



## Efeito do óleo essencial do *Croton nepetifolius* Baill na penetração cervical em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês

[Effect of the essential oil of *Croton nepetifolius* Baill on cervical penetration in crossbred Dorper and Santa Inês ewes]

A.S.L. Guimarães<sup>1</sup>, E.S. Lopes Júnior<sup>1</sup>, L.G.M. Ribeiro<sup>1\*</sup>, E.G.S. Silva<sup>1</sup>, G.A.M. Mudo<sup>1</sup>, A.A.A. Silva<sup>1</sup>,  
B.D.M. Bastos<sup>1</sup>, H.A.L. Silva<sup>1</sup>, T.V.C. Nascimento<sup>2</sup>, D.A.S. Carrero<sup>3</sup>, E.R. Silveira<sup>3</sup>,  
M.F. Cordeiro<sup>1</sup>, J.R.G.S. Almeida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco – Petrolina, PE

<sup>2</sup>Programa pós-graduação – Universidade Federal da Bahia – Salvador, BA

<sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, Ceará

### RESUMO

A fim de se avaliar o uso do óleo essencial de *Croton nepetifolius* Baill (OECn) na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças, 40 ovelhas foram distribuídas ao acaso em quatro grupos (n=10): controle, misoprostol, OECn50 e OECn100 (50 e 100µg do OECn, respectivamente). Após a sincronização do estro, utilizando CIDR e eCG (200UI), a profundidade de penetração da cérvix foi mensurada utilizando-se uma pipeta de inseminação artificial de bovino graduada, no período de zero até 72h após a retirada do CIDR. Os resultados foram expressos em média ± erro-padrão, submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey, enquanto os dados, em porcentagem, foram submetidos aos testes de Fisher ou qui-quadrado. Nenhuma diferença significativa (P>0,05) foi encontrada quanto ao grau de penetrabilidade cervical. Quanto ao tempo de passagem, os grupos misoprostol e OECn100 apresentaram um menor tempo de penetrabilidade às 60h (1,7±0,6 e 1,5±0,6min, respectivamente), quando comparados ao grupo controle (4,1±0,6min), que não diferiu significativamente do grupo OECn50 (2,3±0,6min). Portanto, o óleo essencial de *Croton nepetifolius* Baill pode ser utilizado para encurtar o tempo de penetrabilidade cervical em ovelhas submetidas à sincronização estral.

Palavras-chave: ovelha, cérvix, dilatação, marmeleiro

### ABSTRACT

In order to evaluate the use of the essential oil of *Croton nepetifolius* Baill (EOCn) on cervical penetration in crossbred ewes, 40 ewes were randomly allocated into four groups (n= 10): CONTROL, MISOPROSTOL, EOCn50 and EOCn100 (50 e 100µg of the EOCn, respectively). After estrus synchronization, using CIDR and eCG (200IU), depth of cervical penetration was measured using artificial insemination gun for bovine species which was graduated and used from 0 to 72h after CIDR removal. Results were expressed as mean ± standard error mean, submitted to ANOVA and Tukey test while data in percentage were submitted to Fisher or Chi-Square test. No significant difference (P> 0.05) was observed at grade of cervical penetration. Concerning trespassing time, MISOPROSTOL and EOCn100 groups presented a lower trespassing time at 60h (1.7±0.6 and 1.5±0.6min, respectively) than CONTROL group (4.1±0.6min), which did not differ significantly from EOCn50 (2.3±0.6min) group. Therefore, the essential oil of *Croton nepetifolius* Baill can be used to shorten the cervical penetration time in estrus synchronized ewes.

Keywords: sheep, cervix, dilatation, marmeleiro

Recebido em 21 de dezembro de 2017

Aceito em 23 de maio de 2018

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: laisamedeiros@hotmail.com

A.S.L. Guimarães<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0001-9472-2263  
E.S. Lopes Júnior<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0002-4790-8134  
L.G.M. Ribeiro<sup>1\*</sup>,  
https://orcid.org/0000-0002-1691-7855  
E.G.S. Silva<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0003-4521-1891  
G.A.M. Mudo<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0003-2300-2415  
A.A.A. Silva<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0002-5646-0458  
B.D.M. Bastos<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0002-8923-5150  
H.A.L. Silva<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0003-2347-0200  
T.V.C. Nascimento<sup>2</sup>,  
http://orcid.org/0000-0002-9569-3107  
D.A.S. Carrero<sup>3</sup>,  
http://orcid.org/0000-0002-8577-8959  
E.R. Silveira<sup>3</sup>,  
http://orcid.org/0000-0003-4178-0296  
M.F. Cordeiro<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0003-1963-7311  
J.R.G.S. Almeida<sup>1</sup>,  
http://orcid.org/0000-0002-0867-1357

