHIWORORO; OJEWOLE, 2009).

2.1.4.1. Dilatadores cervicais alternativos

Atualmente, estudos têm sido desenvolvidos para verificar o efeito de substâncias naturais na reprodução animal, como o uso de *Papaver rhoeas* L. (Papoula-ordinária), que, por possuir compostos fenólicos, tem atividade antioxidante ao adsorver ou neutralizar radicais livres, tendo a capacidade de diminuir os danos oxidativos ao oócito, quando adicionado ao meio de maturação (EL; KARAKAYA, 2004; ALPINAR et al., 2009; KOSTIC et al., 2010). Toustani et al. (2013) relataram que, na concentração de 50 g/mL, a suplementação com extrato de *Papaver rhoeas* L. no meio de maturação melhorou a taxa de maturação oocitária em ovinos.

Bhutani et al. (2004), trabalhando com *Symplocos racemosa*, avaliaram o efeito da administração oral do seu extrato aquoso nos níveis de LH e FSH de ratas, verificando que o extrato dessa planta aumentou os níveis desses hormônios, quando comparados ao grupo controle, que não recebeu o extrato, sendo de grande importância, uma vez que a diminuição das gonadotrofinas LH e FSH pode gerar uma falha da função gonadal e cessar o ciclo reprodutivo de fêmeas. Também têm sido conduzidos estudos utilizando extratos etanólicos brutos e óleos essenciais, no relaxamento da musculatura cervical (PEREIRA, 2006). Como o semiárido do Nordeste brasileiro possui plantas que têm extratos e óleos essenciais com diversas funções na atividade reprodutiva, esta região e sua flora se constituem como uma fonte alternativa de princípios ativos para favorecer a reprodução, facilitando a transposição da cérvix.

Silva (2010) e Oliveira (2013) conduziram estudos avaliando o efeito miorrelaxante de extratos de uma espécie do gênero *Erythroxylum* sobre o músculo liso da traqueia e do útero de ratos, respectivamente, constatando sua eficiência.

Já Santos; Silva; Oliveira (2013), também trabalhando com o extrato bruto de *Erythroxylum caatingae* (EBEc), avaliou seu efeito *in vivo* na cérvix ovina, sendo obtida uma contratilidade cervical de $90,8 \pm 6,6\%$ da amplitude de contração basal, ao administrar 0,15 M de solução salina. Já com a infusão de 2 mg de EBEc, houve o miorrelaxamento cervical de $56,6 \pm 8,7\%$ por 20 minutos, havendo a dissipação do

efeito 30 minutos após a infusão, retornando o valor de amplitude inicial, constatando a eficácia desse extrato na redução da pressão intracervical de ovinos, reduzindo sua contração.

Magalhães (2002) relatou que o OECn (óleo essencial de *C. nepetifolius*) promoveu relaxamento do músculo liso traqueal, detectando determinada especificidade desse efeito nessa musculatura, uma vez que há preferência pela inibição da histamina à PGF_{2α}. Esse efeito miorelaxante no músculo liso da traqueia deve-se, em parte, à influência em conjunto de seus constituintes: metil-eugenol, terpineol e o 1,8-cineol. Já Pereira (2006) avaliou o efeito do OECn, que é um agente natural, volátil e de baixa toxicidade, na musculatura lisa cervical de ovelhas na fase luteal e constatou que este é um potente miorelaxante que age nas contrações espontâneas, reverte a contração potássica induzidos por Acetilcolina.

Pereira et al. (2012) avaliaram o efeito *in vitro* do óleo de *C. nepetifolius* na musculatura cervical durante a fase luteal em cérvix ovinas oriundas de abatedouro, onde constatou-se uma inibição de 100% das contrações de toda musculatura cervical, com uma concentração de 300 µg/mL do óleo e verificou também que o OECn, além de ser um agente natural, volátil, de baixa toxicidade, se apresentou ainda com alta potência sobre a musculatura lisa cervical de ovelhas.

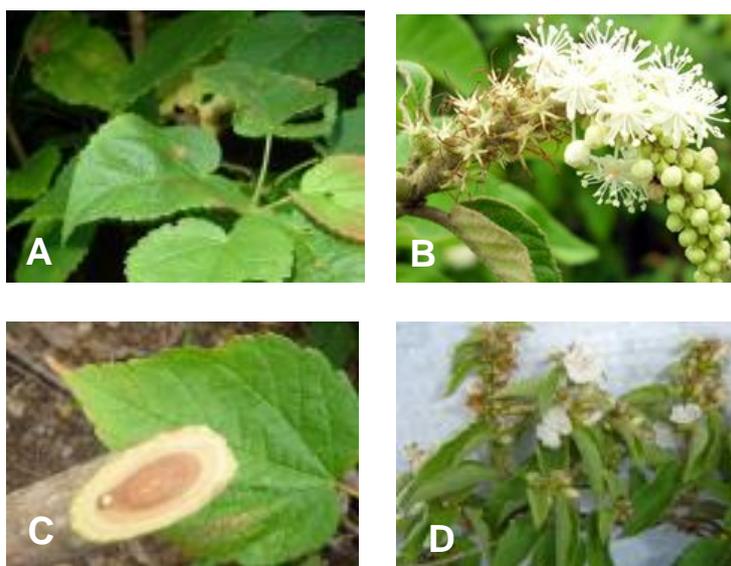
2.1.4.2. *Croton nepetifolius* Baill

O gênero *Croton*, pertencente à família Euforbiaceae, possui é uma árvore de pequeno porte, popularmente conhecida como marmeleiro vermelho ou marmeleiro sabiá, sendo o de maior dispersão no Nordeste brasileiro, inclusive no Ceará, podendo também ser encontrado nos cerrados, matas litorâneas e, principalmente, na caatinga (CRAVEIRO, 1981; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004; CANUTO, 2005).

Esta planta é pertencente ao grupo de espécies chamados marmeleiros que, semelhante às outras plantas deste gênero, é produtor de óleo essencial com aroma agradável e característico. É um arbusto que possui folhas com limbo triangular, com base cordato-subtruncado ou levemente cordado e providas de glândulas estipitadas e de margens duplamente serradas (Figura 6). As flores são pequenas, reunidas em cachos e os frutos são cápsulas tricocas. Suas folhas e cascas são, frequentemente, utilizadas na medicina popular para aliviar distúrbios gastrintestinais na forma de

chás e infusões (CRAVEIRO et al., 1980; LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004).

Figura 6 – Amostras de *C. nepetaefolius* Baill. (a) folhas com limbo triangular, oval e agudo; (b) frutos; (c) caule internamente avermelhado; (d) flores pequenas reunidas em inflorescência do tipo cacho (Fonte: Adaptado de Pereira, 2006).



A composição química, assim como os demais óleos essenciais, tem influência de fatores ambientais de onde a planta é colhida. É constituído, principalmente, por (% em peso de óleo) 1,8-cineol (25%), conhecido também como eucaliptol, metil-eugenol (14,9%), biciclogermacreno (11%) e xanthoxilina (10,1%), dentre outros de menor importância na sua contribuição percentual. Seu óleo exerce um efeito antiespasmódico no tecido gastrointestinal, inespecífico para as contrações da acetilcolina e histamina, reverte hipertensão pelo relaxamento do músculo liso vascular e pela sua atuação no sistema nervoso autônomo, além de possuir atividades antimicrobiana, antiinflamatória e de atuar na musculatura lisa cervical (MAGALHÃES et al., 1998; CATUNDA JÚNIOR, 2003; CANUTO, 2005; MAGALHÃES, LAHLOU; LEAL-CARDOSO, et al., 2004; MORAIS et al., 2006; PEREIRA, 2006).