## INTRODUÇÃO

Entre as biotécnicas aplicadas à reprodução, a inseminação artificial (IA) é uma das principais tecnologias reprodutivas que contribuem significativamente para a melhoria genética do rebanho, por meio do uso de reprodutores geneticamente superiores. No entanto, os baixos índices reprodutivos desse método em ovinos podem ser atribuídos à conformação anatômica da cérvix, que dificulta a deposição intrauterina do sêmen e diminui, assim, a taxa de penetração espermática em 50%, em função da variabilidade individual e da habilidade do inseminador (Palacios e Abecia, 2015).

A múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) também é uma biotécnica que tem como entrave o tamanho, o formato e a tortuosidade da cérvix ovina, o que dificulta tanto a coleta como a transferência pela via transcervical, que é uma alternativa à coleta cirúrgica, a fim de aumentar a vida útil reprodutiva das fêmeas (Fonseca *et al.*, 2011). A conformação da cérvix, por sua vez, sofre grande influência da raça utilizada. A Santa Inês é a raça ovina mais difundida no país, em razão de sua capacidade de adaptação e potencial de rendimento de carcaça (Oliveira *et al.*, 2010). Já a raça Dorper é originária da África do Sul, e sua introdução no nordeste brasileiro tem sido amplamente utilizada no cruzamento com raças nativas, como a Santa Inês, a fim de aumentar a produtividade local e melhorar geneticamente os rebanhos (Carneiro *et al.*, 2007).

Assim, a IA permite a expansão de populações de animais com capacidade melhorada. Mas as taxas de gestação após IA pela via transcervical ainda são variáveis. Em decorrência da dificuldade de transportar os anéis cervicais, têm-se utilizado algumas drogas como dilatadores cervicais, como a ocitocina associada ao cloridrato de bromexina (Almeida *et al.*, 2002), e a prostaglandina E1 (PGE<sub>1</sub>) associada ao sulfato de terbutalina (Barbas *et al.*, 2003), 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, têm-se buscado estudos com plantas a fim de verificar a aplicabilidade de substâncias que sejam de baixo custo e seguras para serem utilizadas em animais.

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). O *Croton nepetifolius* (Euforbiaceae) produz um óleo que exerce diversos efeitos sobre a musculatura lisa, tendo efeito relaxante e antiespasmódico (Pereira, 2006). Pereira *et al.* (2012) avaliaram o efeito *in vitro* do óleo de *Croton nepetifolius* na musculatura cervical durante a fase luteal em cérvices ovinas oriundas de abatedouro e constataram uma inibição de 100% das contrações de toda musculatura cervical. Magalhães (2002) relatou que o OECn (óleo essencial de *C. nepetifolius*) promoveu relaxamento do músculo liso traqueal e detectou determinada especificidade desse efeito nessa musculatura. O 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. Todavia, não existem estudos no tocante ao efeito do uso do óleo essencial do *C. nepetifolius* (OECn) sobre a dilatação cervical de ovelhas no momento da inseminação artificial. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso do óleo essencial de *Croton nepetifolius* Baill na penetrabilidade cervical em ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado após a aprovação institucional do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF-Sertão), eo protocolo experimental foi conduzido conforme os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do referido Instituto, sob o Protocolo nº007/2015. O experimento foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, em Petrolina, Pernambuco, localizado a 9° 23' 34" S, 40° 30' 28" O e em uma altitude de 376m. A temperatura média anual é de 26,4°C, e a umidade é de 58% (Médias..., 2005). Foram utilizadas 40 ovelhas mestiças Dorper e Santa Inês, com idade de (média ± erro-padrão) 3,38±0,15 anos, escore de condição corporal 3,35±0,05 e com, no mínimo, uma parição, sendo selecionadas após ultrassonografia. Foram, ainda, utilizados quatro carneiros Dorper, de libido comprovada para detecção de estro.

Os animais foram submetidos a um regime semi-intensivo de produção, em que, pela manhã, tinham acesso ao pasto de Tifton (*Cynodon spp.*) e, no período da tarde, eram recolhidos 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. Todas as ovelhas receberam, por via intravaginal, um dispositivo liberador de progesterona (EASI-BREED CIDR<sup>®</sup>, Pfizer, Nova Zelândia), o qual permaneceu na porção cranial da vagina por 14 dias. No momento da retirada do CIDR, também foram administrados, por via intramuscular, 200UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon<sup>®</sup>, Intervet/Schering-Plough, Brasil). Decorridas 12 horas da retirada do CIDR, iniciou-se a detecção do estro, sendo repetida, a cada quatro horas, até a última ovelha sair do estro. As folhas e as inflorescências de *Croton nepetifolius* foram coletadas na localidade: Cachoeira do Urubu, divisa entre os estados do Ceará e do 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. 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 e foi acondicionado em frasco de vidro âmbar, mantido na geladeira, em temperatura abaixo de 4°C, até o momento do seu uso. 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 30m × 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm 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 100µL. Os dados foram adquiridos e processados em um computador, usando-se 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 (C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub>), bem como pela comparação dos espectros de massas armazenados na biblioteca de dados espectrais Wiley 8 e NIST05, instaladas no equipamento.

No momento da retirada do CIDR, as 40 ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês foram igualmente (n= 10) distribuídas, ao acaso, em quatro grupos experimentais: controle, misoprostol, OECn50 e OECn100, descritos a seguir: (1) controle: as ovelhas receberam, no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, 5mL de solução fisiológica a 0,9% NaCl (Solução Fisiológica 0,9%<sup>®</sup>, Equiplex, Brasil), 54h após a retirada do CIDR e cinco minutos antes de se iniciar a mensuração da penetrabilidade cervical. Para tanto, foi utilizada uma seringa acoplada a uma bainha plástica de inseminação artificial bovina (Bainha francesa, IMV<sup>®</sup>, França); (2) misoprostol: foi administrado, no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, um análogo da PGE1, o misoprostol (Prostokos<sup>®</sup>, Hebron, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Ltda., Brasil), 48h após a retirada do CIDR e seis horas antes da IA. O misoprostol foi administrado na dose de 200µg/ovelha, sendo 1 comprimido de 200µg, previamente diluído em 5mL de solução fisiológica; (3) OECn50 e (4) OECn100: foram administrados, no fundo do saco vaginal, próximo à abertura cervical externa, 54h após a retirada do CIDR e cinco minutos antes de se iniciar a mensuração da penetrabilidade cervical, 50µg/mL e 100µg/mL do óleo de *Croton nepetifolius*, respectivamente. Para aplicar os tratamentos e avaliar a profundidade e o tempo de penetrabilidade cervical em cada grupo experimental, as ovelhas foram contidas na posição quadrupedal, sendo os parâmetros avaliados nos tempos zero, 24, 48, 54, 60, 66 e 72h após a retirada do CIDR. Posteriormente, o períneo foi limpo e, em seguida, introduziu-se um espécúlo com fonte de luz para visualização da cérvix. Então, a extremidade do mandril do aplicador de inseminação artificial bovina (Aplicador Universal Nacional<sup>®</sup>, Alta Genetics, Brasil), adaptado com graduações de 0,5cm, foi posicionada no orifício externo da cérvix (para se tornar o “ponto zero”).

Em seguida, o mandril foi introduzido para dentro da cérvix e avançou até o máximo permitido, ponto esse registrado como a profundidade de penetração cervical. 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 72h após, sendo classificada como: branca, rosa e vermelha-escura (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. As lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente durante 15 minutos e, logo em seguida, foram avaliadas sob microscopia óptica, a um aumento de 100x, retirada uma fotografia para posterior análise dos diferentes padrões de cristalização, sendo esses classificados como: incompleto ou de cristalização atípica, de cristalização completa ou típica e degradação da cristalização (Menárguez *et al.*, 2003). 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).