Logo, a dilatação da cérvix ovina poderia ser obtida através do uso de compostos bioativos extraídos dos vegetais, constituindo uma alternativa viável.

2.2. Justificativa

As biotecnologias da reprodução têm sido amplamente aplicadas em ovinos na região Nordeste do Brasil, na tentativa de melhorar quantitativa e qualitativamente a produção desses animais, cuja criação é considerada fonte de renda de muitas famílias, desde que sejam corrigidos os déficits nos manejos sanitário, nutricional e reprodutivo.

Dentre as biotécnicas da reprodução, aquela de maior aplicação, a inseminação artificial, tem sido limitada na ovelha pela dificuldade de ser realizada pelo método transcervical, a qual é uma técnica que oferece baixo custo operacional, causando pouco estresse aos animais, porém resultando em baixas taxas de concepção com sêmen fresco, resfriado ou congelado-descongelado. Então, com o intuito de quebrar a barreira cervical, têm sido utilizados fármacos sintéticos a fim de dilatar o canal cervical e, assim, permitir a IA transcervical. Tais dilatadores convencionais ainda oneram bastante, por serem de difícil aquisição e ainda apresentam resultados variáveis e inconsistentes, se fazendo necessário, portanto, o uso de produtos alternativos para reduzir esse custo.

Dessa forma, a descoberta de um dilatador cervical extraído de forma racional e sustentável da vegetação da própria região semiárida, mais especificamente da Caatinga, trará um aumento no retorno econômico fruto da IA, aumentando a fertilidade. Inúmeras plantas vêm sendo pesquisadas, demonstrando suas atividades farmacológicas relevantes, no entanto o potencial destas plantas como fonte de novas drogas ainda permanece, em grande parte, inexplorado cientificamente. Nesse contexto, o óleo essencial do gênero *Croton*, mais especificamente, o *Croton nepetifolius* Baill (Marmeleiro vermelho), pode ser uma alternativa. Seu óleo essencial, além de ser um agente natural, é volátil, de baixa toxicidade e pode ser de fácil aquisição, já que pode ser encontrado na própria Caatinga do Nordeste do Brasil.

Assim o uso do óleo essencial poderá promover a dilatação cervical a baixo custo viabilizando a deposição intrauterina do sêmen, aperfeiçoando os índices de fertilidade através da IA transcervical.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. *Objetivo Geral*

- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Croton nepetifolius* Baill na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês.

2.3.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Croton nepetifolius* na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês quanto à (ao):
 - Tempo de passagem do mandril;
 - Profundidade de penetração da cérvix.
- Verificar uma possível correlação entre o momento do estro e o efeito do óleo essencial de *Croton nepetifolius* na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês através da avaliação do (a):
 - Morfologia do óstio cervical caudal
 - Coloração dos epitélios vaginal e cervical;
 - Quantidade, cor e padrões de cristalização do muco cervical.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1. Aspectos éticos

O experimento foi realizado após a aprovação institucional do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF-SERTÃO), sendo todo o protocolo experimental conduzido conforme os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, sob o Protocolo nº 007/2015.

2.4.2. Local de execução

O experimento ocorreu no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano – IF-Sertão, em Petrolina, Pernambuco, localizado a 9° 23' 34" S, 40° 30' 28" O e numa altitude de 376 m. A temperatura média anual é de 26,4 °C e a umidade é de 58% (EMBRAPA, 2005).

2.4.3. Animais experimentais

Foram utilizadas 40 ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês, com idade de (média \pm erro padrão) $3,38 \pm 0,15$ anos, escore de condição corporal $3,35 \pm 0,05$ e com, no mínimo, uma parição, sendo selecionadas após ultrassonografia, evitando assim, que algum animal prenhe, bem como portador de alguma patologia genital, fizesse parte do experimento. Foram, ainda, utilizados quatro carneiros Dorper, de libido comprovada para detecção de estro. Os animais foram submetidos a um regime semi-intensivo de produção, onde, pela manhã tinham acesso ao pasto de Tifton (*Cynodon spp.*) e, no período da tarde, eram recolhidas em instalações cobertas, recebendo capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado no cocho, bem como água e sal mineral à vontade. O manejo sanitário foi baseado no controle anti-helmíntico de todos os animais, uma semana antes do início dos protocolos experimentais, utilizando-se o produto à base de Moxidectina à 1% (Cydectin®, FORT DODGE, Brasil), na dose de 1 mL para cada 50 kg de peso, aplicada por via subcutânea.

2.4.4. Sincronização do estro

Todas as ovelhas receberam por via intravaginal, um dispositivo liberador de progesterona (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), o qual permaneceu na porção cranial da vagina por 14 dias. No momento da retirada do CIDR (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), também foi administrado, por via intramuscular, 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil).

2.4.5. Detecção do estro

Decorridas 12 horas da retirada do CIDR (EASI-BREED CIDR[®], Pfizer, Brasil), iniciou-se a detecção do estro, sendo repetida a cada quatro horas, até a última ovelha sair do estro. Para isto, foi utilizado quatro carneiros Dorper, os quais ficaram expostos às fêmeas por, no mínimo, 30 minutos. A ovelha foi considerada em estro, quando se manteve imóvel à tentativa de monta feita pelo macho (Mauléon; Dautzier 1965).

2.4.6. Coleta e Obtenção do óleo essencial de *Croton nepetifolius* (OECn)

Coleta do material vegetal

As folhas e inflorescências de *Croton nepetifolius* foram coletadas na localidade chamada Cachoeira do Urubu, divisa entre os estados do Ceará e Piauí (Brasil), em abril de 2015. Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, Ceará, Brasil.

Obtenção do óleo essencial

As folhas frescas foram cortadas em pedaços e submetidas à extração do óleo essencial por hidrodestilação, durante duas horas, em aparelho tipo Clevenger. O óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro e o rendimento foi calculado com base no peso da planta fresca. O óleo essencial obtido era incolor e com odor característico. O óleo foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e mantido na geladeira em temperatura abaixo de 4°C até o momento do seu uso.

Análise do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas da marca Shimadzu (QP2010 Ultra, Shimadzu

Corporation, Kioto, Japão) equipado com um autoinjeter (AOC-20i, Shimadzu Corporation, Kioto, Japão). A separação foi realizada em coluna capilar de sílica fundida (DB-1) com dimensões de 30 m × 0,25 mm de diâmetro interno, e 0,25 µm para o tamanho das partículas, em um fluxo constante de hélio (99.999%), que foi usado como gás de arraste. O volume de injeção foi de 100 µL.

Análise qualitativa e quantitativa

Os dados foram adquiridos e processados em um computador usando o software Shimadzu GC-MS-Solution. A identificação dos constituintes químicos foi assinalada com base na comparação dos seus índices de retenção relativa com os de uma mistura de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₉-C₁₉), bem como pela comparação dos espectros de massas armazenados na biblioteca de dados espectrais Wiley 8 e NIST05, instaladas no equipamento.

A composição do óleo encontra-se descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição química do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* Baill.

Nome do composto	IKL*	OEMS3CU-F1 ¹	IKC
α-Pineno	939	0,27	932
Sabineno	975	2,5	971
1,8-Cineol	1031	15,96	1029
4-Terpineol	1177	0,58	1183
α-Terpineol	1188	3,03	1198
β-Elemeno	1390	2,77	1402
Metil-Eugenol	1403	32,76	1418
(<i>E</i>)-Cariofileno	1419	13,53	1430
α-Humuleno	1454	1,44	1461
Espatulenol	1578	1,21	1574
Óxido de cariofileno	1583	1,31	1579
Xanthoxilina	1668	3,96	1655
Fluoroglucinol trimetil éter		1,63	1420
Total		80,96	

*(IK)L. Índice de Kovats da Literatura

¹ Óleo Essencial Marmeleiro Sabia 3 Cachoeira do Urubu-Folhas Inflorescências.