## RESULTADOS

Os padrões de cristalização do muco cervical, coletado em momentos diferentes, entre zero e 72h após retirada do CIDR, estão na Fig. 1. À zero hora e às 24h após a retirada do CIDR, 90% (Fig. 1A) e 75% (Fig. 1B) das ovelhas apresentaram cristalização incompleta, respectivamente. A cristalização máxima foi observada às 48h (Fig. 1C) e o início da degradação da cristalização foi observado a partir das 54h (Fig. 1D) até 72h (Fig. 2G). A degradação de cristalização máxima foi alcançada às 72h (Fig. 1G).

No tocante à avaliação da morfologia cervical, inicialmente foi registrada a proporção de cada formato do orifício cervical externo, sendo encontrados 29,73% de cérvix do tipo roseta, seguido de 27,02% do tipo fenda, 21,62% do tipo 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, foram alcançados 40% no grupo controle, 60% no grupo misoprostol, 70% nos grupos OECN50 e OECN100 de penetrabilidade cervical, porém também sem diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma, não foi verificada diferença significativa entre os grupos de tratamentos ( $P > 0,05$ ) quanto ao grau de profundidade cervical, sendo obtidos os valores médios de  $3,45 \pm 0,94$ ,  $4,35 \pm 0,83$ ,  $4,30 \pm 0,79$  e  $4,87 \pm 0,78$  para os grupos controle, misoprostol, OECN50 e OECN100, respectivamente. Já em relação ao tempo de passagem, as médias dos tempos de penetrabilidade cervical não diferiram entre períodos pós-remoção de CIDR, mas entre grupos de tratamento cervical dentro de alguns momentos pós-remoção do CIDR (Tab. 1).

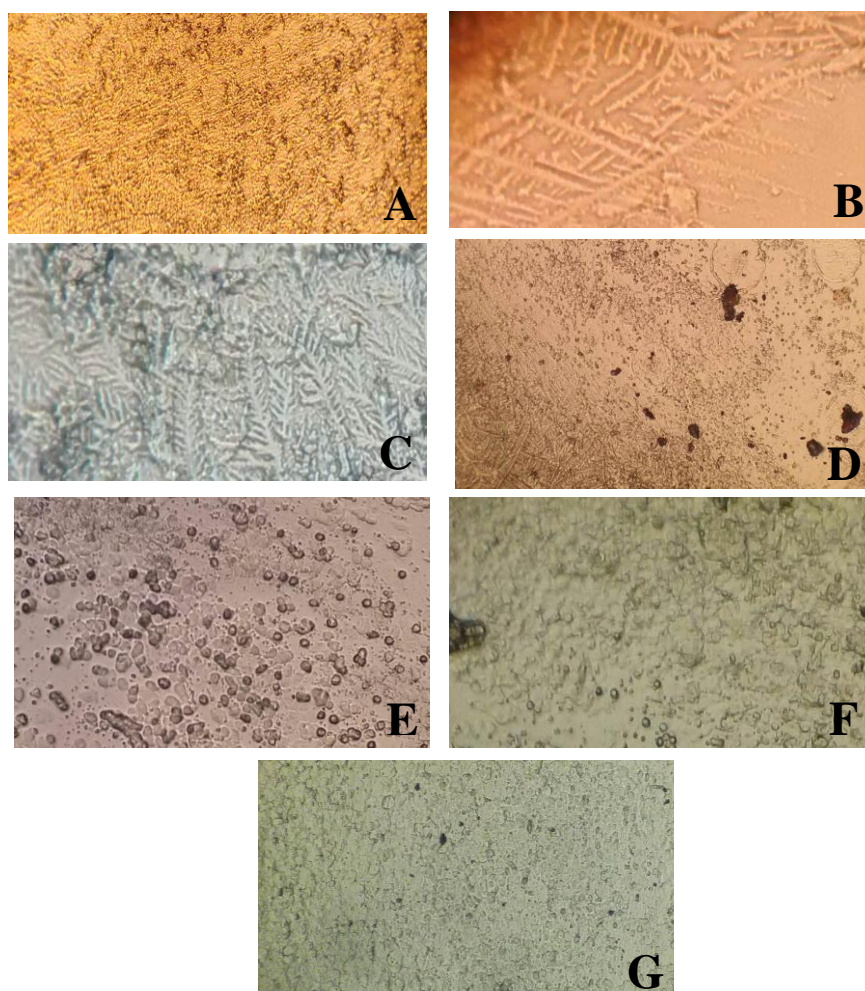


Figura 1. Padrões de cristalização no muco cervical coletado em momentos diferentes em ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês (aumento de 100x). Cristalização do muco cervical após a retirada do CIDR: (A) zero hora; (B) 24h, cristalização completa e incompleta; (C) 48h, máxima cristalização no muco coletado; (D) 54h, cristalização incompleta e início da degradação da cristalização; (E) 60h, (F) 66h e (G) 72h, degradação de cristalização completa.