2.4.7. Delineamento experimental e mensuração da penetrabilidade cervical

No momento da retirada do CIDR, as 40 ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês foram igualmente (n = 10) distribuídas, ao acaso, em quatro grupos experimentais: CONTROLE, Misoprostol, OECn50 e OECn100, descritos a seguir:

- **CONTROLE:** as ovelhas receberam no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa (Figura 7), 5 mL de solução fisiológica a 0,9% NaCl (Solução Fisiológica 0,9%®, Equiplex, Brasil), 54 h após a retirada do CIDR e 5 minutos antes de iniciar a mensuração da penetrabilidade cervical. Para tanto, foi utilizada uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial bovina (Bainha francesa, IMV®, França).
- **PGE-MISOPROSTOL:** foi administrado, no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa (Figura 7), um análogo da PGE1, o Misoprostol (Prostokos®, Hebron, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda., Brasil), 48 h após a retirada do CIDR e seis horas antes da IA. Para tanto, foi utilizada uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial bovina. O Misoprostol foi administrado na dose de 200 µg/ovelha, onde 1 comprimido de 200 µg foi, previamente, diluído em 5 mL de solução fisiológica (Solução Fisiológica 0,9%®, Equiplex, Brasil)
- **OECn50:** Foi administrado, no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa (Figura 7), 54 h após a retirada do CIDR e 5 minutos antes de iniciar a mensuração da penetrabilidade cervical, 50 µg/mL do óleo de *Croton nepetifolius*. Para tanto, foi utilizada uma seringa hipodérmica de 1 mL (Seringa descartável para insulina com agulha®, Descarpack, China)
- **OECn100:** Grupo que recebeu o mesmo procedimento utilizado no grupo OECn50, porém sendo aplicado 100 µg/mL do óleo de *Croton nepetifolius*.

Figura 7: (A) Introdução do espéculo vaginal para visualização da cérvix; (B) administração no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, com auxílio de uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial.



Para aplicar os tratamentos e avaliar a profundidade e tempo de penetrabilidade cervical em cada grupo experimental, as ovelhas foram contidas na posição quadrupedal para minimizar os movimentos laterais e para frente, sendo os parâmetros avaliados nos tempos 0, 24, 48, 54, 60, 66 e 72 h após a retirada do CIDR. Posteriormente, o períneo foi limpo e, em seguida, introduzido um espéculo com fonte de luz para visualização da cérvix. Depois de visualizada a cérvix, a extremidade do mandril do aplicador de inseminação artificial bovina (Aplicador Universal Nacional[®], Alta Genetics, Brasil), adaptado com graduações de 0,5 cm, foi posicionada no orifício externo da cérvix (para se tornar o “ponto zero”). Em seguida, o mandril foi introduzido para dentro da cérvix e avançado até o máximo permitido, ponto este registrado como a profundidade de penetração cervical (Figura 8).

Figura 8: Avaliação da profundidade e tempo de penetrabilidade cervical.



2.4.8. Morfologia cervical e vaginal

Imediatamente antes dos momentos de avaliação da penetrabilidade cervical, foi avaliada a morfologia vaginal e cervical, sendo o óstio cervical caudal classificado de tipo Roseta, Fenda e Bico de Pato (KERSHAW et al., 2005).

Inicialmente, mucosas vaginal e cervical foram avaliadas quanto à coloração, o que ocorreu desde o momento da retirada do CIDR até 72 h após, sendo classificada como: branca, rosa e vermelho escuro (LEETHONGDEE et al., 2007).

Também durante os mesmos momentos, foi avaliada a quantidade, a coloração e o aspecto histológico do muco cervical. Quanto à quantidade, a produção de muco cervical foi classificada como: descarga de muco baixo (sem descarga de muco cervical que fluiu a partir da abertura da cérvix), descarga de muco médio (algum corrimento cervical em torno da área da abertura da cérvix), descarga de muco elevado (descarga de muco cervical abundante na abertura da cérvix, corrimento de muco cervical correndo para fora da abertura da cérvix e um acúmulo de descarga cervical na vagina). Já a coloração do muco cervical foi classificada como: clara, amarela ou rosa (LEETHONGDEE et al., 2007).

Quanto ao aspecto histológico, foi realizado um esfregaço (lâminas) do muco cervical utilizando um swab estéril (Swab Coleta®, Swab Coleta®, Global Trade Technology, Brasil). As lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente durante 15 minutos e, logo em seguida, foi avaliada sob microscopia óptica, a um aumento de 100X, retirada uma fotografia para posterior análise dos diferentes padrões de cristalização (Figura 9), sendo estes classificados como: incompleto ou de cristalização atípica, de cristalização completa ou típica e degradados cristalização (MENÁRGUEZ et al., 2003).

Figura 9: (A) Swab do muco cervical; (B) Avaliação da lâmina, para classificação dos padrões de cristalização do muco cervical.



2.4.9. Parâmetros avaliados

Foram registradas as seguintes variáveis: proporção de fêmeas em estro; intervalo entre a retirada do CIDR e o estro (h); morfologia do óstio cervical caudal; coloração de epitélios cervical e vaginal; cor, aspecto e quantidade de muco cervical; padrões de cristalização do muco cervical; proporção de fêmeas com cérvix penetrada; profundidade de penetração da cérvix; tempo de passagem do mandril de IA.

2.4.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, utilizou-se a Análise de Variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e foram consideradas estatisticamente diferentes quando apresentarem nível de significância menor que 5% ($P < 0,05$). Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste Qui-quadrado. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Foi utilizado o programa ASSISTAT Versão 7.7 beta (2016).

2.5. RESULTADOS

No tocante à avaliação da morfologia cervical, inicialmente, foi registrada a proporção de cada formato do orifício cervical externo, sendo encontrado 29,73% de cérvix do tipo Roseta, seguido de 27,02% do tipo Fenda, 21,62% do Bico de Pato, 13,51% do tipo Flap e 8,11% do tipo Papila.

No momento da retirada do CIDR, foi possível penetrar a cérvix em 50% dos animais dos grupos Controle, Misoprostol e OECN100, bem como em 70% das ovelhas do grupo OECN50. No horário de 54 horas após a retirada do CIDR, foi alcançado 40% no grupo Controle, 60% no grupo Misoprostol, 70% nos grupos OECN50 e OECN100 de penetrabilidade cervical.

Já em relação ao tempo de passagem (minutos), as médias dos tempos de penetrabilidade cervical não diferiram entre períodos pós remoção de CIDR, mas sim entre grupos de tratamento cervical dentro de alguns momentos pós remoção do CIDR (Tabela 7). No horário de 54 horas após a retirada do CIDR, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos, para o tempo penetrabilidade cervical ($P > 0,05$). O Grupo OECn100 apresentou um menor tempo de penetrabilidade quando comparado com o Grupo Controle, às 60 e 66 horas após a remoção do CIDR, mas não houve diferença significativa quando comparado com os demais grupos. E, às 72 h, o Grupo OECn100 apresentou um menor tempo de penetrabilidade quando comparado com o Grupo OECn50 e o Grupo Controle, mas não houve diferença quando comparado com o Grupo Misoprostol (Tabela 7).

Tabela 7: Tempo de penetrabilidade (minutos) na cérvix (média \pm erro padrão) de ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês de acordo com o grupo de tratamento: Controle, Misoprostol, OECn50 e OECn100.