Tabela 1. Tempo de penetrabilidade (minutos) na cérvix (média  $\pm$  erro-padrão) de ovelhas mestiças de Dorper e Santa Inês, de acordo com o grupo de tratamento: controle, misoprostol, OECn50 e OECn100

Momento da avaliação do tempo de penetrabilidade cervical (horas pós-remoção do CIDR)	Grupos de tratamento			
	Controle	Misoprostol	OECn50	OECn100
0	2,9 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	2,6 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	2,2 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	2,7 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>
24	3,3 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>	3,0 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	2,0 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	1,5 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>
48	2,6 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	2,4 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	3,4 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	1,8 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>
54	2,6 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	2,8 $\pm$ 0,7 <sup>aA</sup>	2,9 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	2,6 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>
60	4,1 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	1,7 $\pm$ 0,6 <sup>ba</sup>	2,3 $\pm$ 0,6 <sup>abA</sup>	1,5 $\pm$ 0,6 <sup>ba</sup>
66	4,4 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	3,3 $\pm$ 0,6 <sup>abA</sup>	1,9 $\pm$ 0,5 <sup>ba</sup>	1,6 $\pm$ 0,6 <sup>ba</sup>
72	4,0 $\pm$ 0,7 <sup>aA</sup>	2,2 $\pm$ 0,5 <sup>abA</sup>	3,9 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	0,9 $\pm$ 0,4 <sup>ba</sup>

<sup>A, B</sup> Valores com letras maiúsculas, sobrescritas distintas entre linhas, diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

<sup>a, b</sup> Valores com letras minúsculas, sobrescritas distintas entre colunas, diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

### Efeito do óleo...

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. Às 72h, o grupo OECn100 apresentou um menor tempo de penetrabilidade quando comparado com o grupo OECn50 e o grupo controle, no entanto não houve diferença quando comparado com o grupo misoprostol (Tab. 1). 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 ( $P>0,05$ ). Além disso, os animais não tratados com óleo essencial *C. nepetifolius* (grupos controle e misoprostol) iniciaram o comportamento estral de forma dispersa e tardia (60% e 40%, respectivamente). Em contrapartida, os animais tratados com o óleo essencial *C. nepetifolius*, na concentração de 50 ou de  $100\mu\text{g/mL}$ , apresentaram maior concentração de inícios de estro e de forma precoce, uma vez que até 32h após a retirada do CIDR, 90% e 80% dos animais dos grupos OECn50 e OECn100, respectivamente, iniciaram o estro. Do momento da retirada do dispositivo (zero hora) até 60 horas após sua retirada, foi verificado aumento da descarga de muco cervical, sendo reduzido às 72 horas (Tab. 2).

Tabela 2. Padrões de mudança, expressos em porcentagem, da cor dos epitélios vaginal e cervical, características do muco cervical em ovelhas mestiças de Dorper e 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	
Descarga de muco médio	5,0	20,0	27,5	25,0	22,5	30,0	12,5	<0,001
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	

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 (Tab. 2). Durante todo o tratamento, os animais não apresentaram epitélio vaginal de coloração branca ou vermelha-escura.

### 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), ao trabalharem com ovelhas da raça Santa Inês. A penetrabilidade cervical média foi de 4,27cm. Resultados semelhantes foram observados por Moura *et al.* (2011), que alcançaram 4,4cm de penetração de

cérvice, enquanto Franco *et al.* (2014) alcançaram 4,13cm. Já Naqvi (2005) observou penetrabilidade de 5,3cm. Kershaw *et al.* (2005) afirmaram que os tipos de óstio caudal da cervix não influenciaram, significativamente, a taxa de fertilidade em ovelhas e concluíram não ser possível correlacionar o tipo de óstio caudal da cervix com outras características, como o tamanho, o número de anéis e a espessura.

No que diz respeito ao tempo (minutos) de penetrabilidade cervical, o grupo que utilizou uma concentração de  $100\mu\text{g}$  do óleo essencial *Crotonnepetifolius* Baill (OECn) e o misoprostol demorou menos tempo para ter suas cérvices penetradas (OECn – 1min e 48s; Misoprostol – 2min e 34s, respectivamente). Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos de Magalhães *et al.* (2012), que realizaram a inseminação artificial pela via transcervical, mediante a utilização do misoprostol e do sulfato

de terbutalina como dilatadores, e obtiveram um tempo de passagem de 1 min e 53s e superiores quando comparado com os obtidos por Moura *et al.* (2011), os quais realizaram a passagem do aplicador seminal durante 6min e 15s. O misoprostol é um análogo sintético da prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>), sendo altamente eficiente na indução da abertura cervical e no estímulo da atividade contrátil do miométrio.

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 fêo (Magalhães *et al.*, 2004), músculo liso vascular (Lahlou *et al.*, 2000), músculo liso da traqueia (Magalhães, 2002) e músculo liso cervical (Pereira, 2006). Ele atua diminuindo os níveis intracelulares de cálcio e/ou a sensibilidade das proteínas contráteis à concentração de cálcio intracelular (Magalhães, 2002).

Pereira (2006), ao utilizar o OECn, verificou contrações espontâneas no músculo liso cervical da ovelha durante a fase luteal do ciclo estral a partir da concentração de 30µg/mL, para todos os segmentos musculares, a qual reverteu a contração potássica e inibiu as contrações produzidas pela acetilcolina. Esses resultados corroboram os achados no presente estudo, em que foi possível o relaxamento cervical, mesmo não havendo diferença significativa. Magalhães *et al.* (2003) obtiveram resultados satisfatórios, quando utilizaram também o OECn nas concentrações de 300 e 600µg/mL, como antiespasmódico na traqueia, o qual apresentou, também, atividade vasodilatadora. Um fator importante para a penetração cervical está relacionado com a ordem de parto (Almeida *et al.*, 2002), que assume influência 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 foi de 36h, resultados semelhantes àqueles encontrados por Cavalcanti (2008) (37h), ao trabalhar com ovelhas Dorper e Santa Inês, e por Hashemi *et al.* (2006) (31h), que trabalharam com ovelhas da raça Karakul. Ribeiro *et al.* (2015), quando trabalharam com ovelhas, também utilizaram CIDR para a sincronização do estro, e o intervalo encontrado foi, em média, 21 horas. Esses achados corroboram os deste trabalho, uma vez que houve 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 E<sub>2</sub>, levando à remodelação da matriz extracelular cervical para relaxar a cérvix (Shemesh, 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 comparados com os animais dos 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, a coloração e o aspecto do muco cervical só confirmam a hipótese aqui discutida. No que diz respeito à descarga vaginal, esta pode ser observada um a dois dias antes do início do estro, sendo mais evidente no seu decorrer (Siqueira, 2006), e o estradiol tem uma grande influência sobre o fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo em ovinos. Além disso, o aumento desse fluxo reflete na cor dos epitélios vaginal e cervical. Os resultados do presente estudo 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 zero hora (indicando o fluxo sanguíneo baixo) para um epitélio vermelho ou rosa no tempo 72h (elevado fluxo de sangue). Em relação ao padrão de cristalização, foi verificada a cristalização completa, 48h 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 (Gould; Ansari, 1981). A formação de estruturas semelhantes à folha de samambaia tem uma relação estreita com a viscosidade e elasticidade do muco cervical.