Tratamento	Tempo de penetrabilidade cervical em relação à remoção do CIDR (minutos)						
	0	24	48	54	60	66	72
Controle	2,9 \pm 0,6 ^{aA}	3,3 \pm 0,4 ^{aA}	2,6 \pm 0,6 ^{Aa}	2,6 \pm 0,6 ^{Aa}	4,1 \pm 0,6 ^{aA}	4,4 \pm 0,5 ^{aA}	4,0 \pm 0,7 ^{aA}
Misoprostol	2,6 \pm 0,5 ^{aA}	3,0 \pm 0,3 ^{aA}	2,4 \pm 0,5 ^{Aa}	2,8 \pm 0,7 ^{Aa}	1,7 \pm 0,6 ^{bA}	3,3 \pm 0,6 ^{abA}	2,2 \pm 0,5 ^{abA}
OECn50	2,2 \pm 0,5 ^{aA}	2,0 \pm 0,6 ^{aA}	3,4 \pm 0,6 ^{Aa}	2,9 \pm 0,6 ^{Aa}	2,3 \pm 0,6 ^{abA}	1,9 \pm 0,5 ^{bA}	3,9 \pm 0,5 ^{aA}
OECn100	2,7 \pm 0,6 ^{aA}	1,5 \pm 0,5 ^{aA}	1,8 \pm 0,4 ^{Aa}	2,6 \pm 0,6 ^{Aa}	1,5 \pm 0,6 ^{bA}	1,6 \pm 0,6 ^{bA}	0,9 \pm 0,4 ^{bA}

^{A, B} Valores com letras maiúsculas sobrescritas distintas entre colunas, diferem ($P < 0,05$).

^{a, b} Valores com letras minúsculas sobrescritas distintas entre linhas, diferem ($P < 0,05$).

No que se refere ao grau de profundidade cervical, não foi verificada diferença significativa entre os grupos de tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8: Profundidade (cm) da cérvix (média \pm erro padrão) de ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês de acordo com o grupo de tratamento: Controle, Misoprostol, OECn50 e OECn100.

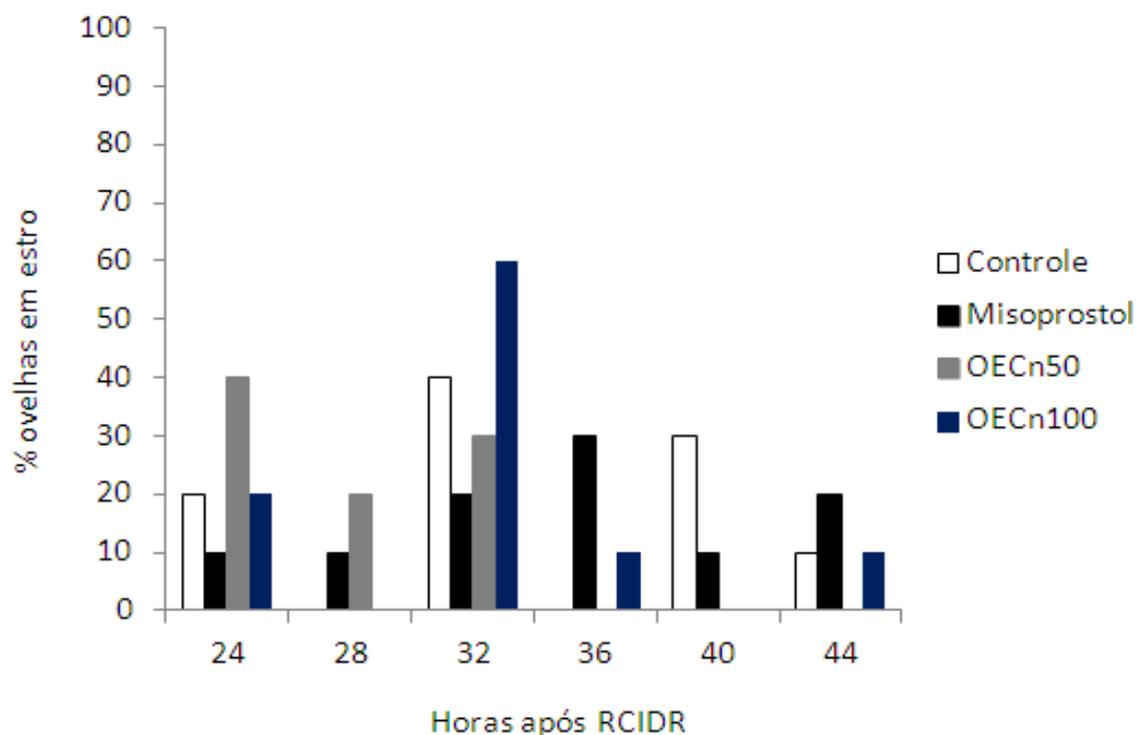
Tratamento	Profundidade cervical em relação à remoção do CIDR (cm)						
	0 h	24 h	48 h	54 h	60 h	66 h	72 h
Controle	5,25 \pm 1,04	3,50 \pm 1,21	3,45 \pm 0,90	2,85 \pm 0,88	3,30 \pm 0,90	2,40 \pm 0,80	3,40 \pm 0,88
Misoprostol	4,05 \pm 0,91	2,60 \pm 0,74	4,56 \pm 0,85	4,10 \pm 0,91	5,65 \pm 0,89	4,60 \pm 0,77	4,95 \pm 0,79
OECn50	5,15 \pm 0,95	2,40 \pm 0,80	3,95 \pm 0,75	4,75 \pm 0,78	4,75 \pm 0,75	4,20 \pm 0,80	4,95 \pm 0,74
OECn100	4,55 \pm 0,99	4,30 \pm 0,75	5,30 \pm 0,49	4,75 \pm 0,98	4,75 \pm 0,91	4,70 \pm 0,74	5,80 \pm 0,62

$P>0,05$.

Com relação ao comportamento estral, todas as ovelhas (100%) apresentaram estro, independentemente do grupo tratado, sendo o intervalo de tempo médio (\pm erro padrão) entre a retirada do CIDR e o início do estro de 34,00 \pm 1,96, 36,40 \pm 2,56, 28,40 \pm 1,26 e 32,00 \pm 1,62 h, para os grupos Controle, Misoprostol, OECn50 e OECn100, respectivamente ($P>0,05$) (Figura 10).

A Figura 10 mostra, ainda, que os animais não tratados com óleo essencial *C. nepetifolius* (grupos Controle e Misoprostol) iniciaram o comportamento estral de forma dispersa e tardia. Em contrapartida, os animais tratados com o óleo essencial *C. nepetifolius*, seja na concentração de 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram uma maior concentração de inícios de estro e de forma precoce, onde, até 32 h após a retirada do CIDR, 90% e 80% dos animais dos grupos OECN50 e OECn100, respectivamente, iniciaram o estro.

Figura 10: Percentual de ovelhas mestiças (Dorper vs. Santa Inês) exibindo estro de acordo com o grupo (Controle vs. Misoprostol vs. OECn50 vs. OECn100).



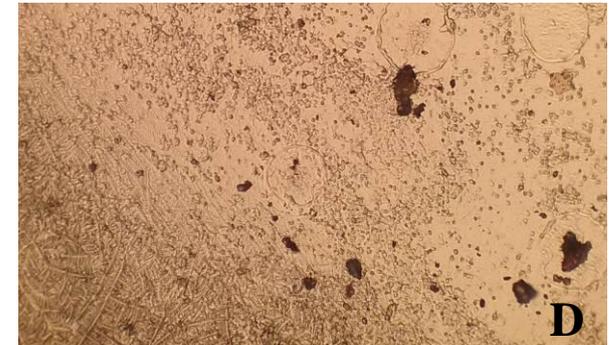
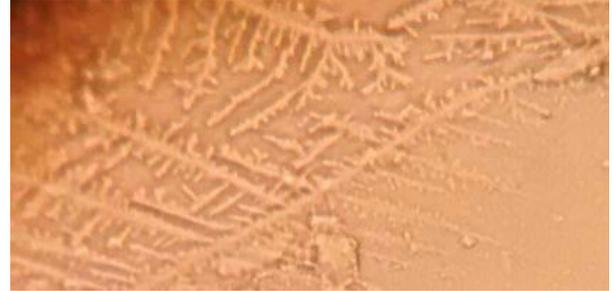
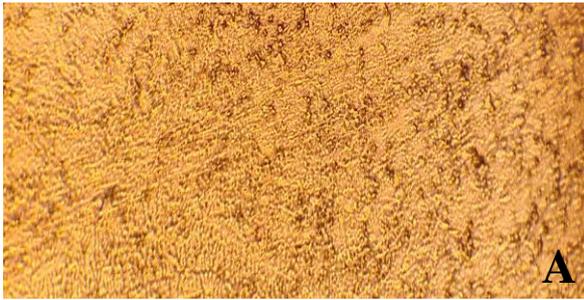
Do momento da retirada do dispositivo (0 h) até 60 horas após sua retirada, foi verificado um aumento da descarga de muco cervical, sendo reduzido às 72 horas (Tabela 3). No que se refere à coloração dos epitélios vaginal e cervical em relação à retirada do CIDR, em todos os momentos de observação, predominou as ovelhas que apresentavam epitélios vaginal e cervical de coloração rosa (Tabela 9). Durante todo tratamento, os animais não apresentaram epitélio vaginal de coloração branca ou vermelho escuro (Tabela 9).

Tabela 9: Padrões de mudança, expressos em porcentagem, da cor do epitélio vaginal e cervical, características do muco cervical em ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês em diferentes tempos (horas) após a retirada do dispositivo CIDR.

	Tempo em relação à retirada do CIDR (h)							P-valor
	0	24	48	54	60	66	72	
Descarga de muco baixo	90,0	55,0	57,5	32,5	22,5	20,0	62,5	<0,001
Descarga de muco médio	5,0	20,0	27,5	25,0	22,5	30,0	12,5	
Descarga de muco elevado	0,0	12,5	15,0	42,50	50,0	50,0	25,0	
Epitélio vaginal rosa	85,0	97,5	90,0	92,5	90,0	87,5	97,5	0,019
Epitélio vaginal vermelho	15,0	2,5	10,0	7,5	10,0	12,5	2,5	
Epitélio cervical rosa	87,5	92,5	90,0	77,5	57,5	67,5	65,0	<0,001
Epitélio cervical vermelho	12,5	7,5	7,5	22,5	42,5	32,5	35,0	

Os diferentes padrões cristalização do muco cervical, observados em esfregaços coletados em momentos diferentes, durante o período de 0 h até 72 h após retirada do CIDR, são ilustrados na Figura 2. Às 0 h e 24 h após a retirada do CIDR, 90% (Figura 11A) e 75% (Figura 11B) das ovelhas apresentaram cristalização incompleta, respectivamente. A cristalização máxima foi observada às 48 h (Figura 11C) e o início da degradação da cristalização foi observado a partir das 54 h (Figura 11D) até 72 h (Figura 11G) após a retirada do CIDR. A degradação de cristalização máxima foi alcançada às 72 h (Figura 11G).

Figura 11: Padrões de cristalização no muco cervical coletados em momentos diferentes em ovelhas mestiças da Dorper vs. Santa Inês. Cristalização do muco cervical a partir da retirada do CIDR: (A) 0 h; (B) 24 h, cristalização completa e incompleta; (C) 48 h, máxima cristalização no muco coletado; (D) 54 h, cristalização incompleta e início da degradação da cristalização; (E) 60 h, (F) 66 h e (G) 72 h, degradação de cristalização completa.



2.6. DISCUSSÃO

O óstio cervical externo é considerado a primeira barreira a ser quebrada na inseminação artificial. Neste estudo, os tipos de óstio cervical externo mais encontrados foram Roseta, Fenda e Bico de Pato, assim como observado por Franco et al. (2014), trabalhando com ovelhas da raça Santa Inês. Porém, Souza et al. (1994), que estudaram as raças Ideal e Corriedale, encontraram a cérvix do tipo Flap como a mais frequente. Moura et al. (2011), também estudando a raça Santa Inês, porém, observaram a maior frequência de óstio cervical do tipo Liso e Kershaw et al. (2005) registraram o tipo Espiral como o de maior predomínio, embora sem trabalharem com uma raça específica.

A penetrabilidade cervical média foi de 4,27 cm. Resultados semelhantes foram observados por Moura et al. (2011), que alcançaram 4,4 cm de penetração de cérvix. Cruz Jr. (2006) inseriu o mandril na cérvix em torno de 4,68 cm, enquanto Franco et al. (2014) alcançaram 4,13 cm. Já Naqvi et al. (2005) e Kershaw et al. (2005) observaram penetrabilidades de 5,3 e 3,5 cm, respectivamente.

Halbert et al. (1990) e Kershaw et al. (2005) afirmaram que os tipos de óstio caudal da cérvix não influenciaram, significativamente, a taxa de fertilidade em ovelhas e concluíram não ser possível correlacionar o tipo de óstio caudal da cérvix com outras características como o tamanho, número de anéis e espessura.

No que diz respeito ao tempo de penetrabilidade (minutos) cervical, o grupo que utilizou uma concentração de 100 µg do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill (OECn) (dilatador natural) e o misoprostol (dilatador sintético) demorou menos tempo para ter suas cérvices penetradas (OECn – 1 min e 48 s; Misoprostol – 2 min e 34 s, respectivamente), quando comparados com os demais grupos tratados. Nossos resultados foram semelhantes aos de Magalhães et al. (2012), que realizaram a inseminação artificial pela via transcervical, utilizando o misoprostol e o sulfato de terbutalina como dilatador, obtendo um tempo de passagem de 1 min e 53 s e superiores quando comparado com os obtidos por Moura et al. (2011), os quais realizaram a passagem do aplicador seminal durante 6 min e 15 s, assim como com aqueles registrados por Neto (2012), que realizaram a inseminação artificial pela via transcervical, utilizando dilatadores cervicais e obtiveram um tempo de passagem médio de 5 min e 37 s.

O misoprostol é um análogo sintético da prostaglandina E₁ (PGE₁), sendo altamente eficiente na indução da abertura cervical e no estímulo da atividade contrátil do miométrio (NUNES et al., 1999; KATZ et al., 2000). O uso de misoprostol promove o aumento do relaxamento natural do colo do útero em ovelhas em estro, além de elevar a profundidade de penetração máxima 54 horas após a retirada de esponja impregnada com progesterona (LEETHONGDEE et al., 2007).

Já em relação ao óleo essencial de *Croton nepetifolius* Baill, foi verificado que ele promove o relaxamento da musculatura lisa, como o músculo liso do íleo (MAGALHÃES et al., 2004), músculo liso vascular (LAHLOU et al., 2000), músculo liso da traqueia (MAGALHÃES et al., 1998) e músculo liso cervical (PEREIRA, 2006). O óleo possui ação miorelaxante no músculo liso, o qual requer a diminuição dos níveis intracelulares de cálcio e/ou a diminuição da sensibilidade das proteínas contrateis a concentração de cálcio intracelular (MAGALHÃES, 2002).

Pereira (2006), utilizando o OECn, verificou contrações espontâneas no músculo liso cervical da ovelha durante a fase luteal do ciclo estral a partir da concentração de 30 µg/mL, para todos os segmentos musculares, revertendo a contratura potássica e inibindo as contrações produzidas pela acetilcolina. Estes resultados corroboram com os achados no presente estudo, onde foi possível o relaxamento cervical, mesmo não havendo diferença significativa. Magalhães et al. (2003) obtiveram resultados satisfatórios, utilizando também o OECn na concentração de 300 e 600 µg/mL, como antiespasmódico na traqueia, apresentando, também, atividade vasodilatadora.

Um fator importante para penetração cervical está relacionado com a ordem de parto (SOUSA, 1999; ALMEIDA et al., 2002). A ordem de parto assume importância significativa na inseminação pela via transcervical em ovelhas. No presente estudo, foram utilizadas somente ovelhas pluríparas e com, no mínimo, duas parições, sendo verificado que não houve aumento da penetrabilidade (cm) nos tempos após a retirada do CIDR em relação aos grupos de tratamento.

Um aspecto importante que poderia explicar a ausência do efeito de dilatação do OECn50 e OECn100 e do misoprostol seria o grau de dilatação cervical natural de acordo com o momento do estro.

De uma forma geral, a média de duração do estro do estro foi de 36 h, resultados semelhantes àqueles encontrados por Cavalcanti (2008) (37 h),

trabalhando com ovelhas Dorper e Santa Inês e por Hashemi, Safdarian e Kafi (2006) (31 h) que trabalharam com ovelhas da raça Karakul. Padilha et al. (2011) compararam a utilização do CIDR e da esponja impregnada com acetato de medroxiprogesterona (MAP), obtendo um intervalo de 29 e 34 horas, respectivamente, entre a retirada do dispositivo e início do estro. Ribeiro et al. (2015), trabalhando com ovelhas, também utilizaram CIDR para a sincronização do estro e o intervalo encontrado foi, em média, 21 horas. Hashemi, Safdarian e Kafi (2006), utilizando um protocolo de sincronização de estro de 12 dias, associado à administração de eCG em ovelhas, alcançaram uma média de 30 horas de intervalo entre a retirada do dispositivo e o início do estro. Esses achados corroboram com os deste trabalho, uma vez que houve uma maior concentração de início de estro das 24 às 32 horas após a retirada do dispositivo.

Foi possível verificar que há um grau de relaxamento cervical no estro, o qual ocorre naturalmente, permitindo a penetração transcervical em uma pequena proporção de ovelhas pluríparas. Esse relaxamento natural no estro e a ovulação são resultantes das mudanças dos hormônios que ocorrem neste momento. Os aumentos das concentrações de estradiol e de receptores de ocitocina durante o período pré-ovulatório resultam no aumento da síntese de prostaglandina E₂, levando à remodelação da matriz extracelular cervical para relaxar a cérvix (STYS et al., 1981; LEDGER et al., 1983; SHEMESH et al., 1997).

Como os animais do grupo não tratado com o óleo iniciaram seu estro tardiamente, estes, provavelmente, encerraram seu estro de forma mais tardia, quando comparado com os demais grupos que receberam o óleo essencial como dilatador. Assim, a ausência de superioridade na dilatação cervical dos animais tratados com o óleo, parece ser devido a um menor grau de dilatação cervical no fim do estro.

Os resultados observados para a quantidade, coloração e aspecto do muco cervical só confirmam nossa hipótese. No que diz respeito à descarga vaginal, esta pode ser observada um a dois dias antes do início do estro, sendo mais evidentes no seu decorrer (SIQUEIRA, 2006) e o estradiol tem uma grande influência sobre o fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo em ovinos, bem como o aumento deste fluxo reflete na cor do epitélio vaginal e cervical. Nossos resultados sugerem que o fluxo de sangue através dos tecidos vaginais e da cérvix resultou em epitélios de coloração, na sua maioria, rosa, indicando um elevado fluxo de sangue em todo

momento. Já Leethongdee et al. (2007) verificaram que o fluxo de sangue aumentou de um epitélio pálido no tempo 0 h (indicando o fluxo sanguíneo baixo) para um epitélio vermelho ou rosa no tempo de 72 h (elevado fluxo de sangue).

Em relação ao padrão de cristalização, foi verificada a cristalização completa, 48 h após a retirada do CIDR, havendo a máxima secreção de estradiol, decorrente do estro. A cristalização está associada com o aumento de conteúdo aquoso e alterações nas quantidades relativas de glicoproteínas (HONMODE; PACHLAG, 1973; GOULD; ANSARI, 1981). A formação de estruturas semelhantes à folha de samambaia tem uma relação estreita com a viscosidade e elasticidade do muco cervical (LEETHONGDEE et al., 2007).

3.0. CONCLUSÕES

Dessa forma, pode-se concluir que o uso do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill (OECn) nas concentrações de 50 µg e 100 µg, facilita o tempo de penetrabilidade cervical (minutos) ovina, 60 horas após o final de um tratamento progesterônico de sincronização do estro.

A penetrabilidade cervical (cm) resultante do uso do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill (OECn) depende do momento do estro em que a ovelha se encontra.

O óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill (OECn) nas concentrações de 50 µg e 100 µg como dilatador cervical, visando a inseminação artificial, deve ser utilizado às 60 horas após o início do estro, desde que o estro sincronizado através de um tratamento progesterônico termine após a aplicação do dilatador.

Faz-se necessário a realização de mais estudos, utilizando diferentes concentrações, em outras raças ovinas e após diferentes tratamentos progesterônicos, para caracterizar o real papel do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill.

4. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. M. et al. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 82-84, 2002.

ALPINAR, K. et al. Antioxidant capacities of some food plants wildy grown in Ayvalik of Turkey. **Food Science and Technology Research**. v 15, p. 59–64, 2009.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 255-266, 2004.

BARBAS, J. P. et al. Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores da cervix (misoprostol e sulfato de terbutalina) sobre os resultados de IA em raças ovinas locais. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, p. 185-188, 2003.

BARRY, D. M. et al. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. **Theriogenology**, v. 33, p. 190, 1990.

BHUTANI, K. K.; JADHAV, A. N.; KALIA, V. Effect of *Symplocos racemosa* Roxb. on gonadotropin release in immature female rats and ovarian histology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 197–200, 2004.

BICUDO, S. D. et al. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 127-130, 2005.

BIEHL, M. V. **Uso de protocolos reprodutivos em ovelhas da raça santa Inês sobre a sincronização e tempo médio do estro, a taxa de prenhez na IATF e no repasse**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba- SP, 2009.

BREDA, J. C. et al. Dados de alguns parâmetros anatômicos do aparelho reprodutivo de ovelhas da raça Hampshire down e mestiças hampshire down e mestiças hampshire down-ile de France. **Rev. Acad**, v. 5, p.237-242, 2007.

CALDER, A. A. Prostaglandins and biological control of cervical function. **The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 34, p. 347- 351, 1994.

CANDAPPA, I. B. R.; BARTLEWSKI, P. M. A Review of Advances in Artificial Insemination (AI) and Embryo Transfer (ET) in Sheep, with the Special Reference to Hormonal Induction of Cervical Dilation and its Implications for Controlled Animal Reproduction and Surgical Techniques. **The Open Reproductive Science Journal**, v. 3, p. 162-175, 2011.

CANDAPPA, I. B. R.; BARTLEWSKI, P. M. Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p.8, 2014.

CANUTO, K. M. **Efeito atinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial do *Croton argyrophyloides* Muell. Arg.** 2005. 162f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza- CE, 2005.

CATUNDA JÚNIOR, F. E. A. **Estudo químico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Croton*.** 2003. Monografia (Licenciatura Plena em Química). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, 2003.

CAVALCANTE, J. M. M. et al. Plasma seminal ovino e sua aplicação na biotecnologia reprodutiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p. 254-259, 2013.

CAVALCANTI, A. S. **Avaliação do uso do GnRH em protocolos curtos de indução e sincronização do estro e ovulação em ovelhas.** 2008. 112f: Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Niterói, 2008.

CHALLIS, J. R.; SPRAGUE, C.; PATRICK, J. E. Relationship between diurnal changes in peripheral plasma progesterone, cortisol, and estriol in normal women at 30-31, 34-35, and 38-39 weeks of gestation. **Gynecology Obstetrics Investigation**, v. 16, p. 33-44, 1983.

CHIWORORO W.D.; OJEWOLE J.A. Spasmolytic effect of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated uterine horns. **Journal of Smooth Muscle Research**, v.45, n.1, p.31-38, 2009.

CRAVEIRO, A. A. et al. Projeto integrado de química e farmacologia. Relatório de Atividades, Mimeografado, p. 227. 1980.

CRAVEIRO, A. C. **Óleos Essenciais de plantas do Nordeste.** 209f. Fortaleza, CE: Edições UFC, 1981

CROY, B. A. et al. A preliminary study on the usefulness of huil-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. **Theriogenology**, v.52, p. 271-287, 1999.

CRUZ JR, C. A. **Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da ração Santa Inês**. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.

CUNHA, E. et al. Desempenho e características de carcaças de cordeiros Suffolk alimentados com diferentes volumosos. **Ciência rural – Santa Maria**, v. 31, n.3, p. 671-676, 2001

DELGADILLO, J. A. et al. The “male effect” in sheep and goats-Revisiting the dogmas. **Behavioural Brain Research**, v. 200, p. 304-314, 2009.

DEMINICIS, B. B. et al. Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. **Pubvet**, v. 2, p. 319-328, 2006.

DEROSSI, R. et al. Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. **Small Ruminant Research**, v.83, p 74–78, 2009.

DONAVAN, A. et al. Fertility of the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-Thawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p.359-368, 2004.

EL, S. N.; KARAKAYA, S. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, p. 67–74, 2004.

EMBRAPA SEMIÁRIDO 2005. Médias Anuais da Estação Agrometeorológica de Bebedouro. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/servicos/dadosmet/ceb-anual.html>>, acessado 19/01/2016.

FALCHI, L.; TAEMA, M.; LA CLANCHE, S.; SCARAMUZZI, R. J. The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. **Theriogenology**, v. 78, p. 376–384, 2012.

FERANTI, J. P. S. Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação intrauterina laparoscópica em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.687-693, 2013.

FLOHR, S. F.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; LEWIS, G. S. Technical note: development of transcervical oocyte recovery procedure for sheep. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 3583-3586, 1999.

FONSECA, J. F. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia-GO, 2005.

FRANCO, M. C. et al. Morfologia da cérvix de ovelhas santa inês adultas nas fases luteínica e folicular. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, p. 495-501, 2014.

GOULD, K. G.; ANSARI, A. H. Electrolyte interactions in cervical mucus and their relationship to circulating hormone levels. **Contraception**, v. 23, p. 507–16, 1981.

GRANADOS, L. B. C., DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. **Aspectos Gerais da Reprodução de Caprinos e Ovinos**. Projeto PROEX/UENF, Campo dos Goytacazes, 54p. 2006.

GUIMARÃES, A. S. L. et al. **Uso do misoprostol como dilatador cervical na colheita transcervical de embriões em ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês**. In: VII Congresso Nordeste de Produção Animal. **Anais...** Fortaleza-CE, 2013.

GUSMÃO, A. L. et al. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 313-318, 2009.

GUSMÃO, A. L. et al. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça santa Inês no Semiárido Nordeste. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p.1-10, 2007.

GUSMÃO, A. L.; MOURA, A. J. C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 29-33, 2005.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Feminina. **In:** HAFEZ; E. S. E., HAFEZ, B.; **Reprodução Animal**. 7ªed. Barueri: Ed. Manole, São Paulo, p. 13-29, 2004.

HAFEZ, E. S. E. Artificial insemination. **In:** HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. Ed. Manole, São Paulo, p. 424-439, 1993.

HALBERT, G. W.; DOBSON, H.; WALTSON, J. S. The structure of the cervical canal of the ewe. **Theriogenology**, v. 33, p. 977-992, 1990.

HASHEMI, M.; SAFDARIAN, M.; KAFI, M. Estrous response to synchronization of estrus using different progesterone treatments outside the natural breeding season in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 65, p. 279-283, 2006.

HONMODE, J.; PACHLAG, S. V. Time of ovulation and chloride content of vaginal mucus during oestrus in sheep. Indian Journal of Animal Science, v. 43, p. 136–140, 1973.

ISHWAR, A. K.; MEMON, M. A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v. 19, p. 35-46, 1996.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Ovulation induction, embryo production and transfer. **In:** Reproduction in Farm Animals. Eds. Hafz, B. & Hafez, E.S.E., 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins. **Philadelphia**. p. 405-409, 2000.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ªed. Barueri/SP: Manole, 513p. 2004. Cap 12: Ovinos e Caprinos, p. 173-182

KAABI, M. et al. Influence of breed and age on morphometry and depth of insemination catheter penetration in the ewe cervix a postmortem study. **Theriogenology**, v. 66, p. 1876-1883, 2006.

KERSHAW, C. M. et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence of the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p.1225-1235, 2005.

KING, M. E. Et al., Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. **Theriogenology**, v. 62, p. 1236–1244, 2004.

KOSTIC, D. A. et al. Phenolic contents antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from Southeast Serbia. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1727–1732, 2010.

KUSINA, N.T. et al. A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF₂alpha, and their combination on efficacy of oestrous synchronization and fertility of Mashona goat does. **Theriogenology**, v. 53, p.1567-1580, 2000.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.; H.; MAGALHAES, P.; J.; C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through in the activation ipon vasculas smooth muscle:studies in DOCA-SALT hypertensive rats. **Planta Medicinal**, v. 66, p. 138-43, 2000.

LEAL-CARDOSO, J. H., FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 207–213, 1999

LEDGER, W. L.; ELLWOOD, D.L.; TAYLOR, M. J. Cervical softening in late pregnant sheep by infusion of prostaglandin E-2 into a cervical artery. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 69, p.511–515, 1983.

LEETHONGDEE, S. et al. The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. **Theriogenology**, v.67, p.767-777, 2007.

LEPPERT, P. C. Anatomy and physiology of cervical ripening. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 38, p. 267–79, 1995.

MACHADO, V. P. et al. Fertilidade após a inseminação artificial intracervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. **Brazilian Journal of veterinary Research and animal Science**, v. 43, p. 43-49, 2006.

MAGALHÃES, L. C. et al. Efeito da associação de Misoprostol e Sulfato de Terbutalina na dilatação cervical de ovelhas Dorper submetidas à inseminação artificial transcervical. **In: VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Anima (CONERA)**, p. 27-29, 2012

MAGALHÃES, P. J. C. **Estudo farmacológico do óleo essencial *Croton nepetaefolius* Baill. sobre os músculos liso traqueal e vascular sobre as propriedades eletrofisiológicas de neurônios fásicos de gânglio celíaco.** 2002. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza-CE, 2002.

MAGALHÃES, P. J. C. et al. Intestinal myorelaxante and antispasmodic of the essential oil of *Croton nepetaefolius*, and constituents cineole, methyl-eugenol and therpineol. **Phytotherapy Research**, v, 12, p. 172-173, 1998.

MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.18, p. 539-546, 2004.

MAULÉON, P; DAUZIER, K. Variations de durée de l'anoestrus de lactation chez les brebis de race Ile-de-France. **Annales de Biologie Animale Biochimich Biophysic**, v. 5, p.131, 1965.

McKELVEY, W. A. C. et al. The use of exogenous hormones to facilitate transcervical embryo recovery in sheep and their effect on embryo development. **Theriogenology**, v.47, p.369, 1997.

MENÁRGUEZ M.; PASTOR L. M.; ODEBLAD E. Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. **Human Reproduction**, v. 18, p. 1782-1789, 2003.

MONREAL, A. C. D. et al. Deposição de sêmen congelado em ovelhas nativas pela técnica transcervical. **Revista Agrarian**, v. 3, p. 286-292, 2011.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela, v. 3, p.25-56, 2002.

MORAIS, S. M. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Journal American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 161-164, 2006.

MORELLO, H. H.; CHEMINEAU, P. Características anatômicas e funcionais do sistema reprodutor da fêmea. c.2. AISEN, E.G. Reprodução ovina e caprina. 1.ed. São Paulo, **MedVet**, 2008, 203p.

MOURA, D. S. et al. Aspectos morfológicos da cervice de ovelhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 33-38, 2011.

NAQVI, S. M. K. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 337–344, 2005.

NETO, B. M. C. **Dilatadores hormonais cervicais utilizados na inseminação artificial transcervical em substituição a inseminação artificial laparoscópica na espécie ovina**. 2012. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, 2012.

OLIVEIRA, L. D. R. de. **Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo***. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília-DF, 2013.

OLIVEIRA, M. E. F. et al. State-of-the-art in the superovulation of ewes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 25-35, 2011.

OLIVEIRA, V. S. **Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em cabras (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758) utilizadas em Transferência de Embriões**. 1992. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 1992.

PALACIOS, C.; ABECIA, J. A. Meteorological variables affect fertility rate after intrauterine artificial insemination in sheep in a seasonal-dependent manner: a 7-year study. **International Journal of Biometeorology**, v. 59, p. 585-592, 2015.

PEREIRA, A. F. **Caracterização farmacológica parcial da cervice ovina (*Ovis aries*): influencia da fase do ciclo estral na resposta tecidual e atividade miorrelaxante do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* Baill.** 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza-CE, 2006.

PEREIRA, A. F. et al. Relaxant effect of the essential oil of *Croton nepetifolius* on ovine cervix. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 522-527, 2012.

PIRES, B. C. et al. Métodos para elevar o ritmo reprodutivo dos ovinos. **PUBVET-Publicações em Medicina Veterinária**, v. 5, p. 1-24, 2011.

RABASSA, V. R. Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, p. 127-133, 2007.

ROSA, H. J. D.; SILVA, C. C.; BRYANT, M. J. The effect of paddock size on the response of seasonal anoestrous ewes to the ram effect. **Small Ruminant Research**, v. 48, p. 233-237, 2003.

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reproductiva em cabras y ovejas. In: Simpósio sobre o controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes, São Paulo – SP. **Anais...** São Paulo – SP: FMVZ – USP. 2000.

SALAMON, S.; LIGHTFOOT, J. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, p. 409-23, 1970

SANTOS, A. S. S.; SILVA, M. V. R.; OLIVEIRA, S. L. Avaliação da atividade relaxante do extrato etanólico bruto obtido de *Erythroxyllum caatingae*, *Erythroxyllum subrotundum* e *Erythroxyllum revolutum* (erythroxyllaceae) em traquéia isolada de cobaia. **Evolvere Scientia**, v. 1, p. 119-133, 2013.

SANTOS, D. F. Taxa de gestação em fêmeas Santa Inês inseminadas pela via transcervical com sêmen fresco associada ou não à anestesia epidural. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 224-230, 2009

SAYRE, B. L.; LEWIS, G. S. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. **Theriogenology**, v.46, p.233-241, 1996

SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition: Reproductive cyclicity – Terminology and Basic Concepts. 2ªed. USA: **Cadmus Professional Communications**, 1999, 368p

SHEMESH M. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. **Reproduction Fertility Development**, v. 9, p. 525–530, 1997.

SILVA, P. L. **Ação antiespasmódica do trans-cariofileno e o bloqueio de canais para Ca²⁺ em músculo liso traqueal de rato**. 2010. f:95. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza-CE, 2010.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.234-246, 2007.

SIQUEIRA, A.; P. Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte-MG, 2006.

SOUSA, J. H. M. **Coleta de embriões e resposta superovulatória utilizando diferentes preparações de FSH em ovelhas deslanadas na região semi-árida da Paraíba**. 1999. 57f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, Areia. Souza et al., 1999.

STELLFLUG J. N. et al. Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *Journal Animal Science*, v. 79, p. 568–573, 2001

STYS, S. J. et al. Effect of prostaglandin E2 on cervical compliance in pregnant ewes. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 140, p. :415–419, 1981.

ULDBJERG N. Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 147, p.662–666, 1983.

VANNOZZI, I. Laparoscopic cryptorchidectomy in a cat- case report. **Journal feline medicine and surgery**, v.4, p.201-203, 2002.

VERBERCKMOES, S. et al. Cervical insemination in sheep. **Theriogenology**, v.70, p. 475-480, 2001.

VIUDES-DE-CASTRO, M. P. et al. Effect of Oxytocin Treatment on Artificial Insemination with Frozen–Thawed Semen in Murciano–Granadina Goats. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 576–579, 2009.

WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; COSTINE, B. A.; LEWIS, G. S. Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: Application to transcervical embryo transfer. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 2587-2593, 1999.

WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; WANG, S.; LEWIS, G. S. Transcervical insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, v. 62, p. 990-1002, 2004.

ANEXOS



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SERTÃO PERNAMBUCANO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Croton nepetaefolius BAILL (MARMELEIRO VERMELHO) COMO DILATADOR CERVICAL NA COLHEITA TRANSCERVICAL DE EMBRIÕES EM OVELHAS DO SEMIÁRIDO DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO” e sua relação com a fertilidade do rebanho”, Protocolo nº 007/2015, sob a responsabilidade de EDILSON SOARES LOPES JUNIOR, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano.

We certify that the Research “USO DO ÓLEO ESSENCIAL DE Croton nepetaefolius BAILL (MARMELEIRO VERMELHO) COMO DILATADOR CERVICAL NA COLHEITA TRANSCERVICAL DE EMBRIÕES EM OVELHAS DO SEMIÁRIDO DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO” protocol number 007/2015, under the responsibility of EDILSON SOARES LOPES JUNIOR, is agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by The Ethics Committee in Animal Studies of Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano.

Petrolina, 11 de junho de 2015.

Prof. Rodolfo de Moraes Peixoto
Coordenador do Comitê de Ética no uso Animais
IF SERTÃO-PE

26/01/2016

ScholarOne Manuscripts

 Ciência Rural

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Ciência Rural

Manuscript ID

CR-2016-0075

Title

Effect of the essential oil of *Croton nepetaefolius* Baill on cervical penetration in crossbred Dorper X Santa Inês ewes

Authors

Guimarães, Aionne
Silva, Eldo
Mudo, George Antonio
Silva, Ana
Bastos, Bruna
Silva, Helder Anderson
Nascimento, Thiago
Silveira, Edilberto
Cordeiro, Mabel
Silva, Jackson Roberto
Lopes Júnior, Edilson

Date Submitted

26-Jan-2016

[Author Dashboard](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2015. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)