### CONCLUSÃO

Pode-se, portanto, concluir que o uso do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill (OECn), nas concentrações de 50µg e 100µg, 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 50µg e 100µg, como dilatador cervical, visando à inseminação artificial, deve ser utilizado às 60 horas após o início do estro, desde que o estro sincronizado por meio de um tratamento progesterônico termine após a aplicação do dilatador. Faz-se necessária a realização de mais estudos, que utilizem diferentes concentrações, em outras raças ovinas e após diferentes tratamentos progesterônicos, para caracterizar o real papel do óleo essencial *Croton nepetifolius* Baill.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao professor M.Sc. Fernando Medina (*in memoriam*) e ao Dr. Osvaldo Coelho (*in memoriam*), pelos animais e por todo apoio e infraestrutura que foram dados na condução experimental deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V.M.; CÂMARA, D.R.; SALLES, H.O. *et al.* Colheita de embriões via transcervical em ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, p.82-84, 2002.
- BARBAS J.P.; CAVACO G.S.; BAPTISTA M.C. *et al.* *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, v.98, p.185-188, 2003.
- CARNEIRO, P.L.S.; MALHADO, C.H.M.; SOUZA-JÚNIOR, A.A.O. *et al.* Desenvolvimento ponderal e diversidade fenotípica entre cruzamentos de ovinos Dorper com raças locais. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.42, p.991-998, 2007.
- 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, RJ.
- FONSECA, J.F.; OLIVEIRA, M.E.F.; VIANA, J.H.M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.113-117, 2011.
- FRANCO, M.C.; SANTOS, J.F.; MACIEL, T.A. *et al.* Morfologia da cérvix de ovelhas Santa Inês adultas nas fases luteínica e folicular. *Cienc. Anim. Bras.*, 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.507-516, 1981.
- 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 Res.*, v.65, p.279-283, 2006.
- KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, 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.
- LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MAGALHAES, P.J.C. Essential oil of *croton nepetaefolius* decreases blood pressure through in the activation upon vasculas smooth muscle: studies in DOCA-SALT hypertensive rats. *Planta Med.*, v.66, p.138-143, 2000.



- LEETHONGDEE, S.; KHALID, M.; BHATTI, A. *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.
- MAGALHÃES, L.C.; BARROS, C.H.S.C.; MONTE, A.P.O. *et al.* Efeito da associação de misoprostol e sulfato de terbutalina na dilatação cervical de ovelhas Dorper submetidas à inseminação artificial transcervical. In: Anais do VICONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2012, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: Renorbio, 2012. p.27-29.
- 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. 185f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, CE.
- MAGALHÃES, P.J.C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fund. Clin. Pharmacol.*, v.18, p.539-546, 2004.
- MAGALHÃES, P.J.C.; LAHLOU, S.; SANTOS, M.A.V. *et al.* 2003: Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetifolius* on the guinea-pig tracheal smooth muscle. *Planta Med.*, v.69, p.874-877, 2003.
- MÉDIAS anuais da estação agrometeorológica de Bebedouro. 2005. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/servicos/dadosmet/ceb-anual.html>>. Acessado em: 19 jan. 2016.
- MENÁRGUEZ, M.; PASTOR, L.M.; ODEBLAD, E. Morphological characterization of different human cervical mucus type using light and scanning electron microscopy. *Hum. Reprod.*, v.18, p.1782-1789, 2003.
- MOURA, D.S.; LOURENÇO, T.T.; MOSCARDINI, M.M. *et al.* Aspectos morfológicos da cérvix de ovelhas. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.31, p.33-38, 2011.
- NAQVI, S.M.K. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Anim. Reprod. Sci.*, v.85, p.337-344, 2005.
- OLIVEIRA, A.B.M.; SUNADA, N.S.; ORRICO, A.C.A. *et al.* Avaliação do desempenho e características de carcaça de diferentes genótipos de ovinos terminados em confinamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. *Anais...* Salvador: SBZ, 2010.
- 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. *Internat. J. Biometeorol.*, v.59, p.585-592, 2015.
- PEREIRA, A.F. *Caracterização farmacológica parcial da cérvix ovina (Ovis aries): influência da fase do ciclo estral na resposta tecidual e atividade miorelaxante do óleo essencial de Croton nepetifolius Baill.* 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, CE.
- PEREIRA, A.F.; MELO, L.M.; MORAIS, S.M. *et al.* Relaxant effect of the essential oil of *Croton nepetifolius* on ovine cervix. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.22, p.522-527, 2012.
- RIBEIRO, L.G.M.; GUIMARÃES, A.S.L.; MUDO, G.A.M. *et al.* Uso do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* Baill (Marmeleiro vermelho) na coleta transcervical de embriões ovinos dentro de um programa de conservação da raça Rabo Largo. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVASF, 10., 2015, Petrolina, *Anais...* Petrolina: [s.n.], 2015. p.13-15.
- SHEMESH, M. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.9, p.525-530, 1997.
- SIQUEIRA A.P. *Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado.* 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG.