



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGB

FELIPE FERREIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton grewoides* E
AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS E DO ANETOL COMO SUPLEMENTOS DE
MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO BOVINO**

SOBRAL-CE
AGOSTO, 2023

FELIPE FERREIRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton grewoides* E
AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS E DE ANETOL COMO SUPLEMENTOS DE MEIO
DE CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área Temática: Fisiologia Reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Geovany Amorin Gomes

SOBRAL-CE
AGOSTO, 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58c Silva, Felipe Ferreira da.
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton grewoides* E AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS E DO ANETOL COMO SUPLEMENTOS DE MEIO DE CULTIVO IN VITRO DE TECIDO OVARIANO BOVINO / Felipe Ferreira da Silva. – 2023.
107 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, , Sobral, 2023.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Geovany Amorin Gomes.

1. *Croton grewoides*. 2. Anetol. 3. Folículos pré-antrais. 4. Tecido ovariano. 5. Cultivo in vitro. I. Título.
CDD

FELIPE FERREIRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton grewoides* E
AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS E DE ANETOL COMO SUPLEMENTOS DE MEIO
DE CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área Temática: Fisiologia Reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Geovany Gomes Amorin

Aprovado em: 08/08/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Jackson do Nascimento Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Geovany Amorin Gomes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Murilo Sérgio da Silva Julião
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

SOBRAL-CE

AGOSTO, 2023

*Dedico,
A minha família.*

“Pela fé entendemos que os mundos pela palavra de Deus foram criados; de forma que aquilo que se vê não é feito do que é aparente. ”

(Hebreus 11:3)

RESUMO

As técnicas de reprodução assistida (TRA) tem contribuído para maiores produções de bovinos de corte e leite. A biotécnica de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos objetiva propiciar o desenvolvimento de folículos pré-antrais *in vitro*. Porém, as altas taxas de espécies reativas de oxigênio (EROs) causam a morte celular. Por isso, o uso de agentes antioxidantes indispensável para a proteção celular *in vitro*. O óleo essencial de *Croton grewoides* (OECG) e o anetol, possuem potencial antioxidante conhecido. Neste cenário, o presente estudo avaliou os efeitos do anetol e do OECG na ativação, crescimento, sobrevivência folicular e densidade de células do estroma e conteúdo de colágeno em tecido ovariano bovino. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), a concentração de tióis e os níveis de RNAm para *SOD*, *CAT*, *GPX1*, peroxirredoxina 6 (*PRDX6*) e fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (*NRF2*) também foram avaliados. Para tal, fragmentos do córtex ovarianos (3x3x1 mm) de 16 vacas foram fixados em paraformaldeído a 10% (controle não cultivado) ou cultivados *in vitro* em 500 µL de meio de controle sozinho ou suplementado com anetol ou OECG nas concentrações de 1, 10, 100 ou 1000 µg/mL, a 38,5°C com 5% de CO₂ no ar durante 6 dias. O meio controle foi o α-MEM contendo BSA, glutamina, penicilina/estreptomicina, hipoxantina, insulina, selênio e transferrina (α-MEM⁺). Ao final do cultivo, os tecidos foram fixados e processados para histologia clássica. Os folículos foram classificados como primordiais ou em desenvolvimento, bem como morfológicamente normais ou degenerados. A densidade celular do estroma ovariano e o conteúdo de colágeno foram avaliados separadamente em 10 áreas de 100 µm² em cada tratamento. A avaliação da atividade enzimática, níveis de tiol e de mRNA foram realizados em tecidos cultivados em α-MEM⁺ sozinho ou com 1 µg/mL de anetol ou OECG. As taxas de folículos primordiais, em desenvolvimento, ou de sobrevivência folicular foram analisada pelo teste do Qui-quadrado. Os dados de densidade celular, atividade enzimática e à expressão de mRNA foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os tecidos cultivados na presença de 1 µg/mL de anetol ou OECG tiveram níveis significativamente mais elevados de folículos morfológicamente saudáveis do que os aqueles em α-MEM⁺. Também, os tecidos cultivados com 1 µg/mL de OECG apresentaram maior densidade celular e conteúdo de colágeno quando comparados com o controle não cultivado. Os tecidos ovarianos cultivados em OECG apresentaram níveis de tiol significativamente mais elevados do que os demais grupos. O anetol aumentou a atividade da CAT, enquanto o OECG aumentou a atividade da GPX quando comparado ao α-MEM⁺. O uso de anetol ou OECG reduziu os níveis de mRNA para *CAT*, *PRDX6* e *NRF2* quando comparado com α-

MEM⁺. O OECC reduziu os níveis de RNAm para *GPXI* quando comparado com α -MEM⁺. Em conclusão, 1 μ g/mL de anetol ou CGEO promove a sobrevivência dos folículos e regula os níveis de tiol, a expressão de RNAm e a atividade das enzimas antioxidantes em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro*.

Palavras-chave: *Croton grewoides*. Anetol. Folículos pré-antrais. Tecido ovariano. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Assisted reproduction techniques (ART) have contributed to greater production in beef and dairy cattle. The *in vitro* culture of ovarian follicles aims to support the development of preantral follicles *in vitro*. However, the high levels of reactive oxygen species (ROS) causes cell death. Therefore, the use of antioxidant agents is vital for cell protection *in vitro*. The *Croton grewoides* essential oil (CGEO) and anethole have well-known antioxidant potential. Against this backdrop, the present study evaluated the effects of anethole and OECG on activation, growth, follicle survival and stromal cell density and collagen content in bovine ovarian tissue. The activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), the thiol concentration and mRNA levels for *SOD*, *CAT*, *GPX1*, peroxiredoxin 6 (*PRDX6*) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*) were also measured. For this purpose, ovarian cortex fragments (3x3x1 mm) from 16 cows were fixed in 10% paraformaldehyde (uncultured control) or cultured *in vitro* in 500 μ L of control medium alone or supplemented with anethole or CGEO at concentrations of 1, 10, 100 or 1000 μ g/mL, at 38.5°C with 5% CO₂ in air for 6 days. The control medium was α -MEM containing BSA, glutamine, penicillin/streptomycin, hypoxanthine, insulin, selenium and transferrin (α -MEM⁺). At the end of culture, the tissues were fixed and processed for classical histology. The follicles were classified as primordial or developing, as well as morphologically normal or degenerated. Ovarian stromal cell density and collagen content were analysed separately in 10 areas of 100 μ m² for each treatment. Enzymes activity, thiol and mRNA levels were measured in tissues cultured in α -MEM⁺ alone or with 1 μ g/mL of anethole or CGEO. The rates of primordial follicles, follicle development or follicle survival were analysed using the Chi-squared test. Cell density, enzyme activity and mRNA expression data were analysed by Kruskal-Wallis test. Tissues cultured in the presence of 1 μ g/mL anethole or CGEO had significantly higher levels of morphologically healthy follicles than those in α -MEM⁺. Also, tissues cultured with 1 μ g/mL CGEO showed higher cell density and collagen content when compared to the uncultured control. Ovarian tissues cultured in CGEO showed significantly higher thiol levels than the other groups. Anethole increased CAT activity, while OECG increased GPX activity when compared to α -MEM⁺. The use of anethole or CGEO reduced mRNA levels for CAT, PRDX6 and NRF2 when compared to α -MEM⁺. CGEO reduced mRNA levels for GPX1 when compared to α -MEM⁺. In conclusion, 1 μ g/mL of anethole or CGEO promotes follicle survival and regulates thiol

levels, mRNA expression and antioxidant enzymes activity in bovine ovarian tissue cultured in vitro.

Keywords: *Croton grewoides*; anethole; preantral follicles; ovarian tissue; *in vitro* culture; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Representação esquemática do desenvolvimento folicular.....34
Fonte: Adaptado de Simon, Kumar e Duncan (2020).
- Figura 2** – Mecanismo de peroxidação lipídica.....36
Fonte: Ramalho e Jorge (2016).
- Figura 3** - Esquema da regulação de NRF2-ARE.....38
Fonte: Adaptado de Tosseta et al., 2020.
- Figura 4** – Mecanismo de autooxidação de hidrocarbonetos.40
Fonte: Adaptado de Amorati, Foti e Valgimigli (2013).
- Figura 5** – Biossíntese de terpenóides e fenilpropanóides em plantas.....44
Fonte: Adaptado de Said-Al, Hikal e Mahmoud (2017).
- Figura 6** – Registro da planta “canelinha” (*Croton grewiioides*) em época de floração.....48
Fonte: Autor (2021)
- Figura 7** – Estrutura química do anetol: bidimensional (A) e tridimensional (B).....50
Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anethole#section=Structures>

CAPÍTULO 1

- Figure 1.** Sections of bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and degenerated (d-f) follicles. GC, granulosa cells; N, oocyte nucleus; TC, thecal cells; O, oocyte. Bars = 100µm..74
- Figure 2.** Percentage of morphologically normal follicles uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations CGEO or anethole. *indicates significant difference compared to uncultured control (P < 0.05). Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between treatments (P < 0.05).....74
- Figure 3.** Percentage of morphologically healthy primordial (A) and developing (B) follicles in uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations CGEO or anethole. *indicates significant difference compared to uncultured control. Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between MEM+ and other treatments.....75
- Figure 4.** Stromal cell density in uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations of anethole or CGEO for 6 days (mean ± SEM).

*indicates significant difference compared to uncultured control. Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between MEM+ and other treatments. AN: anethole.....76

Figure 5. Area of collagen fibers in uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations of anethole or CGEO for 6 days (mean ± SEM). *indicates significant difference compared to uncultured control. Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between MEM+ and other treatments. AN: anethole.....77

Figure 6. Correlation between stromal cell density and percentage of normal follicles in ovarian tissues. The association between variables (black line) was analyzed by linear regression [Normal follicles = 56.09 + (0.0090 x stromal cell density); r = 0.011; R² = 0.0001; P > 0.05]. Each point on the chart represents one treatment evaluated77

Figure 7. Correlation between collagen area with percentage of normal follicles. The association between variables (black line) was analyzed by linear regression [Normal follicles = 78.40 + (1.329 x stromal cell density); r = 0.3738; R² = 0.2040; P > 0.05]. Each point on the chart represents one treatment evaluated.....78

Figure 8. Correlation between collagen area with stromal cell density. The association between variables (black line) was analyzed by linear regression [Collagen area = 78.40 + (1.329 x stromal cell density); r = 0.4517; R² = 0.2040; P > 0.05]. Each point on the chart represents one treatment evaluated79

Figure 9. Thiol concentrations in bovine ovarian tissues cultured in control medium alone or with 1 µg.mL⁻¹ CGEO or anethole. Values are expressed as mean S.E.M. Distinct lower case letters (a,b) indicates significant difference between groups with anethole (AN1) and CGEO (OE1) (P < 0,05).....79

Figure 10. SOD (A), CAT (B), and GPx (C) activity in bovine ovarian tissues cultured in control medium alone or with 1 µg.mL⁻¹ anethole or CGEO. Values are expressed as mean S.E.M. a,b: indicates significant differences between tissues cultured in control or supplemented with anethole (AN) or CGEO. (P < 0.05).....80

Figure 11. Levels of mRNA expression for SOD (A), CAT (B), GPx1 (C), PRDX6 (D) and NRF-2 (E) in bovine ovarian tissues cultured in control medium alone

or with 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or CGEO. a,b: indicates significant differences among treatments ($P < 0,05$).....81

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Atividades biológicas de diferentes grupos moleculares presentes em óleos essenciais.....	45
Tabela 2. Atividade antioxidante de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas.....	46
Tabela 3. Atividades biológicas de óleo essencial de <i>C. grewioides</i>	48
Tabela 4: Propriedades biológicas de <i>C. grewioides</i> quimiotipo anetol.....	49

CAPÍTULO 1

Table 1. Primer pairs used for real-time PCR.....	69
Table 2. Composition of essential oil of <i>Croton grewioides</i>	71
Table 3. Antioxidant properties of the CGEO measured by DPPH and ABTS.....	72
Table 4. DPPH radical scavenging rate by CGEO.....	72
Table 5. ABTS radical inhibition rate CGEO	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
ANOVA	Análise de Variância
ARE	Elementos de Resposta Antioxidante
ATP	Trifosfato de Adenosina
BMP15	Proteína Morfogênica Óssea 15
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG/DIC	Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Deionizador por Chamas
CG/EM	Cromatógrafo a Gás Acoplado ao Espectrômetro de Massas
CGPs	Células Germinativas Primordiais
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EO	Estresse Oxidativo
EROs	Espécies Reativas De Oxigênio
FGF2	Fator de Crescimento e Diferenciação 2
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
FOPAs	Folículos Ovarianos Pré-Antrais
FRAP	Poder Antioxidante Redutor de Íons Férricos
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonatrofina
GDF9	Fator de Crescimento e Diferenciação 9
GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IR	Índice de Retenção
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
LH	Hormônio Luteinizante
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

α -MEM	Meio Mínimo Essencial
MEC	Matrix Extracelular
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
NRF2	Fator Nuclear Derivado de Eritróide 2
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OECG	Óleo Essencial de <i>Croton grewoides</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
OPU	<i>Ovum Pick Up</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
PRDX	Peroxirredoxina
Rfs	Fatores de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
SOD	Superóxido Dismutase
SOV	Superovulação
TCM-199	Meio de Cultivo Tecidual 199
TE	Transferência de Embriões
TEAC	Capacidade Antioxidante de Equivalência ao Trolox
TETF	Transferência de Embrião em Tempo Fixo
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRA	Tecnologias de Reprodução Assistida
UV	Ultravioleta
ZP	Zona Pelúcida

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
©	Copyright
®	Marca Registrada
O ²⁻	Radical superóxido ou ânion superóxido
μM	Micromolar
μL	Microlitro
mM	Milimolar
eV	Eletron-volts
mm	Milímetro
°C	Graus Celsius
¹³ C	Isótopo de Carbono 13
¹ H	Isótopo de Hidrogênio 1
s	Segundos
μg	Micrograma
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
CO ₂	Dióxido de Carbono
P	Nível de Significância Amostral
<	Menor que
O ₂	Molécula de oxigênio
•OH	Radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singlete
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
RH	Substrato lipídico
R•	Radical alquil
ROO•	Radical peroxil
IC ₅₀	Concentração inibitória média
CL ₅₀	Concentração letal média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Produção de alimentos de origem animal	20
2.2 Biotécnicas de reprodução animal e o aumento da produção de alimentos	21
2.2.1 Inseminação artificial	21
2.2.2 Transferência de embriões	22
2.2.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões	23
2.2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	24
2.3 Estresse oxidativo durante o cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	26
2.4 Compostos antioxidantes como suplementos de meios de cultivo de folículos pré-antrais	30
2.5 Óleos essenciais como fontes de compostos antioxidantes	34
2.6 Aspectos botânicos, químicos e farmacológicos de óleo essencial de <i>Croton grewoides</i>	38
2.7 Óleo essencial de <i>Croton grewoides</i> quimiotipo anetol: propriedades biológicas e potencial antioxidante	39
2.8 Anetol: aspectos químico-biológicos e atividade em sistemas de cultivo celular	40
2.9 Metodologias para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais	43
3 JUSTIFICATIVA	46
4 HIPÓTESES	48
5 OBJETIVOS	49
5.1 Objetivo geral	49
5.2 Objetivos específicos	49
6 CAPÍTULO 1: Anethole and <i>Croton grewoides</i> essential oil reduce oxidative stress improve growth of bovine preantral follicles during <i>in vitro</i> culture of ovarian tissue ...	50
7 CONCLUSÕES GERAIS	84
8 PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA	100
ANEXO B - EXCICATA DE <i>CROTON GREWIOIDES</i>	101
ANEXO C - CROMATOGRAMA DO OECG POR CG-EM	102
ANEXO D - CROMATOGRAMA DO OECG POR CG-DIC	105

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aumento no consumo de alimentos tem crescido exponencialmente e, conseqüentemente, tem-se uma maior demanda de produção de alimentos, como por exemplo da carne bovina (FUKASE; MARTINS, 2020). Isto tem levantado sérias questões ambientais relacionadas a necessidade de áreas de pastagem cada vez maiores para criação de animais de produção (GREENWOOD, 2021). Diante disso, esforços vêm sendo realizados para se aumentar a produtividade animal, considerando as necessidades de atenção à manutenção dos recursos naturais e o crescimento sustentável. As biotecnologias reprodutivas são partes efetivas no crescimento e manutenção dos altos índices de produção, tanto na pecuária de corte quanto da bovinocultura de leite (VIANA et al., 2018). Biotécnicas reprodutivas como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) têm dado contribuições significativas para o melhoramento genético das espécies bovinas (SOUZA, 2020). Porém, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas capazes de proporcionar maior aproveitamento do potencial reprodutivo desses animais e a disseminação de animais de alto valor genético, visando aumentar a produção de alimentos de origem animal sem o aumento das áreas agricultáveis.

O cultivo *in vitro* (CIV) de folículos ovarianos em estágios iniciais de desenvolvimento objetiva um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo de fêmeas de mamíferos. Os ovários de fêmeas bovinas, por exemplo, contêm milhares de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (folículos primordiais, primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios) dos quais 90% correspondem a folículos primordiais. Desse vasto número de folículos, sabe-se que somente cerca de 1% alcançam a maturação completa, os demais entram em regressão pelo processo de degeneração normal, a atresia. Nesse sentido, o cultivo folicular *in vitro* busca mimetizar as condições ovarianas para que os folículos se desenvolvam e atinjam a maturação completa *in vitro*. Porém, o estresse oxidativo (EO) é um dos principais fatores que reduz a eficiência desse sistema (SANTOS et al., 2018). O EO se deve às altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) que em grandes concentrações provocam danos irreversíveis, como lesões mitocondriais, peroxidação lipídica e lesões no DNA, culminando na morte celular (ADWAS et al., 2019). Diante disso, a suplementação de meios de cultivo com antioxidantes capazes de contrabalancear a disparidade ocasionada por altos níveis de EROs no ambiente celular, torna-se crucial para o desenvolvimento normal dos folículos ovarianos *in vitro* (SANTOS et al. 2018).

Muitas pesquisas têm demonstrado a eficácia antioxidante de produtos naturais de origem vegetal (fitoquímicos) (COSTA et al., 2020; SÁ et al., 2018; VÁSQUEZ, TORRES e ROJANO. 2019), dentre eles têm-se os óleos essenciais (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2023; VASCONCELOS et al. 2022), que são misturas de compostos voláteis presentes em várias partes de vegetais como por exemplo, folhas e raízes (BADR et al., 2021; RASHID et al., 2021; MAHDI et al., 2021). Pode-se encontrar nesses óleos muitas substâncias como sesquiterpenos, monoterpenos e compostos aromáticos (derivados de fenilpropano em sua maioria) (DONG; LIN, 2021). O *Croton grewoides*, conhecida popularmente como “canelinha”, “canela-brava” ou “canela de cunhã” é uma planta do Nordeste do Brasil pertencente à família Euphorbiaceae (SILVA et al., 2021). O óleo essencial de *C. grewoides* (OECG) possui diversas propriedades biológicas já relatadas como antioxidante (OLIVEIRA et al., 2021), anti-inflamatória (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2023) e antimicrobiana (FONTENELLE et al., 2008). Essas atividades biológicas estão relacionadas a composição química de *C. grewoides*, sendo conhecidos cinco quimiotipos distintos dessa planta (OLIVEIRA et al., 2021; OLIVEIRA, 2018; MORAIS et al., 2006; SILVA et al., 2021). O OECG, quimiotipo anetol, tem sido objeto de grupos de pesquisa, o que permitiu a identificação de várias propriedades biológicas, entre elas, efeitos gastroprotetor (COELHO-DE-SOUZA et al., 2013), cicatrizante (CAVALCANTI et al., 2012), inseticida (ISMAN, 2020), acaricida (CASTRO et al., 2019) e anticâncer (PESSOA et al., 2006). Além disso, apresentou potencial de inibição de espécies radicalares (MORAIS et al., 2006). A molécula de anetol está presente em uma variedade de plantas como *C. grewoides* (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2023). É uma molécula com diversas propriedades biológicas relatadas como, por exemplo, ação antioxidante e analgésica (MORAIS et al., 2006; GHELARDINI et al., 2001). Estudos mostraram que o anetol auxilia na proteção celular contra EROs, por exemplo, ativando vias de sinalização de enzimas antioxidantes (SÁ et al., 2018).

Diante do exposto, faz-se necessário um maior aprofundamento e contextualização acerca da produção de proteínas de origem animal e da necessidade de aperfeiçoamento de biotécnicas que melhor aproveitem o potencial reprodutivo de fêmeas de mamíferos de grande porte, como os bovinos. Além disso, é importante compreender como a PIVE e os produtos de origem vegetal como o óleo essencial de *C. grewoides* e seu constituinte majoritário, o anetol, podem atuar para proteção celular em meio de cultivo de folículos ovarianos. Com esse propósito, desenvolveu-se a revisão de literatura a seguir abordando os tópicos sobre produção animal (1), biotécnicas de reprodução animal e o aumento da produção de alimentos

(2), estresse oxidativo durante o CIV de folículos pré-antrais (3), compostos antioxidantes como suplementos de meio de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais (4), óleos essenciais como fontes compostos antioxidantes (5), aspectos botânicos, químicos e farmacológicos de óleo essencial de *Croton grewoides* (6), óleo essencial de *Croton grewoides* quimiotipo anetol: propriedades biológicas e potencial antioxidante (7), anetol: aspectos químico-biológicos e atividade em sistemas de cultivo celular (8), e metodologias para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais (9).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de alimentos de origem animal

De acordo com dados da Organização Mundial das Nações Unidas (ONU) atualmente o contingente populacional do planeta conta com aproximadamente 8 bilhões de pessoas, sendo previsto que até 2037 se atinja a marca de 9 bilhões (ONU, 2023). Porém, de acordo com o estudo de Fukase e Martin (2020) a taxa de crescimento populacional tem recuado anualmente indo de 1,75 % na década de 1980 para 1,15% na década de 2000. Em contrapartida a procura alimentar se tornou cada vez mais importante, evoluindo de 0,55% para 0,72% no respectivo período, devido ao aumento da média per capita. Segundo Godfray (2011) à medida que o rendimento por indivíduo aumenta, cresce também o aumento das despesas com frutas, legumes e produtos de origem animal. Correlações realizadas com o PIB de 137 países e suas respectivas populações estimou que a procura por alimentos de origem natural possa, até 2050, atingir cerca de 102% (FUKASE; MARTIN, 2020). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) a carne figura entre os alimentos cuja demanda tem mais crescido nos últimos anos (EMBRAPA, 2023), sendo a carne bovina a mais consumida, seguida da carne ovina (DALY et al., 2022).

Diante do consumo cada vez maior de carne bovina, cresce também a necessidade de área de pastagem necessária para criação desses animais. A demanda de carne bovina em 2019 foi de 70 milhões de toneladas e projeta-se o aumento para 74 milhões de toneladas para 2024 (GREENWOOD, 2021). O aumento no consumo de produtos animais, como a carne bovina, ricos em proteínas proporciona diversos benefícios como a redução em problemas relacionados ao crescimento infantil (HEADEY; HIRVONEN; HODDINOTT, 2018). Porém o aumento no consumo de carne bovina impõe maiores necessidades de recursos agrícolas como áreas para pastagem cada vez maiores (FUKASE; MARTIN, 2020). Atualmente a área de pastagem no Brasil é de aproximadamente 159 milhões de hectares (EMBRAPA, 2023). Porém, diante do atual cenário de mudanças climáticas, a necessidade de preservação do meio ambiente é fundamental. Em 2015 a ONU estabeleceu 17 objetivos voltados ao desenvolvimento sustentável (ODS) através do relatório "Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável" e entre as metas estabelecidas propõe-se acabar com a fome no mundo e também a diminuição no avanço do desmatamento (ARORA; MISHRA, 2019). Sabe-se que os alimentos de origem agrícola como os produtos de origem animal demandam maiores insumos para sua produção (por exemplo, maiores áreas disponíveis para produção de alimentos para animais de pastagem como o gado)

(FUKASE; MARTIN, 2020). Nesse propósito, faz-se necessário a busca por alternativas que visem o aumento da produtividade e eficiência do fornecimento de alimentos agrícolas ricos em proteína animal como a carne bovina sem, no entanto, ser necessária uma demanda cada vez maior de encargos aos recursos naturais.

2.2 Biotécnicas de reprodução animal e o aumento da produção de alimentos

Atualmente, inúmeros esforços vêm sendo realizados no intuito de aumentar a produtividade de animais, como bovinos, de forma ecologicamente mais sustentável. Isso, por sua vez, requer maior eficiência por parte das cadeias de produção, como fazendas, que são compelidas a apresentarem maior produtividade ao passo que atentem para as recomendações de um mercado cada vez mais preocupado com o meio ambiente (GREENWOOD, 2021). Nesse sentido, a indústria pecuária vem dispor de biotécnicas reprodutivas denominadas de Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) tais como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), as quais têm possibilitado aos produtores a obtenção de maiores rendimentos quando comparados à reprodução natural, proporcionando benefícios como melhoria da eficiência reprodutiva e do ganho genético (SHAH; CHAUHAN, 2019).

2.2.1 Inseminação artificial

A IA tem sido utilizada nos últimos 200 anos e vem sendo a TRA mais bem-sucedida e eficiente na produção animal durante as últimas seis décadas e, devido, entre outros fatores, a evolução na criobiologia do sêmen, tornou-se uma tecnologia prática tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (SHAH; CHAUHAN, 2019). As principais vantagens dessa técnica de reprodução assistida em bovinos são as seguintes: rápida disseminação de material genético, maximização da utilização de animais geneticamente superiores, principalmente machos, maior eficiência e taxa de seleção genética, redução considerável dos obstáculos ao transporte, à manutenção, além de redução do risco de doenças sexualmente transmissíveis (NASCIMENTO, 2022). A IA permite potencializar a rentabilidade genética por permitir a utilização de sêmen de touros com material genético superior, resultado assim na produção de bezerros mais produtivos, proporcionando maior retorno econômico ao produtor de leite e carne (BARUSELLI et al., 2019). Segundo Baruselli et al. (2019) a biotécnica de IA proporciona um incremento de até 8% na produção anual de filhotes bovinos, cerca de 816 mil bezerros anualmente. Além disso, por serem provenientes de touros com elevado valor genético e também devido a

antecipação do parto, em relação ao serviço natural, os bezerros advindos de IA mostram ganho de peso superior em até 20 Kg, desde o nascimento ao desmame, e no período do desmame ao abate um ganho adicional de carcaça de até 15 Kg em relação animais oriundos de acasalamento natural. Nesse mesmo sentido, tem sido mostrado que fêmeas submetidas a IA tem os intervalos entre os partos reduzidos em até 1 mês, gerando um aumento de até 10 % na produção anual de leite nas fazendas (BARUSELLI et al., 2019).

O aperfeiçoamento da técnica de IA em conjunto com avanços no conhecimento de fatores relacionados a reprodução animal possibilitou o desenvolvimento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), um aprimoramento da IA. A IATF por sua vez, possibilita o controle do estro e da ovulação em grupos de animais de raças superiores, facilitando o manejo dos animais, permitindo, por exemplo, que vacas em anaestro sejam inseminadas, melhorando os índices reprodutivos (LAMB; MERCADANTE, et al., 2016). Os protocolos de IATF associam hormônios como progestágenos, prostaglandinas, ésteres de estradiol, hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), entre outros, objetivando o controle do crescimento folicular, regulação da fase lútea e a indução da ovulação em um tempo fixo (SENEDA et al., 2022). Os programas de IATF apresentam taxa de prenhez média de 50% até 60%. Os principais problemas que interferem no sucesso dos resultados estão relacionados ao momento e o manejo da técnica, aplicação de hormônios em quantidades adequadas e a qualidade técnica do inseminador (NASCIMENTO 2022).

2.2.2 Transferência de embriões

A técnica de TE consiste em depositar o embrião, proveniente de genitores selecionados, no trato reprodutivo de uma fêmea receptora, visando aumentar o número de animais com capacidade genética superior e de maior produtividade, encurtando o intervalo entre gerações (ERDEM et al., 2020). Em conjunto com outras biotécnicas como a PIVE, superovulação (SOV) e aspiração folicular por Ovum pick up (OPU), têm contribuído para um melhor aproveitamento dos rebanhos bovinos por favorecer a seleção e a propagação de vacas de alto valor genético. Na bovinocultura tem sido utilizada para aumentar o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas de alto valor (MAPLETOFT; BO, 2016). Em relação a IA, a TE facilita a manipulação de material genético de animais de alto valor, tanto macho quanto de fêmeas, e aliada a tecnologias genômicas e de marcadores endócrinos permite o uso de oócitos de bezerras jovens para a PIVE, diminuindo assim o intervalo entre as gerações, o que, por sua vez, aumenta o ganho reprodutivo geral das fazendas

(BARUSELLI et al., 2019). De acordo com Viana (2018), em 2018 houve aumento de 48,9% na quantidade de embriões produzidos *in vitro* em relação ao ano de 2017. Por outro lado, o número de embriões oriundos da produção natural diminuiu em 21,7%.

A ineficiência da detecção do estro em receptoras é um fator que limita a ampla aplicação dos programas de TE. No intuito de evitar perdas associadas à detecção de estro e maior praticidade na técnica, utiliza-se protocolos hormonais para sincronização da ovulação em receptoras, caracterizando a transferência de embrião em tempo fixo (TETF) (SENEDA et al., 2022). Uma alternativa útil para aumentar o número de receptoras aptas ao programa de transferência. A utilização de protocolos de sincronização da ovulação em bovinos, permite a TE em período pré-determinado sem a necessidade de detecção de estro. Os protocolos utilizados na TETF são basicamente, os desenvolvidos originalmente para IATF, geralmente baseados em análogos do GnRH e estrógeno, incluindo o uso por sete ou oito dias de dispositivo liberador de progesterona (BÓ et al., 2012).

O uso de protocolos de TETF tem se apresentado como uma alternativa útil no comércio envolvendo a transferência de embriões bovinos, auxiliando na otimização da técnica. No entanto, a efetividade da TETF pode sofrer influência de outros fatores relacionados aos embriões, animais e seu manejo. Sabe-se que muitos blastocistos permanecem inerentemente incapazes de se desenvolver, seja devido a anormalidades cromossômicas ou herança genética prejudiciais para a sobrevivência, por exemplo. Um estudo envolvendo a transferência de embriões para vacas, mostrou que aproximadamente 30% dos embriões produzidos *in vivo* são incapazes de se desenvolver ao passo que apenas de 50% a 60% das vacas que são usadas como receptoras podem possuir um sistema reprodutivo capaz de tolerar o desenvolvimento embrionário (MCMILLAN, 1998).

2.2.3 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE é uma biotécnica que vem sendo desenvolvida com objetivo de melhorar o aproveitamento máximo de folículos em estágio maduro (folículos antrais), potencializando o ganho reprodutivo de fêmeas de bovinos, elevando os índices de produção de embriões (MELO et al., 2016). A PIVE compreende geralmente três etapas: 1) Maturação *in vitro* (MIV) de oócitos colhidos diretamente dos ovários de fêmeas doadoras pela técnica de *Ovum pick-up* (OPU) ou aspirados de ovários obtidos em matadouro; 2) Fertilização *in vitro* (FIV) através da combinação de oócitos da MIV com espermatozoides capacitados *in vitro* e, 3) Cultura *in vitro* (CIV) de presumíveis zigotos até atingirem estágios de desenvolvimento

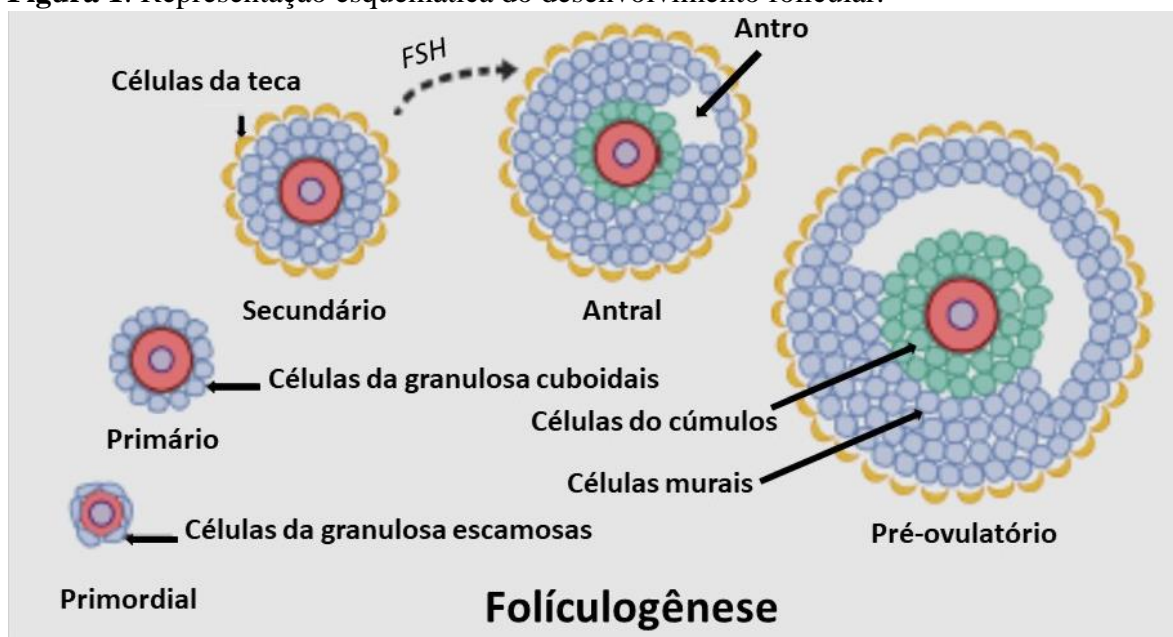
adequados para serem transferidos para fêmeas receptoras (VIANA et al., 2018). A PIVE tem contribuído para a produção de animais de elevado valor genético, além de constituir uma excelente fonte de embriões disponíveis para aplicação em outras tecnologias de reprodução assistida, como a clonagem, a transgênese, a sexagem de embriões, a investigação com células tronco, etc (SHAH; CHAUHAN, 2019). De acordo com Viana et al. (2018) a PIVE é responsável pela produção de 66% dos embriões que são produzidos no mundo, e no Brasil o percentual chega a aproximadamente 92%. Esses resultados mostram que com o uso da PIVE é possível maior produção de animais para bovinocultura de corte e de leite encurtando o período de tempo em comparação com as etapas de reprodução normal (SENEDA et al., 2021). A utilização da PIVE em conjunto com a técnica de sexagem tem contribuído para o maior fornecimento de fêmeas bovinas para fazendas produtoras de leite. No Brasil, com uso da PIVE, foram produzidos 180.475 embriões destinados a fazendas leiteiras, o que correspondeu a 12% da produção mundial de embriões oriundos da PIVE em 2017 (VIANA, 2018). Foi relatado, por exemplo, a produção de 8.000 bezerros fêmeas a partir de 20.000 embriões oriundos de um programa envolvendo PIVE/sexagem, uma taxa de sucesso de 39% (PONTES et al., 2010). Além disso, a PIVE também tem permitido aos produtores terem maior controle sobre as características fenotípicas desejadas as progênies a serem adquiridas, como uso de oócitos aspirados de fêmeas com maior capacidade genética para produção de leite (VIZONÁ et al., 2020).

2.2.4 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O CIV de folículos ovarianos é uma biotécnica que surgiu com o objetivo de resgatar e cultivar *in vitro* a reserva folicular disponível em ovários de fêmeas de mamíferos, impedindo assim o processo de atresia (DA SILVA et al., 2021). Para isso tem-se buscado estabelecer um ambiente de cultivo que propicie as condições essenciais de desenvolvimento para que os folículos passem pelas diferentes fases de crescimento e maturação (foliculogênese) *in vitro* (SIMON; KUMAR; DUNCAN, 2020), de forma a proporcionar oócitos aptos para aplicação em técnicas como a PIV (TELFER; ANDERSEN, 2021). O ovário de fêmeas de mamíferos como ratos, bovinos e humanos, por exemplo, abrigam milhares de folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento. Os folículos primordiais correspondem a cerca de 95% da reserva folicular, contém um oócito imaturo rodeado por células da granulosa em formato pavimentoso; nos folículos em estágio primário os oócitos estão completamente rodeados por uma única camada de células da granulosa em formato cuboide; os folículos em estágio secundário possuem oócitos com duas ou mais

camadas de células da granulosa cuboides; os folículos terciários ou antrais, além de apresentarem diversas camadas de células somáticas circundantes ao oócito também possuem uma cavidade antral preenchida por diversos componentes como água, sais minerais, proteínas, RNAs, etc., e por fim, há também os folículos pré-ovulatórios, cujos oócitos estão preparados para serem liberados para fertilização por um espermatozoide (FIGUEIREDO et al., 2020; TELFER, 2019). Assim, os folículos são classificados em dois de acordo com a ausência (folículos pré-antrais) ou presença de cavidade antral (folículos antrais) (SENEDA et al., 2021). A figura 1 mostra um esquema simplificado do desenvolvimento folicular.

Figura 1: Representação esquemática do desenvolvimento folicular.



Fonte: Adaptado de Simon, Kumar e Duncan (2020).

O cultivo de folículos pode ocorrer de duas maneiras: cultivo de folículos isolados ou através do cultivo de folículos *in situ*. No cultivo de folículos isolados o tecido ovariano envolto é removido e descartado. Este tipo de cultivo de folículos traz vantagens no que diz respeito ao acompanhamento dos folículos de forma individual, permitindo que seu crescimento seja monitorado diariamente, possibilitando o acompanhamento sistemático da atividade de hormônios e fatores de crescimento no desenvolvimento de folículos *in vitro* (SIMON; KUMAR; DUNCAN, 2020). Por sua vez, para o cultivo *in situ*, tem-se o isolamento de uma porção do córtex ovariano contendo folículos.

Esse tipo de cultivo tem se mostrado promissor, pois permite que o contato folículo-células estromais presentes na matriz extracelular (MEC) ovariana se mantenha. É sabido que a MEC ovariana está em constante remodelação, processos de afrouxamento e rigidez, e que tais processos estão envolvidos na ativação de folículos primordiais por exemplo

(GROSBOIS et al., 2023). A MEC ovariana é rica em diversos tipos de proteínas, entre eles, colágeno e seus subtipos que fornecem aos tecidos suporte físico e propriedades mecânicas, tais como resistência e rigidez (TANG, 2020), as glicoproteínas, incluindo a elastina, que regula a elasticidade e a resiliência dos tecidos (VINDIN et al., 2019), a fibronectina, que controla a adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação das células (ZOLLINGER; SMITH, 2017), e a laminina, um componente importante das membranas basais e um componente-chave para a fixação das células e a organização da MEC (AUMAILLEY, 2013). Além de atuar também como um reservatório de fatores de crescimento e moléculas bioativas, tais como hormônios e fatores de crescimento (BONNANS et al., 2014).

2.3 Estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

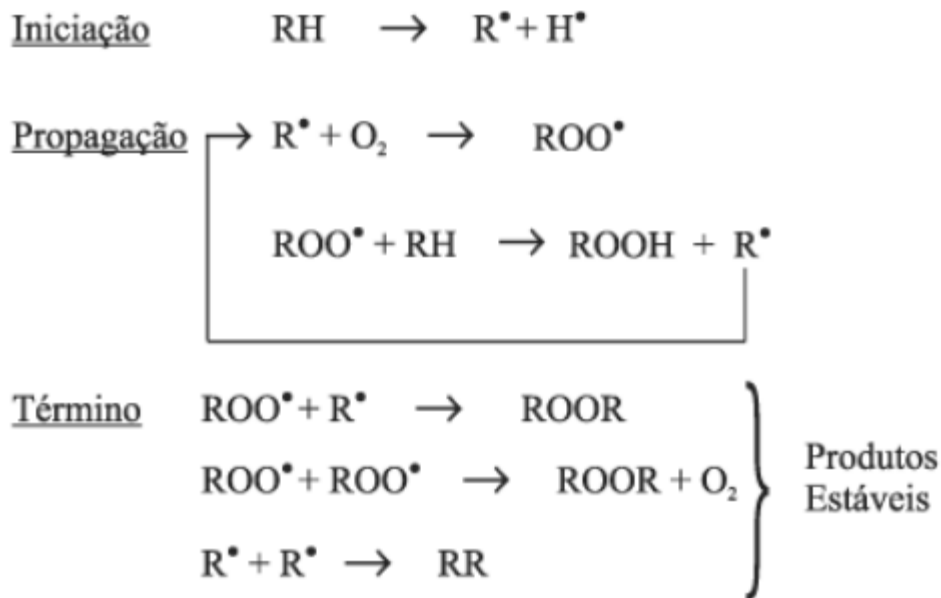
O metabolismo dos mamíferos produz constantemente, ao longo de toda a vida, radicais livres como produtos secundários naturais. Segundo Gulcin (2020), apesar de fazer parte dos subprodutos normais sintetizados no ciclo de vida normal das células, os radicais livres, quando em excesso, podem ocasionar danos ao ambiente celular levando ao EO. Em sua maioria, essas substâncias são espécies reativas de oxigênio (EROs), que são geradas durante processos cruciais de consumo de oxigênio (O_2). O que confere tal poder reativo aos radicais livres é a presença de um ou mais elétrons livres presentes na camada de valência dos átomos. O O_2 reage prontamente com outros radicais, e a partir da própria molécula de oxigênio podem ser gerados radicais (AMORATI; FOTI; VALGIMIGL, 2013). Diversas reações fisiológicas como as reações de oxigenase e reações de transferência de elétrons têm como matéria prima o O_2 , e a partir deste são criadas grandes quantidades de EROs, dentre as quais temos o ânion superóxido ($\bullet O_2^-$), radicais hidroxila ($\bullet OH$) e peróxil ($ROO\bullet$), além de espécies não radicalares como oxigênio singleto (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GULCIN, 2020). As EROs podem ser formadas em diversos compartimentos celulares como fagossomos, peroxissomos, retículo endoplasmático, membranas celulares e mitocôndrias, sendo esta última a organela responsável pela geração da maior quantidade de EROs (SCHOFIELD; SCHAFER, 2021).

As mitocôndrias realizam atividades metabólicas centrais nas células, de maneira que, perturbações mínimas em suas atividades podem desencadear a formação alterada de trifosfato de adenosina (ATP), implicando diretamente na energia liberada para as funções dos gametas (STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018). Nas mitocôndrias, boa parte das EROs são formadas a partir do escape de elétrons da cadeia respiratória (Cadeia de

Transporte de Elétrons), durante a fosforilação oxidativa e redução do O_2 . A falha no transporte de níveis adequados de elétrons nos complexos I e II da cadeia respiratória resulta na produção do radical superóxido $\bullet O_2^-$ na matriz mitocondrial, enquanto que esta mesma falha ao ocorrer no complexo III leva a formação do mesmo radical tanto na matriz, quanto no espaço intermembranar, e uma vez presente neste espaço, essa espécie radicalar de oxigênio pode migrar diretamente para o citosol e desencadear o mecanismo de autoxidação em hidrocarbonetos (SCHOFIELD; SCHAFER, 2020).

O mecanismo mais aceito para a degradação de compostos lipídicos por ação de EROs, acontece com as membranas celulares. O processo inicia-se com um radical atacando um substrato lipídico (RH), produzindo um radical alquil ($R\bullet$), que, por sua vez, reagirá, sob uma taxa controlada por difusão, com o oxigênio para formar o radical peroxil ($ROO\bullet$). Este último radical formado reage de forma cíclica com outra molécula lipídica produzindo um hidroperóxido mais estável e outro radical alquil que retomará o ciclo até que dois radicais reajam entre si e se extingam finalizando o processo numa etapa chamada de terminação (Figura 2) (FARHOOSH, 2022).

Figura 2: Mecanismo de peroxidação lipídica.



Fonte: RAMALHO; JORGE (2016).

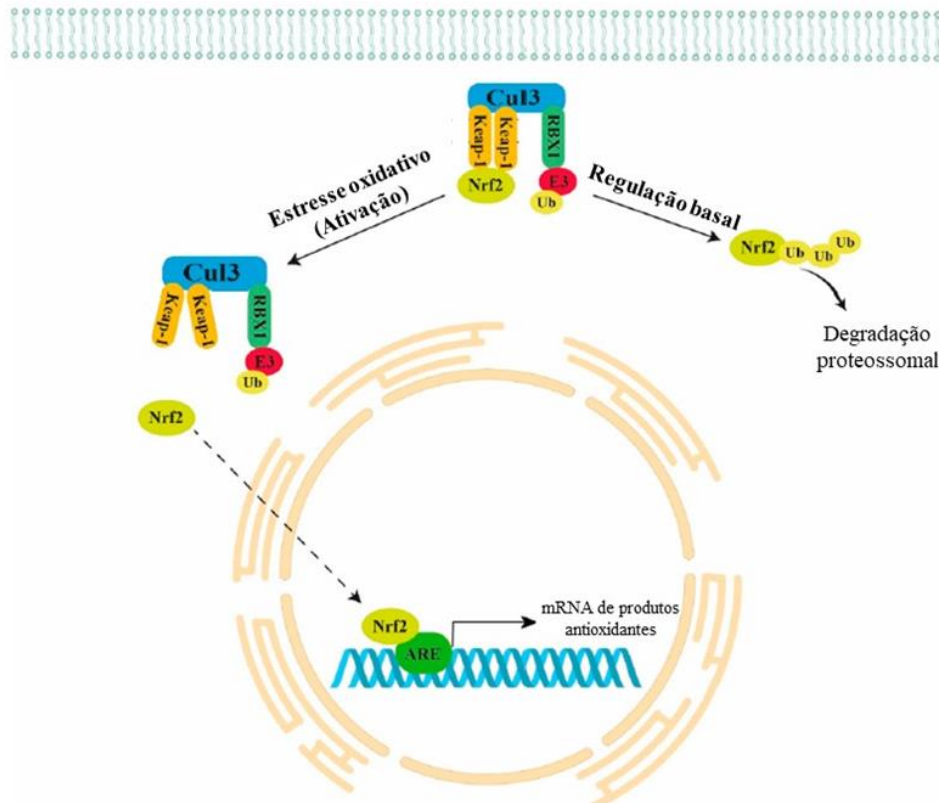
Por serem encontrados em estados de exigências metabólicas muito altas em processos biológicos, mecanismos reacionais envolvendo O_2 e nitrogênio tem ganhado mais atenção. O EO está comumente relacionado à participação de EROs como intermediários importantes. Segundo Torres-Osorio *et al.* (2019), apesar de serem essenciais para a

manutenção das funções fisiológicas normais, quando em baixas concentrações, atuando como segundos mensageiros na modulação da expressão gênica de células somáticas, gametas e embriões, quando em excesso, as concentrações de EROs podem agir de maneira deletéria afetando a atividade mitocondrial de oócitos e embriões, levando ao EO, acarretando, entre outros efeitos, danos ao DNA, peroxidação das membranas lipídicas, lesões mitocondriais e apoptose. Fatores agravantes para a consequente interrupção da divisão celular (ADWAS *et al.*, 2019).

No ovário, em condições fisiológicas normais, é sabido que as EROs possuem significativo papel, tendo em vista a capacidade de influenciar positivamente uma variedade de funções fisiológicas como esteroidogênese, maturação oocitária, luteólise, manutenção luteal e na ovulação (STELLER; ALBERTS; RONCA, 2018). Sabe-se também que as EROs, em níveis normais, atuam na fisiologia de células germinativas e estromais por meio de modulação positiva de vias de sinalização relacionadas ao crescimento e diferenciação (LU *et al.*, 2018). De acordo com Torres-Osorio (2019), diferentes concentrações de EROs afetam de forma variável as diferentes macromoléculas atuantes nos processos de crescimento e desenvolvimento celular como quinases, fosfatases, fatores de transcrição, entre outros, podendo ocasionar, diversos efeitos negativos como apoptose, autofagocitose ou necrose. Pesquisas relacionadas à maturação oocitária *in vitro* (MIV) têm evidenciado que a participação de EROs é fundamental para o reinício da meiose de oócitos em estado de diplóteno, impulsionando, entre outras coisas, a liberação de Ca^{2+} assim como a proteína quinase ativada por mitógeno - MAPK (TORRES-OSORIO, 2019).

As células possuem em seu sistema de defesa diversos fatores de transcrição relacionados a expressão de enzimas que atuam como defensivos contra a presença de concentrações anormais de EROs, entre eles tem-se o fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide - NRF2 (SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018). Quando a célula se encontra fisiologicamente normal, o NRF2 localiza-se no citosol em forma de complexo com a proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (KEAP1). A KEAP1, através de interação com Cullin 3 (Cul3) ligado com RING-box 1 (Rbx1) atuam modulando a atividade de NRF2 e mantendo-o no citoplasma para ubiquitinação e degradação proteossômica (TOSSETTA *et al.*, 2022). O complexo NRF2-KEAP1 atua como um sensor de estresse oxidativo relacionado a presença de fatores químicos nas células.

Figura 3: Esquema da regulação NRF2-ARE.



Fonte: Adaptado de Tosseta *et al.*, 2020.

Diante de uma situação de aumento excessivo da concentração de EROs, o NRF2 rompe o complexo e é deslocado para o núcleo para que em contato com o DNA ocorra a interação nos locais específicos chamados de elementos de resposta antioxidante (ARE) e ative a transcrição de genes envolvidos na defesa antioxidante tais como *SOD*, *CAT*, *PRDX*, *GPX*, entre outros (LIU; PI; ZHANG, 2022), a figura 3 ilustra o esquema da via de sinalização NRF2-ARE. Além disso, sabe-se que o NRF2 regula respostas celulares contra danos no DNA, por exemplo, na expressão da 8-oxoguanina glicosilase 1 (OGG1) que participa da reparação da base mutagênica 8-hidroxioguanosina (8-OHdG) (SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018).

Durante o CIV, diversos fatores podem afetar a manutenção do desenvolvimento normal dos folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs), incluindo a carência de mecanismos fisiológicos de proteção celular e estresse oxidativo. Segundo Steller, Alberts e Ronca (2018), as causas relacionadas ao estresse oxidativo nos sistemas de cultivo se devem, entre outros fatores, a exposição excessiva das células a elevadas concentrações de EROs, decorrentes do excesso de manipulação das células, exposição a luz visível, variações na temperatura, alterações no pH, ausência de compostos antioxidantes endógenos e as concentrações elevadas de oxigênio. A exposição a concentrações elevadas de oxigênio, até

20% maior, no ambiente *in vitro*, em relação ao que se apresenta em condições fisiológicas, contribui significativamente para que haja EO, pois a quantidade de EROs no ambiente é diretamente proporcional aos níveis de oxigênio (SÁ *et al.*, 2018).

Foi demonstrado que o estresse oxidativo afeta as comunicações célula-célula em tecidos epiteliais diminuindo a expressão de proteínas constituintes dessas junções como as ocludinas, além de impactar nas junções aderentes devido a fosforilação de proteínas voltadas ao desmanche dessas junções (CHELOMBITKO, 2018). A ausência de substâncias capazes de impedir o impacto negativo relacionado ao excesso de EROs no CIV contribui para que sejam também danos nas vias comunicantes existentes entre as células da granulosa e o oócito, de maneira a comprometê-las negativamente ocasionando danos, levando consequentemente a baixa qualidade dos oócitos e atresia folicular (SHI *et al.*, 2016).

O papel negativo das EROs no ambiente celular tem sido cada vez mais estudado afim de se minimizarem os danos ocasionados quando estas se apresentam em concentrações que suprimem o sistema de defesa antioxidante endógeno. Diante disso o uso de antioxidantes naturais como óleos essenciais, extratos vegetais e moléculas isoladas tem sido apresentado como alternativa promissora para a cultura de células no ambiente *in vitro* no qual a quantidade de EROs é significativamente superior ao ambiente *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2019; TORRES-OSORIO *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2022).

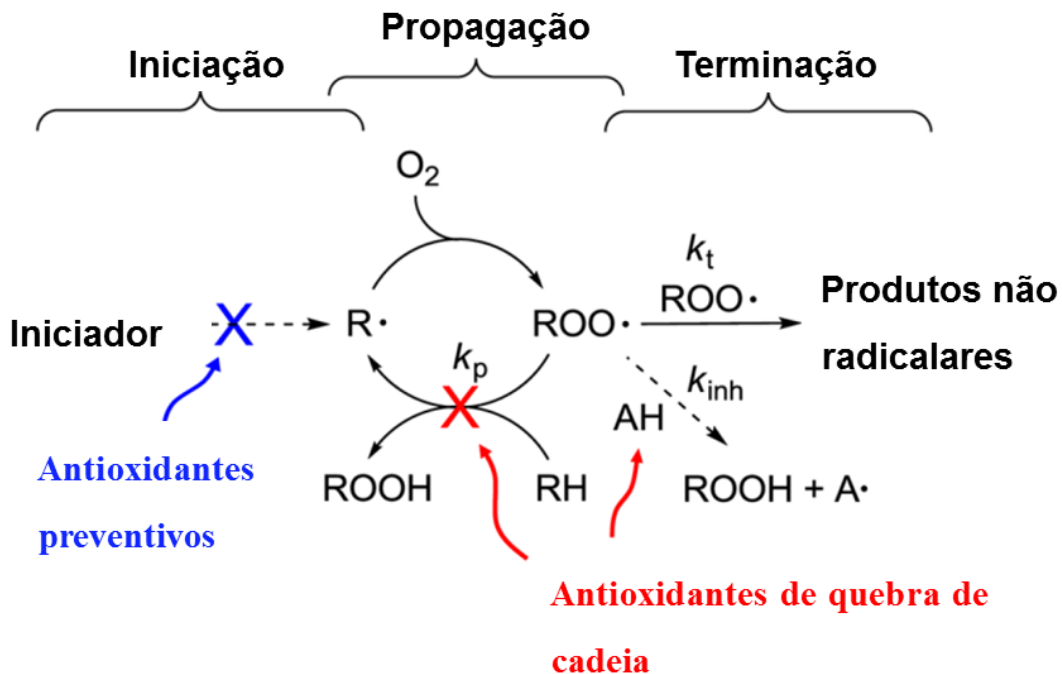
2.4 Compostos antioxidantes como suplementos de meios de cultivo de folículos pré-antrais

Segundo Santos *et al.* (2018), os antioxidantes são substâncias com capacidade de doar elétrons e, dessa maneira, neutralizar moléculas oxidantes que, a partir de então, perdem sua reatividade e passam a não oferecer risco às macromoléculas celulares. De acordo com Valgimigli e Pratti (2012), por definição, para que um composto seja classificado como antioxidante ele deve ser capaz de bloquear ou mesmo retardar o processo oxidativo mesmo quando em concentrações inferiores a 1% em relação a quantidade de material a ser protegido. Em se tratando de sistemas biológicos as estruturas a serem protegidas de moléculas oxidantes são compostos lipídicos, proteínas, DNA e outras moléculas e organelas que compõem os sistemas celulares. Nesses componentes orgânicos as reações radiculares ocorrem em cadeia, mediadas em grande parte por radicais peroxil, assemelhando-se a reações de autoxidação de hidrocarbonetos. Conforme Amorati, Foti, Valgimigli (2013), no que diz respeito a sistemas biológicos, dois tipos de antioxidantes podem atuar de forma a bloquear ou amenizar o ataque de espécies reativas: os antioxidantes diretos e os indiretos.

No primeiro grupo encontram-se substâncias que atuam diretamente sobre as espécies radicalares neutralizando sua atividade. No segundo grupo estão substâncias com menor capacidade de neutralização de oxidantes fortes e por isso agem sobre os radicais secundários mais fracos gerados a partir da reação de uma espécie radicalar mais forte com o substrato lipídico, por exemplo.

Os antioxidantes diretos são organizados em dois tipos, a depender do mecanismo de ação da substância, os preventivos e os de quebra-de-cadeia. Os preventivos atuam inibindo a iniciação da cadeia oxidativa por uma espécie reativa, enquanto os de quebra-de-cadeia atuam competindo com o radical peroxil, mais rapidamente do que o substrato passível de oxidação, de modo a formarem produtos que não propaguem a cadeia de oxidação (AMORATI, FOTI, VALGIMIGLI, 2013). Por reagirem diretamente com o radical peroxila os antioxidantes de quebra de cadeia são tidos com os antioxidantes diretos mais importantes. A figura 4 ilustra o esquema simplificado dos modos de intervenção dos antioxidantes preventivos e de quebra de cadeia na cascata de oxidação lipídica.

Figura 4: Mecanismo de autoxidação de hidrocarbonetos.



Fonte: Adaptado de Amorati, Foti e Valgimigli (2013).

O grupo de antioxidantes classificados como indiretos diz respeito a substâncias que apesar de não apresentarem um comportamento antioxidante mais expressivo na proteção de membranas lipídicas, por exemplo, agem ativando vias de sinalização para expressão de

enzimas antioxidantes, sendo os produtos naturais como os óleos essenciais, extratos vegetais e fitoconstituintes isolados os representantes mais relevantes desse grupo (VALGIMIGLI; PRATTI, 2012).

Nas células, a produção de espécies capazes de ocasionar danos aos diversos componentes celulares e também prejudicarem vias de sinalização, são passíveis de regulação através do uso de substâncias (enzimas e moléculas antioxidantes) que atrasam ou mesmo inibem processos oxidativos através de diferentes mecanismos de ação (CALAF *et al.*, 2018). Okediran *et al.* (2017), classificam as substâncias antioxidantes como pertencentes a duas classes - enzimáticas e os não-enzimáticas - a depender de suas origens, se endógena ou obtidas por meio da alimentação (exógenas), respectivamente.

A classe de antioxidantes enzimáticos inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e também a catalase (CAT) como seus principais representantes (LAGUERRE *et al.*, 2007). Essas enzimas atuam de forma cooperativa e simultânea. A SOD transforma dois ânions superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ao passo que CAT e GPX, atreladas a atividade da glutathione (GSH) metabolizam o peróxido de hidrogênio em água (YOUNG; WOODSIDE, 2001). A GSH, apesar de estar associada a maquinaria antioxidante não se trata de um antioxidante enzimático. Ela contribui para a manutenção dos níveis adequados de EROs no ambiente celular atuando na regeneração das enzimas GPXs e também participa diretamente em reações envolvendo a enzima glutathione-S-transferase (KENNEDY, L. *et al.* 2020).

Já os antioxidantes não-enzimáticos, por outro lado, podem ser compostos de origem sintética ou produtos oriundos de fontes naturais (WAŚKIEWICZ; BESZTERDA; GOLIŃSKI, 2014), nesse último caso estão incluídos os fenilpropanóides, tocoferóis, carotenoides e flavonoides (MORAIS, 2018). Sabe-se que o ácido ascórbico diminui a produção de EROs em oócitos bovinos, melhorando assim seu potencial de desenvolvimento embrionário (TORRES-OSORIO, 2019). O α -tocoferol, por sua vez, tem mostrado efeitos benéficos no que diz respeito principalmente à taxa de blastocistos e sua celularidade (OLSON; SEIDEL, 2000). Em se tratando do sistema de produção de embriões *in vitro* essa substância pode apresentar, entre outros benefícios, a facilidade em atravessar a bicamada lipídica, devido seu caráter hidrofóbico, e dessa forma adentrar ao interior das células e reduzir as EROs ali presentes. Vásquez, Torres e Rojano (2014) relataram a diminuição da produção de EROs em meios de cultura, bem como melhoramento do desenvolvimento embrionário bovino por meio da redução de EROs intracelular em oócitos maturados a partir do uso de vitamina C como suplemento. A cisteína e a glutathione têm sido utilizadas em

protocolos de PIVE e têm mostrado bons resultados como melhoria em taxas de desenvolvimento de embriões bovinos e também significativo aumento na porcentagem de blastocistos e aumento na qualidade de embriões bovinos (SANTOS *et al.* 2018). A hipotaurina é amplamente utilizada na PIVE, pelo fato de mimetizar as condições antioxidantes fisiológicas do plasma seminal. Estudos também demonstraram que a melatonina tem efeitos benéficos em se tratando da captura de radicais livres, reduzindo assim a concentração de EROs e aumentando a expressão de enzimas antioxidantes como a SOD e também de elevar os níveis de GSH, além de melhoria na função mitocondrial (TORRES-OSORIO, 2019).

A atividade reativa de agentes antioxidantes também produz espécies radicalares como produtos, porém tais moléculas não são reativas e, portanto, não promovem a propagação de reações em cadeia como ocorre com as espécies reativas de oxigênio. Seus radicais não-reativos são facilmente neutralizados ao reagirem com outro radical, formando espécies neutras (SOUSA *et al.*, 2007).

Portanto, os resultados dos estudos *in vitro* com substâncias antioxidantes em sistemas biológicos têm se mostrado cada vez mais promissores. Diante disso, muitas pesquisas têm sido direcionadas a estabelecer o uso de antioxidantes mais eficientes para as diferentes fases de CIV e PIVE (MALEKI *et al.*, 2016). O uso de agentes antioxidantes derivados de plantas tem sido cada vez mais explorado, devido sua eficiência e custo relativamente baixo (BADEGGI *et al.*, 2020). Nesse contexto, pesquisas envolvendo a PIVE de várias espécies de mamíferos com a utilização de fitoquímicos bioativos como suplementos têm revelado a eficácia antioxidante desses produtos, entre eles: antocianinas; quercetina; resveratrol; rutina; extratos vegetais de *Crocuss ativus* L. e *Papaver rhoeas* L, além de óleos essenciais como os de *Lippia origanoides* e *Thymus mumbyanus* (YOU *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014; MORETTI *et al.*, 2012; MALEKI *et al.*, 2014; RAJABI-TOUSTANI *et al.*, 2013; SOLLECITO *et al.*, 2016; CHIKHOUNE *et al.*, 2015).

Contudo, resultados positivos só são atingidos com o uso de concentrações ideais dos suplementos adicionados. Portanto, encontrar as concentrações ideais para os antioxidantes exógenos tem sido um grande desafio, pois sabe-se que altas concentrações podem ocasionar efeitos negativos e deletérios ao sistema de cultivo, enquanto que baixas concentrações podem não surtir efeito (SANTOS *et al.*, 2018).

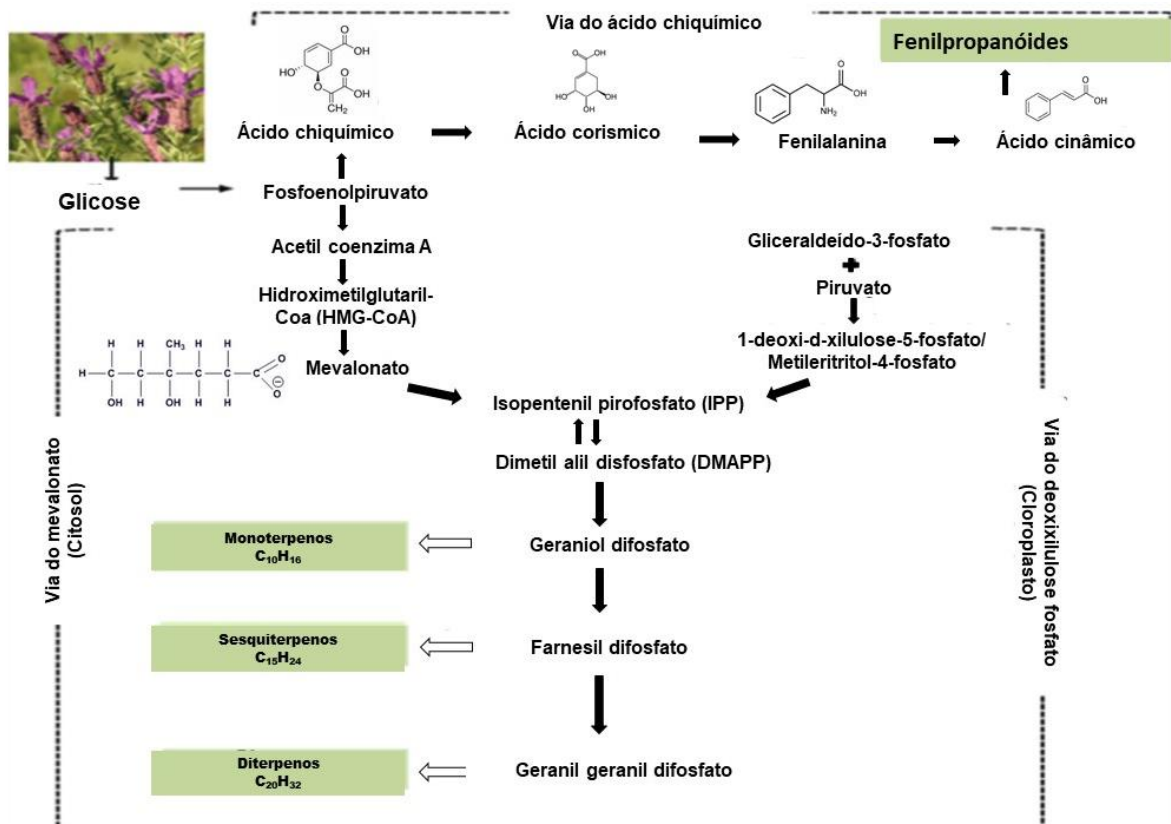
2.5 Óleos essenciais como fontes de compostos antioxidantes

Muitos compostos apresentam, através de diferentes mecanismos, capacidade inibidora no que diz respeito a atividade de espécies geradoras de EO. Tais mecanismos envolvem a inibição de processos nocivos a nível celular e tecidual ou mesmo reparando danos ocasionados pela formação de EROs como degeneração de membranas celulares (WU *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021; ESFANDI; WALTERS; TSOPMO *et al.*, 2019; ADWAS *et al.*, 2019; KAY *et al.*, 2019; CARUSO *et al.*, 2020).

Os produtos naturais vêm cada vez mais se destacando como alternativa para o uso em sistemas biológicos por apresentarem baixa toxicidade às células a serem protegidas bem como aos constituintes presentes no ambiente extracelular como a MEC (TORRES-OSORIO *et al.*, 2019). Nesse sentido, os óleos essenciais, provenientes do metabolismo secundário de vegetais, constituem uma via promissora no que diz respeito a utilização de produtos naturais como fonte de substâncias menos agressivas aos cultivos celulares, podendo ser obtidos de plantas inteiras e/ou de partes, como sementes, flores, folhas, cascas, frutos entre outras (SAKHTEMAN *et al.*, 2020; KESRAOUI *et al.*, 2022). Tais produtos são misturas de moléculas voláteis e aromáticas, apresentando, em temperatura ambiente, aspecto oleoso. Existem várias atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais, como atividade antibacteriana, virucida, nematocida e inseticida, (MEDBOUHI *et al.*, 2019; SCHNITZLER, 2019; D'ADDABBO *et al.*, 2021; ISMAN, 2020) com destaque para a ação antioxidante (CAVALCANTE; SILVEIRA; SILVA, 2020; EL-GAWAD *et al.*, 2019; MAHDI *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2019).

Diferente de metabólitos primários como açúcares, nucleotídeos e aminoácidos, que são comuns a todo o reino vegetal, os óleos essenciais são distribuídos, de maneira restrita, a um grupo ou a uma espécie específica (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A biossíntese dos óleos essenciais segue a partir de três rotas metabólicas principais e distintas (Figura 5): (i) a via do fosfato-metil-eritritol (MEP), que leva aos monoterpenos e diterpenos; (ii) a via do ácido mevalônico, que leva aos sesquiterpenos; e (iii) a via do ácido chiquímico que dá origem aos fenilpropanóides (DONG; LIN, 2021).

Figura 5: Biossíntese de terpenoides e fenilpropanoides em plantas



Fonte: Adaptado de Said-Al, Hikal e Mahmoud (2017).

Os compostos terpênicos são formados por unidades de isopreno, os quais são constituídos, por sua vez, por unidades de 5 carbonos tendo estrutura ramificada. Essas ramificações nas estruturas dos terpenos dão origem a diferentes classes, cada uma delas com funções diferentes, sendo classificadas em relação a quantidade de unidades pentacarbonadas. No caso específico dos monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, estes são constituídos por duas, três e quatro unidades de isopreno, respectivamente (JUGREET *et al.*, 2020). As classes de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides apresentam relevante importância industrial, em diversos setores como na fabricação de perfumes e alimentos como flavorizantes, na medicina, por suas atividades fitoterápicas, entre várias outras aplicações possíveis (KESRAOUI *et al.*, 2022; MARCIANTI; VALENTINA, 2020). Estudos mostram que essas classes de terpenos apresentam também diversificadas atividades farmacológicas atuando, por exemplo, como receptores hormonais (JIANG *et al.*, 2021; SAKHTEMAN *et al.*, 2020), anti-inflamatória (GHASEMI-DEHNOO *et al.* 2022). A tabela

1 mostra algumas atividades relacionadas a moléculas de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides.

Tabela 1: Atividades biológicas de diferentes grupos moleculares presentes em óleos essenciais.

CLASSE	MOLÉCULA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	ALVO	REFERÊNCIA
Monoterpenos	Pinocarvona Mirceno α -pineno	Receptores hormonais (<i>in vitro</i>)	Andrógeno	Sakhteman <i>et al.</i> (2020)
Sesquiterpenos	Germacrenos, eudesmenos, guaianolideos	Antiobesidade e antidiabético (<i>in vitro</i>)	Lipases e α - glicosidase	Jiang <i>et al.</i> (2021)
Fenilpropanóides	Anetol	Anti-inflamatória (<i>in vivo</i>)	Ratos NMRI	Ghasemi- Dehnoo <i>et al.</i> (2022)
	Eugenol	Antioxidante (<i>in vitro</i>)	Mudança de pH	Fujisawa <i>et al.</i> (2002)

Fonte: Autor (2022).

A composição química dos óleos essenciais pode apresentar diversificação em relação ao percentual de metabólitos secundários. Essas variações estão atreladas principalmente a fatores genéticos, mas fatores ambientais, tipos de metodologia usada na extração, entre outros também podem levar a mudanças nos teores moleculares dos óleos essenciais. Alguns desses metabólitos são relatados de maneira mais frequente, a saber: anetol, eugenol, metil eugenol, cânfora, mirceno, α -pineno, germacreno-D, espatulenol, δ -elemeno, entre outros (KESRAOUI *et al.*, 2022; MARCIANTI; VALENTINA, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, o potencial antioxidante de óleos essenciais tem sido cada vez mais investigado com intuito de se desenvolver novos agentes antioxidantes (WERRIE *et al.*, 2020). Nesse sentido, a tabela 2 traz diversos trabalhos voltados a avaliação do potencial antioxidante de óleos essenciais de várias espécies de plantas frente a ensaios antioxidantes como DPPH, ABTS e β -caroteno/ácido linoleico.

Tabela 2. Atividade antioxidantes de óleos essências de diferentes espécies de plantas.

ESPÉCIE	ENSAIO/ TESTE	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	REFERÊNCIA
<i>Xanthium Strumarium</i> ; <i>Citrus reticulata</i> ; <i>Illicium verum</i> Hook f; <i>Artemisia aragonensis</i> Lam	DPPH	Alta	El-Gawad <i>et al.</i> (2019); Mahdi <i>et al.</i> (2021); Yu <i>et al.</i> (2019); Chebbac <i>et al.</i> (2022)
<i>Citrus reticulata</i> Blanco cv. Kinokuni; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	ABTS	Alta	Lin <i>et al.</i> (2021)
<i>Ocimum gratissimum</i>	β -caroteno/ ácido linoleico	Alta	Barbosa <i>et al.</i> (2021)

Fonte: Autor (2022).

Estudos prévios também têm evidenciado a eficácia antioxidante de óleos essenciais e de seus constituintes puros frente a tecidos vivos. Santos *et al.* (2019), por meio de análises de sobrevivência celular e ensaios de viabilidade mitocondrial, demonstraram que a utilização do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* como suplemento antioxidante no meio de cultura melhorou o desenvolvimento embrionário durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, proporcionando aumento significativo assim como auxiliando na viabilidade das células do cúmulo e melhoria na qualidade dos embriões.

Vasconcelos (2020), estudando os impactos do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* durante o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários bovinos, através de ensaio de viabilidade celular mostrou que o óleo aumentou a viabilidade celular de oócitos e células da granulosa avaliados, além de elevar os níveis de mRNAs das enzimas antioxidantes peroxirredoxina 6 e catalase como evidenciado por análise de PCR em tempo real. A molécula de eugenol isolada também modulou positivamente os níveis de mRNA para a enzima antioxidante glutathiona peroxidase em folículos ovarianos bovinos cultivados *in vitro* (VASCONCELOS *et al.*, 2021).

2.6 Aspectos botânicos, químicos e farmacológicos de óleo essencial de *Croton grewoides*

Croton grewoides (Figura 6) é uma espécie vegetal com propriedades aromáticas, remetendo comumente ao aroma de canela. Conhecida popularmente como “canela de cunhã”, “marmeleiro” ou “canelinha”, é uma planta subarborescente com altura média de 1,4 metros. As flores apresentam-se unissexuadas e com produção de látex ausente. Sua floração acontece nos meses de fevereiro e março, porém a frutificação ocorre entre os meses de abril e maio. É encontrada com relativa facilidade nas regiões da Caatinga e Cerrado, nos Estados do Ceará, Bahia, Sergipe, Alagoas, Piauí, Pernambuco, Rio Grande de Norte, Paraíba e Minas Gerais (CAVALCANTE; SILVEIRA; SILVA, 2020). Às folhas e talos dessa planta são atribuídos aromas que remetem a erva-doce e também ao cravo-da-Índia. Contudo, a aromaticidade é variável nessa espécie devido a existência de diferentes genótipos dessa planta (SILVA et al., 2021). Na medicina popular essa planta tem sido usada, entre outras finalidades, como sedativa, estimulante de apetite, e também para alívio de distúrbios

Figura 6: Registro da planta “canelinha” (*Croton grewoides*) em época de floração.



Fonte: Autor (2021).

intestinais (CASTRO et al., 2020), inflamações e febre (OLIVEIRA et al., 2020).

A tabela 3 contém algumas das propriedades farmacológicas descritas na literatura para o óleo essencial de *C. grewoides*, entre elas a propriedade antioxidante.

Tabela 3. Atividades biológicas de óleo essencial de *C. grewoides*.

ATIVIDADE	ALVO	REFERÊNCIA
Inseticida	Chrysodeixis includens	Santos et al. (2022)
Antidiarreica	Ratos	Cavalcante, Silveira & Silva (2020)
<i>Antitumoral</i>	Linhagem de melanoma (SK-MEL-28)	Andrade (2021)
<i>Antioxidante</i>	DPPH FRAP ABTS Co-oxidação do β -caroteno/ ácido linoleico	Oliveira et al. (2020)

Fonte: Autor (2022).

A espécie *C. grewoides* apresenta quimiotipos (variações de constituintes químicos majoritários) distintos nos óleos essenciais de suas folhas, sendo conhecidos até o momento cinco tipos, são eles: anetol, metil-eugenol, eugenol, estragol e (Z)-isoosmorhizol (OLIVEIRA et al., 2021; OLIVEIRA, 2018; MORAIS et al., 2006; SILVA *et al.*, 2021). Essas variações ocorrem devido a fatores genéticos para a planta se adequar ao clima, tipo de solo, altitude e outras condições de uma determinada região sem afetar significativamente seu fenótipo (características visíveis) (SILVA *et al.*, 2021).

2.7 Óleo essencial de *Croton grewoides* quimiotipo anetol: propriedades biológicas e potencial antioxidante

As propriedades biológicas de *Croton grewoides* quimiotipo anetol (OECG-A) foram investigadas e têm, cada vez mais, sido relatadas as diversas potencialidades dessa variante de *C. grewoides*. A tabela 4 mostra diversas atividades biológicas do OECG-A incluindo atividade gastroprotetora, neuropatia diabética autonômica, anti-inflamatórias, antioxidante, inseticida, bloqueador de excitabilidade neural, antiespasmódica e cicatrizante.

Tabela 4: Propriedades biológicas de *C. grewioides* quimiotipo anetol.

ATIVIDADE	ENSAIO/ TESTE	REFERÊNCIA
Gastroprotetora	<i>In vivo</i> (Ratos)	Coelho-de-Souza et al. (2013)
Neuropatia diabética autonômica	<i>In vivo</i> (Ratos)	Silva-Alves et al. (2021)
Anti-inflamatória	<i>In vivo</i> (Camundongos)	Serra et al. (2018)
Antioxidante	Ácido tiobarbitúrico-espécies reativas	Morais et al. (2006)
Inseticida	<i>In vitro</i> (<i>Zabrotes Subfasciatus</i>)	Silva et al. (2008)
Bloqueador de excitabilidade neural	<i>In vitro</i> (Ratos)	Silva-Alves et al. (2015)
Antiespasmódica	<i>In vitro</i> (Ratos)	Lima et al. (2020)
Cicatrizante	<i>In vivo</i> (Camundongos)	Cavalcanti et al. (2012)

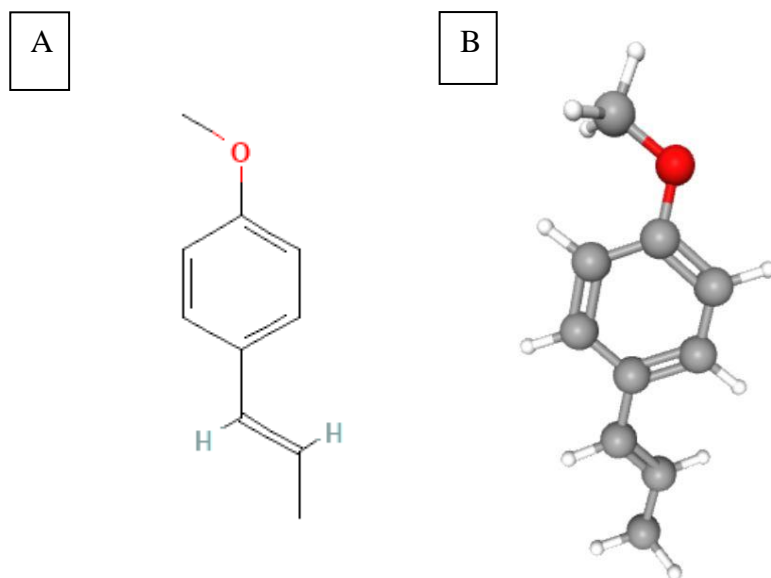
Fonte: Autor (2022).

2.8 Anetol: aspectos químico-biológicos e atividade em sistemas de cultivo celular

O anetol (trans-1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno) é uma molécula que apresenta em sua estrutura um grupamento fenólico e se faz presente em uma ampla variedade de vegetais como *Foeniculum vulgare* e *Melissa officinalis* (SHAROPOV, 2015), *Pimpinella anisum* (MARINOV; VALCHEVA-KUZMANOVA, 2015), e *C. grewioides* (SOUSA *et al.*, 2022). Estruturalmente essa molécula se enquadra no grupo fitoquímico dos fenilpropanóides, o qual tem reconhecidas e variadas atividades biológicas, sendo o eugenol e seus derivados representantes bem conhecidos nesse grupo de metabólicos por apresentarem, entre outras, elevada atividade antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A molécula de anetol (Figura 8) apresenta um anel aromático possuindo uma ligação com um grupo metoxila ($\text{CH}_3\text{O}-$) e outra ligação a um radical propenila (C_3H_5-) (MORAIS, 2018). As duplas ligações conjugadas em anetol, assim como no isoeugenol e eugenol são capazes de estabilizar a reatividade de benziloxi e feniloxi (CHAINY *et al.*, 2000). Devido a isso, essa molécula apresenta toxicidade bastante reduzida.

Figura 7: Estrutura química do anetol: bidimensional (A) e tridimensional (B).



Fonte: Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anethole#section=Structures>

Chainy *et al.* (2000), investigando as ações anti-inflamatórias e anticancerígenas do anetol em células mielóides (ML1-a), mostraram que essa molécula bloqueia a ativação do NF- κ B (fator nuclear kappa- β) além de outras vias de sinalização e apoptose como AP-1 e JNK, induzidas pelo fator de necrose tumoral (TNF). Segundo os autores, a atividade de inibição do TNF pelo anetol se dá nas etapas iniciais da cascata de transdução de sinais dependentes de TNF. No mesmo trabalho foi demonstrado que o anetol atua como mediador de GSH o que levou a um decréscimo nos níveis de EROs e com isso o bloqueio da peroxidação lipídica induzida por TNF.

A capacidade antioxidante do anetol é retratada em diversos trabalhos que confirmam a sua ação no combate a radicais livres tanto através de ensaios direto de inibição de radicais oxidantes (MORAIS *et al.*, 2006; FREIRE *et al.* 2005), quanto no cultivo de *in vitro* células (CHAINY *et al.* 2000; SÁ *et al.* 2018; MORAIS, 2018; SÁ *et al.* 2016), os quais mostram

que essa molécula pode agir por ativação de vias de sinalização de enzimas e também por ação direta, como potencial inibidor de radicais livres, em especial as EROS, inibindo a peroxidação lipídica através da captação de radicais hidroxila, os quais não podem ser neutralizados por mecanismos enzimáticos endógenos (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

Segundo Sá *et al.* (2015), a capacidade de ação antioxidante é importante para a manutenção da integridade da membrana basal dos folículos ovarianos mantendo-as livres de possíveis danos ocasionados por excesso de EROs no meio. As substâncias antioxidantes podem atuar na proteção da membrana basal prevenindo, removendo ou mesmo restaurando as células. O potencial antioxidante do ácido ascórbico como molécula antioxidante, por exemplo, foi demonstrado por promover a reparação e manutenção das membranas celulares danificadas por EROs, proporcionando, dessa forma, a manutenção e a integridade de membranas lipídicas (ATTIA *et al.* 2020). A inibição da peroxidação lipídica pelo anetol se dá através da captação de radicais hidroxila, os quais não podem ser neutralizados por mecanismos enzimáticos endógenos (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

O anetol tem se mostrado como uma excelente alternativa à manutenção dos níveis de EROs normais nos sistemas celulares devido ao seu potencial de ação antioxidante por via direta, potencializando a proteção de membranas lipídicas além de inibir potenciais vias de sinalização danosas ao DNA (MORAIS, 2018).

Estudos relatam, entre outros achados, que o anetol atua reduzindo a peroxidação lipídica, além de contribuir para aumento nos níveis de expressão de RNAm de enzimas como superóxido dismutase e catalase (MANSUY *et al.* 1986; DONGARE *et al.* 2012; KHANNA *et al.* 1998). A adição de anetol ao meio de CIV de folículos secundários isolados de caprinos, reduziu as taxas de EROs e estimulou o desenvolvimento folicular pelo aumento da retomada da meiose dos oócitos presentes nos folículos (SÁ *et al.*, 2016). Em meios de cultura de folículos pré-antrais caprinos *in situ* o anetol mostrou-se capaz de melhorar a sobrevivência e o crescimento após 7 dias de cultivo em diferentes concentrações, elevando a porcentagem de folículos morfológicamente normais, proporcionando acréscimo nos níveis de glutathione peroxidase e proporcionando a proliferação das células da granulosa (SÁ *et al.*, 2018).

Morais (2018), avaliando os efeitos da suplementação de anetol e rubinona na vitrificação e incubação *in vitro* de tecido ovariano de ovinos, constatou que o anetol na concentração de 2000 µg/mL foi capaz de manter a morfologia de FOPAs quando comparado ao cultivo fresco, contribuindo positivamente para o processo de ativação folicular exibindo

decréscimo do número de folículos primordiais e concomitante aumento no número de folículos em desenvolvimento em relação ao grupo controle. Nesse estudo, a densidade das células estromais criopreservadas com adição de anetol na solução de vitrificação manteve uma porcentagem significativa de células saudáveis em relação ao controle.

Em estudo voltado para avaliar a capacidade do anetol em induzir a retomada da meiose em oócitos caprinos, Sá *et al.* (2015) mostraram que, nas concentrações de 30 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o anetol foi capaz de promover nos oócitos em estudo a retomada da meiose. No mesmo trabalho, avaliando a capacidade antioxidante do anetol os autores obtiveram, para as concentrações de 30 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, níveis de EROs significativamente inferiores em relação aos demais tratamentos.

Avaliando os efeitos de diferentes concentrações (0,5 μM , 1 μM e 10 μM) de anetol na prevenção da apoptose em células de fibroblastos da pele humana utilizando 300 μM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como agente estressor, Galicka *et al.* (2014) relataram que o pré-tratamento com 1 μM de anetol foi suficiente por aumentar em duas vezes o crescimento celular em comparação ao tratamento com apenas o H_2O_2 . Tal concentração se mostrou suficiente em suprimir a citotoxicidade causada pelo peróxido. Os autores relataram também que a biossíntese de colágeno de fibroblastos é extremamente comprometida (até 54%) a partir do tratamento com H_2O_2 e que o pré-tratamento com anetol (0,5 e 1 μM) foi capaz de impedir a diminuição da biossíntese de colágeno.

2.9 Metodologias para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais

Os métodos de avaliação da capacidade antioxidante de uma substância podem ser agrupados em dois grupos a depender da forma de ação do antioxidante, se por doação de hidrogênio ou por doação de elétrons. Tais técnicas se baseiam nos mesmos princípios de neutralização de espécies reativas, porém a cinética de reação e o potencial de reações colaterais são distintos (GULCIN, 2020). Aqueles que são baseados em transferência de elétrons analisam a habilidade de uma molécula ou substância antioxidante em transferir elétrons e assim causar a redução de qualquer composto, sendo caracterizados por mudança na coloração da solução na proporção em que o radical/oxidante é neutralizado, porém esse método pode ser influenciado pelo pH do meio, tendo em vista que a cinética se baseia necessariamente na desprotonação e potencial de ionização do grupo funcional; enquanto que os que se baseiam na doação de hidrogênio examinam a aptidão do antioxidante em extinguir os radicais livres por meio de doação de hidrogênio, não sendo influenciados pelo solvente

ou pH da solução, porém são limitados pela presença de agentes redutores que podem levar a equívocos como reatividade erroneamente elevada (APAK *et al.*, 2016).

Existem diversos tipos de ensaios para se avaliar o potencial antioxidante de moléculas ou substâncias. Os testes para avaliar o potencial antioxidante são diferentes em diversos fatores, sendo necessária a análise em mais de uma avaliação quando se pretende inferir tal poder em uma molécula ou substância. De acordo com Gulcin (2020), os ensaios que se baseiam no método de neutralização de espécies reativas por doação de hidrogênio são:

- Capacidade de absorção de radicais de oxigênio;
- Parâmetro antioxidante total de aprisionamento de radicais;
- Inibição da oxidação de LDL induzida;
- Ensaio de capacidade de eliminação de radicais totais;
- Ensaio de clareamento de β -caroteno;
- Ensaio quimioluminescente.

Já em relação aos testes baseados na transferência de elétrons para redução de oxidantes os ensaios a seguir podem ser utilizados:

- Ensaio de fenólicos totais por ensaio reagente Folin–Ciocalteu;
- Ensaio de capacidade antioxidante de equivalência de Trolox (TEAC);
- Ensaio de poder antioxidante redutor de íons férricos (FRAP);
- Ensaio do potencial antioxidante total, utilizando um complexo Cu^{2+} como oxidante;
- Ensaio de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•);
- Ensaio de eliminação de radicais do ácido 2,2-Azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS•⁺);
- Ensaio de eliminação do radical N,N-Dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD•⁺);
- Ensaio do poder antioxidante redutor de íons cúpricos (Cu^{2+}) (CUPRAC).

Os principais testes usados, em se tratando do método de transferência de elétrons, utilizando óleos essenciais como antioxidantes são os ensaios em DPPH e ABTS (CHEBBAC *et al.*, 2022; MAHDI *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2021; BARBOSA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020; WERRIE *et al.*, 2020; EL-GAWAD *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2019).

Os resultados da capacidade antioxidante de uma substância pelo método de captura do radical DPPH são baseados em mecanismos de transferência de elétrons, originando a forma reduzida DPPH-H (difetil-picril-hidrazila), molécula estável, que ao ser reduzido apresenta decréscimo na absorvância, perdendo a coloração violeta e adquirindo a cor amarela. Sendo assim, quanto menor a absorvância, maior a atividade antioxidante (BOROSKI *et al.*, 2015).

Estudos mostram que a presença de diferentes metabólitos em óleos essenciais influencia diretamente as atividades desses óleos. As interações entre as moléculas podem ocorrer de forma a potencializar determinada ação, por efeito sinérgico, ou, essas interações podem levar a inativação de uma potencial ação desse óleo, por meio de interações antagônicas dos constituintes do óleo (OLIVEIRA *et al.*, 2020). As estruturas químicas de diferentes compostos foram analisadas e foi observado que a presença de duplas ligações conjugadas em moléculas de monoterpenos eram responsáveis pela alta capacidade antioxidante, fato não observado nos monoterpenos sem as duplas ligações estruturadas de igual forma (WOJTUNIK *et al.*, 2014). É sabido também que a presença de compostos fenólicos, assim como monoterpenos cíclicos que apresentam ligações duplas cuja estrutura tenha ligação a grupamentos hidroxila, também exibem reconhecida atividade antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

O aperfeiçoamento das biotécnicas reprodutivas como IA, TE e PIVE tem contribuído ao aumento do fornecimento de alimentos ricos em proteína animal como carne e leite bovinos (SOUZA, 2020). Todavia, em espécies de mamíferos como os bovinos, a porcentagem de folículos ovarianos em estágios avançados de desenvolvimento (folículos antrais) se restringe a cerca de 5%. Assim, a maior parcela de folículos presentes nos ovários, os folículos pré-antrais, acaba sendo perdida pelo processo de degeneração folicular, a atresia. Assim, faz-se necessário o aperfeiçoamento de biotécnicas que visem o aproveitamento dos folículos que estão em estágio pré-antral, cerca de 95% (PAULINO et al., 2022).

O CIV de folículos ovarianos é uma biotécnica que possui a finalidade de possibilitar o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários), alcance da maturação de oócitos oriundos desses folículos e posterior fertilização *in vitro* de tais oócitos (SIMON; KUMAR; DUNCAN, 2020). O cultivo de folículos ovarianos pode ser realizado de duas formas, o cultivo de folículos isolados, que permite avaliar a ação de diferentes substâncias sobre os folículos (AZEVEDO et al., 2022), ou mantendo os folículos presentes em fatias de tecido ovariano que, por sua vez, permite a comunicação com as células estromais imediatamente circunvizinhas (COSTA et al., 2021). Essa biotécnica tem demonstrado avanços. Em algumas espécies como bubalinos (GUPTA et al., 2008) e ovinos (ARUKANUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010), por exemplo, foram relatados a formação de embriões a partir de folículos secundários cultivados *in vitro*. Contudo, resultados semelhantes ainda não foram relatados para a espécie bovina.

Um dos grandes limitantes ao CIV de folículos ovarianos pré-antrais é a ocorrência de estresse oxidativo. Devido à alta concentração de oxigênio no ambiente *in vitro* são formadas grandes quantidades de EROs, essas, possuem potencial de danificar as diferentes estruturas e organelas celulares, interferir em vias de sinalização e conseqüentemente ocasionar a morte das células (ADWAS et al., 2019). Por essa razão, faz-se crucial o uso de substância capazes de contrabalançar as altas taxas de EROs durante o CIV de folículos ovarianos.

Diferentes produtos de origem vegetal como extratos vegetais (COSTA et al., 2020), óleos essenciais (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2023), e fitoconstituintes isolados (SÁ et al., 2018), vêm sendo explorados por seus diversos benefícios, entre eles o potencial antioxidante. Nesse sentido, o óleo essencial de *C. grewoides* possui, entre seus benefícios já relatados, potencial antioxidante (MORAIS et al., 2006). O constituinte predominante desse óleo, o anetol, tem capacidade antioxidante conhecida e já foi demonstrado promover, entre outros

benefícios, a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos ovarianos de caprinos (SÁ et al., 2018).

Dessa forma, este trabalho, buscou pela primeira vez avaliar os benefícios do uso de óleo essencial de *C. grewioides* durante o CIV de tecido ovariano bovino. Para verificar o sinergismo entre o anetol e os demais componentes do óleo essencial durante a cultura de tecido ovariano, foi realizada uma cultura em paralelo utilizando anetol isolado. Este trabalho, assim, aborda pela primeira vez o uso de anetol como suplemento de meio de cultivo de tecido ovariano bovino. Com isso, o presente trabalho poderá contribuir para pesquisas futuras voltadas ao cultivo de tecido ovariano bovino, no que diz respeito a ação de produtos de origem natural como suplementos de meio de cultura, e também fornecerá resultados importantes nos que tange ao sinergismo dos componentes do óleo essencial de *C. grewioides*.

4 HIPÓTESES

- O OECEG (quimiotipo anetol) obtido possui potencial antioxidante significativo;
- A adição do OECEG e do anetol ao meio de CIV de tecido ovariano bovino promove a sobrevivência, ativação e desenvolvimento dos folículos ovarianos;
- O uso de OECEG e de anetol em meio de cultivo de tecido ovariano bovino proporciona aumento do número de células estromais e eleva o conteúdo de colágeno;
- A adição de OECEG e do anetol ao meio de cultivo controla o nível redox no ambiente celular e promove maior ativação de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX;
- A atividade antioxidante de OECEG propicia a homeostase redox mantendo assim a expressão de RNAm para *SOD*, *CAT*, *GPX1*, *PRDX6* e *NRF2* em níveis reduzidos em tecido ovariano bovino cultivado.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente o OEKG, aferir a atividade antioxidante de OEKG e avaliar os efeitos da adição de OEKG e/ou de seu constituinte majoritário (anetol) durante o CIV de tecido ovariano bovino.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os constituintes químicos do OEKG;
- Avaliar o potencial antioxidante do OEKG;
- Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de OEKG ou anetol (1µg/ ml, 10µg/ ml, 100µg/ ml e/ ou 1000µg/ ml) sobre a ativação, crescimento e sobrevivência de folículos ovarianos pré-antrais, bem como nas células do estroma e na configuração da matriz extracelular (MEC) do tecido ovariano bovino após 6 dias de CIV;
- Avaliar a influência de OEKG ou anetol (1µg/ ml, 10µg/ ml, 100µg/ ml e/ ou 1000µg/ ml) na integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino após 6 dias de CIV;
- Quantificar os níveis de RNAs mensageiros para SOD, CAT, e GPX1 em tecido ovariano bovino após 6 dias de CIV na presença de diferentes concentrações OEKG e do anetol (1µg/ ml, 10µg/ ml, 100µg/ ml e 1000µg/ ml);
- Analisar a expressão de enzimas SOD, CAT, e GPX1 em tecido ovariano bovino após 6 dias de CIV na presença de diferentes concentrações OEKG e do anetol (1µg/ ml, 10µg/ ml, 100µg/ ml e 1000µg/ ml).

6 CAPÍTULO 1

***Croton grewoides* essential oil and its main active compound (anethol) reduce oxidative stress and improve growth of bovine preantral follicles during *in vitro* culture of ovarian tissue.**

(artigo submetido para o periódico Journal of Biotechnology)

***Croton grewoides* essential oil and its main active compound (anethol) reduce oxidative stress and improve growth of bovine preantral follicles during *in vitro* culture of ovarian tissue**

Felipe Ferreira da Silva¹, Francisco das Chagas Costa¹, Venância A. N. Azevedo¹, Ernando I. T. de Assis¹, Solano Dantas Martins³, Geovany Amorin Gomes², Valdevane R. Araújo³, José Roberto Viana Silva^{1*}

¹ Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction, Federal University of Ceara, Sobral, State of Ceará, Brazil, ² Laboratory of Phytochemical and Bioactive Products, State University Vale do Acaraú, Sobral, Ceara, Brazil, ³ Laboratory of Physiology Reproduction, State University of Ceara, Fortaleza, Ceará, Brazil.

* Corresponding author: jrvsilva@ufc.br

Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction, Federal University of Ceara, Av. Mauricélio Rocha Ponte 100, Sobral - CE - Brasil. CEP 62041-040, Telefone/ Fax: +55 8836118000

Abstract

This study aims to evaluate the effects of different concentrations (1, 10, 100 or 1000 µg.mL⁻¹) of anethole or *Croton grewoides* essential oil (CGEO) on primordial follicle activation and growth, follicular survival, extracellular matrix (ECM) and stromal cell density in bovine ovarian tissues cultured *in vitro* for six days. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), concentrations of thiol, as well as the levels of mRNA *SOD*, *CAT* and *GPx1*, *PRDX6* and *NRF2* were evaluated in tissues cultured in control

medium alone or supplemented with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO. The results show that tissues cultured with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO had significantly higher percentages of morphologically healthy follicles than those cultured in control medium ($P < 0.05$). In addition, tissues cultured with $\mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO had higher number of stromal cells per area, and increased collagen content in ECM when compared to uncultured tissues. Ovarian tissues culture with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO showed significantly higher thiol levels than those cultured with control medium alone or supplemented with anethole. The SOD activity was reduced in tissues cultured in control medium alone or supplemented with anethole or CGEO. On the other hand, anethole increased CAT activity, while CGEO increased GPx1 activity when compared with control group. The presence of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole in culture medium reduced the levels of mRNA for *CAT*, *PRDX6* and *NRF2* when compared to tissues cultured with control medium alone or with CGEO ($P < 0.05$). In addition, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO reduced mRNA for *CAT*, *PRDX*, *GPx1* and *NFR2* when compared to cultured control ($P < 0.05$). In conclusion, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or CGEO promotes follicle survival and regulates oxidative stress, the expression of mRNA and activity of antioxidant enzymes.

Keywords: ovarian follicles, reactive oxygen species, oxidative stress, anethole, essential oil, antioxidant.

1. Introduction

The culture of primordial follicles enclosed in ovarian tissues has been used to promote follicular activation *in vitro* and consequently has contributed to understand the factors that control early follicular development (Telfer and Andersen, 2021). By maintaining follicle-stromal cell communication, this culture system allows the exchange of substances between the different cell types (Aguiar, et al., 2017; Atrabi et al., 2021; Arrivabene et al., 2020; COSTA, 2021; SIMON et al., 2020). To date, complete *in vitro* follicular development

with subsequent ovulation, embryo development, and birth has only been achieved in mice, but not in large mammals (Eppig and O'Brien, 1996). In bovine species, longer culture periods associated with high production reactive oxygen species (ROS) reduces follicular survival *in vitro* (SHI et al., 2016). Thus, there is need to control the oxidative stress *in vitro* to improve follicular growth (BARROSO et al., 2020). In this regard, natural products such as essential oils and phytochemical molecules have been increasingly studied as potential alternatives to regulate ROS levels and to reduce follicular atresia *in vitro* (Mbemba et al., 2017).

Essential oils come from the secondary metabolism of plants and their biological properties are directly related to their chemical composition (Butnario and Sarac, 2018). *Croton grewioides* (Euphorbiaceae) is found in the Brazilian Caatinga and Cerrado regions and is popularly known as 'canelinha' and 'canela-de-cunhã' (Oliveira et al., 2020). Oliveira et al. (2020) previously reported the antioxidant potential of CGEO, while anethole (phenylpropanoid) is the main molecule present in *Croton grewioides* essential oils (CGEO) (Sousa et al., 2022). *In vitro* investigations have shown that anethole reduces the negative effects of ROS in goat ovarian follicles cultured *in vitro* (Sá et al., 2017, 2018) and also inhibits TNF-mediated inflammatory effects (Chainy et al., 2000). Cellular antioxidant defense system involves transcription factors such as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) that acts to regulate the expression of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and peroxiredoxin (PRDX). These enzymes are able to regulate ROS levels and to maintain redox homeostasis (Liu et al., 2022). The SOD transforms two superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) into oxygen and hydrogen peroxide (H_2O_2), while CAT and GPx, linked to glutathione (GSH) activity and metabolize hydrogen peroxide into water (Young and Woodside, 2001). In turn, PRDX acts by reducing hydroperoxides from phospholipids (Fisher, 2021). Dongare et al. (2012), reported that

anethole restores GSH levels and increases activities of antioxidant enzymes such as SOD and CAT in mice. Recently, YU et al. (2022), showed that anethole increases expression of *NRF2* and *GSH-PX* (GPx) mRNA levels. Besides anethole, estragole is another substance with antioxidant activity found CGEO (Silva-Alves et al., 2021; Lima et al., 2020; Serra et al., 2019; Coêlho et al., 2022; Alves Júnior et al., 2020). The synergism of molecules present in CGEO may play a key role in the control of oxidative stress. However, the effects of anethole and CGEO on bovine follicles enclosed in ovarian tissues cultured *in vitro* were not reported yet.

This study aims to evaluate the effects of different concentrations (1, 10, 100 or 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of anethole or CGEO on primordial follicle activation, development and survival. In addition, their effects on stromal cell density, collagen fibers in extracellular matrix, levels of thiol, activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx1) and on the levels of mRNA for *NFR2*, *PRDX1*, *SOD*, *CAT* and *GPx1* in cultured bovine ovarian tissues were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and media

Unless otherwise cited, the chemicals and media used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (USA).

2.2. Experiment 1: extraction and analysis of essential oils

2.2.1. Plant material

The plant material was collected in March 2021 in Viçosa do Ceará, state of Ceará (03°37'15.34" S and 40°80'41.36" W), Brazil. An exsiccate of the plant was deposited in the herbarium Professor José de Abreu Matos at the Universidade Estadual Vale do Acaraú (HUVA) with the accession number 24992. The CGEO was obtained by steam

hydrodistillation of the leaves in a Clevenger apparatus. After 2 h of steam hydrodistillation, 16.152 g of essential oil were obtained from 540 g of leaves (yield +/- 2.99%). Essential oil content was determined on a volume to dry weight basis. The essential oil samples were stored in dark glass container and kept in the absence of light.

2.2.2. Gas chromatography / mass spectrometry analysis

The chemical composition of the CGEO was analyzed by gas chromatograph coupled mass spectrometer (GC-MS) in a Shimadzu QP-2010 Plus, quadruple, with electron impact at 70 eV, HP-5MS methylpolysiloxamide column (30 mm x 0.25 mm x 0.25 μm) helium gas carrier with a flow rate of 1.00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, injector temperature at 250 $^{\circ}\text{C}$, detector at 150 $^{\circ}\text{C}$ and transfer line at 200 $^{\circ}\text{C}$. The chromatographic oven was programmed at a temperature of 70 $^{\circ}\text{C}$ and heating ramp of 4 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to 180 $^{\circ}\text{C}$ and an increase of 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$ at the end of the run (34.5 min). The percentage of the constituents will be calculated through the integral area of their respective peaks, related to the total area of all the constituents of the sample. The various chemical constituents of the essential oil will be identified by visual comparison of their mass specters with those in the literature and specters provided by the database (NIST08) of the equipment and also by comparison of retention indices with those in the literature (ADAMS, 2009).

2.2.3. Antioxidant activity evaluation

The antioxidant activity of CGEO was estimated by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) bleaching assays.

For DPPH analysis, 20 μl of CGEO were mixed with 180 μl methanolic solution of DPPH (Sigma-Aldrich) and diluted ten times until the final concentration of 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The CGEO and positive control dilutions were 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1.56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and 0.78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, from

the stock solution. Quercetin was used as a positive control (Sigma-Aldrich). After incubation for 60 minutes at room temperature (approximately 25°C) in the dark, the absorbance was measured at 490 nm using a spectrophotometer (Helios-Omega; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The radical scavenging activity was calculated using the following equation:

$$PI\% = \frac{AC-AS}{AC} \times 100$$

where A_{control} is the absorbance of the negative control and A_{sample} is the absorbance in the presence of the EO. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was determined using a calibration curve by plotting the EO concentration versus the corresponding % inhibition. The antioxidant activity was expressed as the antioxidant activity index (AAI), calculated as follows:

$$AAI = \frac{\text{final concentration of DPPH in the negative control}}{IC_{50}} \times 100$$

The AAI allowed the classification of the antioxidant activity of CGEO as poor ($AAI \leq 0.5$); moderate ($0.5 < AAI \leq 1.0$); strong ($1.0 < AAI < 2.0$), or very strong ($AAI \geq 2.0$) (Luís et al., 2017). The assays were carried out in triplicate and the DPPH solutions were prepared daily.

The ABTS decolourisation assay involves the generation of the $ABTS+\bullet$ chromophore by the oxidation of ABTS with potassium persulphate (Re et al., 1999). It is applicable for both hydrophilic and lipophilic compounds. The ABTS radical cation ($ABTS+\bullet$) was produced by reacting 5 μl stock solution of ABTS with 88 μl (140 mM) potassium persulphate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark for 16 h at room temperature before use. Then, 1 mL of this solution was mixed with 99 mL of ethanolic solution. The dilutions of the samples and positive standards used were the same as in the DPPH experiment. Absorbance was measured at 630 nm for a total of 10 minutes of

incubation. Quercetin was used as standard. Experiments were carried out in triplicate and mean values were taken.

2.3. Experiment 2: effects of anethole and CGEO on ovarian tissues cultured *in vitro*

2.3.1. Source of ovaries

Bovine ovaries (n = 32) from adult cows were obtained from a local slaughterhouse. Immediately after slaughter, each pair of ovaries was washed in ethanol (70%) for about 10 s, followed by two rinses in 0.9% saline solution at 4 °C supplemented with penicillin (100 µg.mL⁻¹) and streptomycin (100 µg/ml). After washing, each pair of ovaries was transported individually to the laboratory within 1 hour in α-MEM supplemented with penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (100 µg/ml). This study was approved (Nº 04/2019) and conducted according to the rules and guidelines of the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Ceará.

2.3.2. Ovarian tissue preparation

In the laboratory, ovarian cortical tissue from each pair (n = 16 pairs) was sectioned (3 mm × 3 mm × 1 mm) in α-MEM supplemented with penicillin (100 µg.mL⁻¹) and streptomycin (100 µg.mL⁻¹). For the uncultured control, 4 fragments were randomly removed from each pair of ovaries and immediately fixed in paraformaldehyde (4%) for 12 h at 4°C for histological analysis, in which follicular morphology and growth were assessed.

2.3.3. Experimental Design

The cortex of each ovarian pair was cut into 58 fragments (approximately 3 x 3 x 1 mm). Four fragments were randomly removed, immediately fixed for histological analysis, and identified as the uncultured control. The α-MEM⁺ medium consisted of MEM supplemented with BSA (1.25 mg.mL⁻¹), glutamine (2 mM), penicillin/streptomycin (100 µg.mL⁻¹), hypoxanthine 10 µg.mL⁻¹, insulin (10 µg.mL⁻¹), transferrin (5.5 µg.mL⁻¹), and

selenium ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The fragments were cultured *in vitro* in $500 \mu\text{L}$ α -MEM+ alone or supplemented with 1, 10, 100 or $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ anethole or with 1, 10, 100 or $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CGEO for 6 days at 38.5°C in 5% CO_2 in air. Every other day, 50% of the culture medium was replaced. After the 6 days of culture, fragments were immediately fixed in paraformaldehyde (4%) for histological analysis or stored in the freezer at -80°C for RT-PCR and biochemical analysis. Based on the histological analysis, the best treatments (higher percentage of morphological normal follicles) were selected.

2.2.4. Morphological analysis and evaluation of follicular growth *in vitro*

Before (non-cultured control) and after 6 days of culture, ovarian fragments were fixed in 4% PBS buffered paraformaldehyde for 12 hours, followed by dehydration in graduated concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Synth, São Paulo, Brazil), the ovarian fragments were cut into $7 \mu\text{m}$ sections and mounted on glass slides followed by hematoxylin-eosin staining. Follicular stages and survival were evaluated microscopically using a microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan). According to criteria described by Costa et al. (2021), the follicles were classified as morphologically normal or degenerated. The follicles were also classified as primordial, primary or secondary, according to their stage of development (COSTA et al., 2021).

2.2.5. Analysis of ovarian stromal cell density

Ovarian stromal cell density was assessed by calculating the number stromal cells in an area of $100 \mu\text{m}^2$. For each treatment, ten fields per slide were evaluated and the average number of stromal cells per field was calculated. A single operator performed all evaluations and measurements.

2.2.6. Analysis of extracellular matrix (ECM)

To evaluate the collagen fibers distribution in ECM, ovarian cortical tissues were stained with Picrosirius Red (Abcam Kit), according to the methodology described by Rittié

(2017), with modifications. Briefly, 7.0 µm ovarian sections were dewaxed in xylene and incubated in Sirius Red solution (0.1%) for 1 h at room temperature. After removal of excess dye with acetic acid solution (0.5%), the sections were dehydrated and evaluated under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) at 400x magnification. For each treatment, the percentage of area with collagen fibers in ten different fields was measured by a DS Cooled Camera Head DS-Ri1 coupled to a microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) and the images were analyzed by Image J Software (Version 1.51p, 2017). After staining, the collagen fibers were marked in red by Picrosirius red, while the follicles remained uncolored.

2.2.7. Expression of mRNA for *NRF-2*, *SOD*, *CAT*, *PRDX6* and *GPx1*

For analysis of gene expression, ovarian tissues were stored at -80°C until the extraction of total RNA for further analysis of mRNAs expression of *SOD*, *CAT*, *PRDX6*, *GPx1* and *NRF2*. For this, the tissues were macerated under sterile conditions and then subjected to extraction of total RNA that was performed using a Trizol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 µL cDNA as a template in 7.5 µL of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 µL of ultra-pure water, and 0.5 µM of each primer. The primers were designed to perform amplification of *SOD*, *CAT*, *PRDX6*, *GPx1*, *NRF2* and *GAPDH* (Table 1). The specificity of each primer pairs was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 15 at 95°C , 30 at 58°C , and 30 at 72°C . The final extension was for 10 min at 72°C . All reactions were performed in a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to transform the C_t values into normalized relative expression levels.

Table 1. Primer pairs used for real-time PCR.

Target gene	Primers sequence (5' 3')	Sense (S), anti-sense (As)	Genbank accession number
<i>GAPDH</i>	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATAA	S AS	GI: 402744670
<i>GPXI</i>	AACGTAGCATCGCTCTGAGG GATGCCCAAACCTGGTTGCAG	S As	GI:156602645
<i>SOD</i>	GTGAACAACCTCAACGTCGC GGTTCTCCACCACCGTTAG	S As	GI: 31341527
<i>CAT</i>	AAGTTCTGCATCGCCACTCA GGGGCCCTACTGTCAGACTA	S As	GI:402693375
<i>PRDX6</i>	GCACCTCCTCTTACTTCCCG GATGCGGCCGATGGTAGTAT	S AS	GI: 59858298
<i>NRF2</i>	GACCCAGTCCAACCTTTGTC GACCCGGACTTACAGGTACT	S AS	GI: 030494.1

2.2.8. Determination of antioxidant status and enzymatic activity

Ovarian tissues (100 mg.mL⁻¹) were macerated using potassium phosphate buffer (KH₂PO₄ and K₂HPO₄; P9791 and P3786; Sigma-Aldrich; 1:9), pH 7.5. The ovary homogenates were centrifuged at 1500G for 10 min at 48 °C and the supernatant collected for use in the spectrophotometric assays described below, using quartz cuvettes (Genesis 10s UV-vis; Thermo Scientific), as described previously (Ellman, 1959). Data are expressed as the mean \pm s.e.m. enzyme unit per milligram of protein (U.mg protein⁻¹).

The protein concentration was determined using the Bradford method (Bradford, 1976). This method uses Coomassie blue (Quick start/Bradford; Catalogue No. 500–0205; Bio-Rad) to determine the total concentration of proteins in each extract sample. When it comes in contact with proteins, the Coomassie blue stain forms a complex and emits a blue luminescence. The absorbance is directly related to the protein concentration of the sample

and was evaluated spectrophotometrically at a wavelength of 595 nm. The total protein concentration in samples was determined using a standard curve constructed using bovine albumin as a standard (0, 2.5, 5, 10, 15, 25, 35 and 50 mg.mL⁻¹), and was used to standardize the levels of pro-oxidants (thiol) and antioxidants (SOD, CAT and GPx), as described below.

Total thiol content was determined using 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB; D8130; Sigma-Aldrich) as an index of reduced thiol. Thiol residues react with DTNB (10 mM), cleaving the disulfide bond to form 2-nitro-5-thiobenzoate anion (NTB2⁻) at a neutral pH. NTB2⁻ is quantified in a spectrophotometer by measuring absorbance at 412 nm, with results expressed as nMol of reduced DTNB per milligram of protein (Furtado et al., 2021).

The SOD activity was measured as the inhibition of adrenaline auto-oxidation (Bannister and Calabrese, 1987) Adrenaline oxidation, in the presence of CAT in basic medium, leads to the formation of the O₂⁻ radical, which SOD reacts with, thus slowing ('inhibiting') the oxidation of adrenaline. The CAT solution (0.048 mg.mL⁻¹; c9322; Sigma-Aldrich) was performed adding (7:3) to glycine buffer, pH 10.2. Three different volumes (10, 20 or 40 mL) of ovary homogenate were then added to the solution and then adrenaline (0.218 mg.mL⁻¹; E4260; Sigma-Aldrich®) was added to start oxidation. Oxidation was measured at 480 nm every 10 s for 180 s.

The CAT activity was measured as the consumption of H₂O₂ as a substrate at 240 nm (Aebi 1984). A solution of H₂O₂ (152 mg.mL⁻¹; PH09717RA; Êxodo científica, São Paulo, Brazil) and phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) was mixed in a quartz cuvette at room temperature, and then 50 µL of the ovary homogenate were added. Every 30 s, the consumption of H₂O₂ was measured twice.

The GPx activity was measured by oxidation of NADPH. NADPH is consumed by glutathione reductase (GR; G3664; Sigma-Aldrich) to convert GSSG to GSH. In the presence of H₂O₂, GPx oxidizes GSH to GSSG and reduces peroxides to alcohols and water. NADPH

consumption is directly proportional to H_2O_2 consumption and therefore to GPx activity (Flohé and Günzler, 1984). The reaction was prepared by mixing 500 mL of potassium phosphate buffer (100 mM) consisting of 13.6 g L⁻¹ monobasic potassium phosphate (P0662; Sigma-Aldrich) plus 1.86 g L⁻¹ EDTA (5 mM; E4884; Sigma-Aldrich; pH 7.4) with 38 mg.mL⁻¹ GR, 3 mg.mL⁻¹ GSH and 100 mL of ovarian tissue homogenate for 10 min at room temperature to allow GPx cysteine to contact GR and GSH. Then 100 mL of NADPH was added and after 120 s was added 100 mL of H_2O_2 . NADPH oxidation was measured as the decrease in NADPH absorbance at 340 nm every 10 s for 300 s.

2.2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (9.0). Data from morphologically normal follicles, activation, and follicular development were compared using the chi-squared test, and results were expressed as percentages. Data of collagen fiber distribution, stromal cell density and mRNA expression were assessed for normality of distribution (Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests) and then analyzed individually by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. The correlation between the number of stromal cells and the percentage of normal follicles was analyzed by Spearman and linear regression analysis. Data were presented as mean (\pm S.E.M). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Experiment 1: Chemical composition and antioxidant activity of CGEO

Table 2 shows the composition of CGEO. The GC-MS analysis of CGEO revealed the presence of phenylpropanoids (98.91%) and a low content of sesquiterpene hydrocarbons (1.09%). The most abundant molecules were (*E*)-anethole (96.67%), estragole (2.24%) and γ -elemene (1,09%).

Table 2. Essential oil composition of *Croton grewoides* leaves.

Compound	KI*	KI**	Composition (%)
Phenylpropanoids			98.91
Estragole	1196	1189	2.24
(E)-Anethole	1252	1260	96.67
Sesquiterpene hydrocarbons			1.09
γ -elemene	1436	1434	1.09
TOTAL			100

R-square = 0.9964

*Literature retention rate

**Calculated retention rate

The antioxidant activity of CGEO and anethole in DPPH and ABTS assays had similar IC₅₀ (16.38 and 14.88 respectively (Table 3)).

Table 3. Antioxidant assays of CGEO

Method	Parameters	CGEO	Std. Error	R square
DPPH scavenging assay	IC ₅₀ (%)	16.37	0.029	0.997
ABTS scavenging assay	IC ₅₀ (%)	14.88	0.024	0.992

The inhibition rate of CGEO against DPPH radicals increased according to the increase of CGEO concentration, reaching 76.26% at the concentration of 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and

100% inhibition when the CGEO concentrations were equal or higher than 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Table 4).

Table 4. DPPH radical scavenging rate by CGEO

CGEO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Inhibition (%)
200.00	100.00
100.00	100.00
50.00	100.00
25.00	76.26
12.50	38.08
6.25	18.99
3.12	9.43
1.56	4.67
0.78	2.29

Similarly, CGEO at a concentration of 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ had 83.99% inhibition and 100% when concentrations were equal or higher than 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in ABTS test (Table 5).

Table 5. ABTS radical inhibition rate by CGEO

CGEO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Inhibition (%)
200.00	100.00
100.00	100.00
50.00	100.00
25.00	83.89
12.50	41.90

6.25	20.90
3.12	10.39
1.56	5.14
0.78	2.52

3.2. Experiment 2: Effects of anethole or CGEO on ovarian tissues cultured *in vitro*

3.2.1. Follicular morphology and development

A total of 1,866 follicles were analyzed. Morphologically normal follicles exhibited oocyte with central nucleus and intact and well organized granulosa cells, while degenerated follicles showed nuclear pyknosis, cytoplasmic retraction or disorganization of granulosa cells (Figure 1).

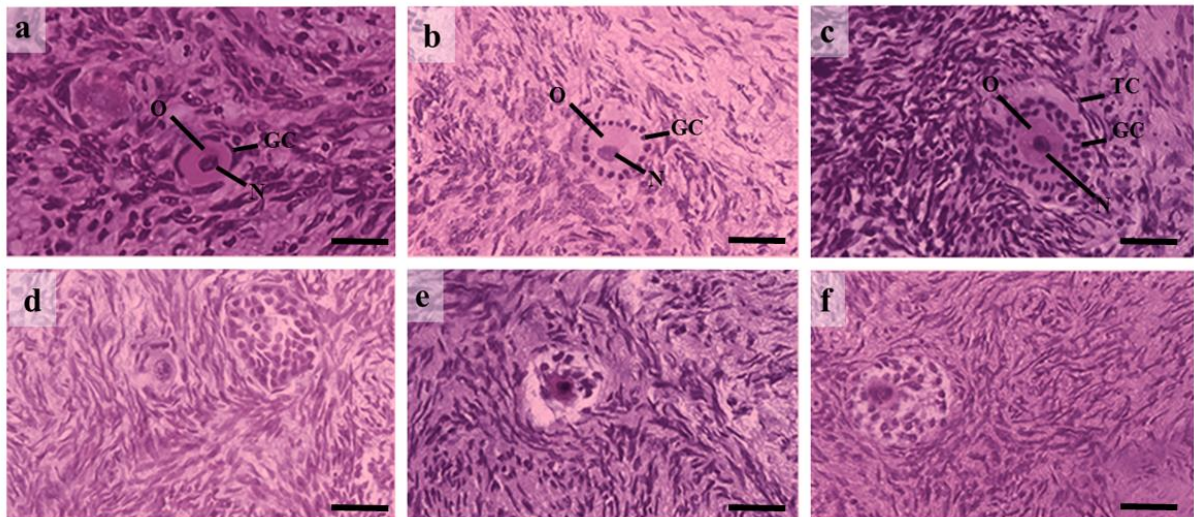


Figure 1. Sections of bovine ovarian tissue showing morphologically normal (a-c) and degenerated (d-f) follicles. GC, granulosa cells; N, oocyte nucleus; TC, thecal cells; O, oocyte. Bars = 100 μ m.

The percentages of morphologically normal follicles are shown in Fig 2. At the end of the culture period, a decrease in the number of normal follicles was observed in all treatments, compared to uncultured control ($P < 0.05$).

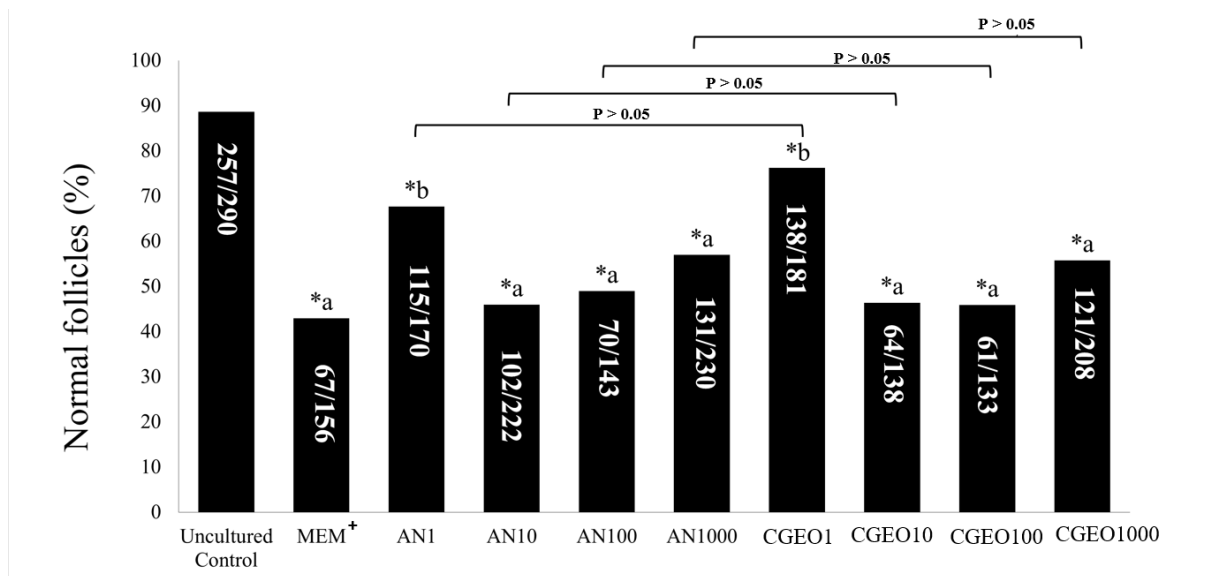


Figure 2. Percentage of morphologically normal follicles uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations CGEO or anethole. *indicates significant difference compared to uncultured control ($P < 0.05$). Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between treatments ($P < 0.05$).

However, tissues cultured in the presence of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ CGEO had significantly higher levels of morphologically healthy follicles than those cultured in control medium (Figure 2, $P < 0.05$).

No differences were seen in the percentages of normal follicles in tissues cultured with the same concentration of anethole or CGEO. When the rates of primordial and growing follicles (Figure 3) were assessed, a significant reduction in the percentages of primordial follicles, as well as an increase in developing follicles were observed in all treatments, when compared to uncultured control ($P < 0.05$). However, the presence of anethole ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) or CGEO ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) increased follicular growth when compared to tissues cultured in control medium ($P < 0.05$).

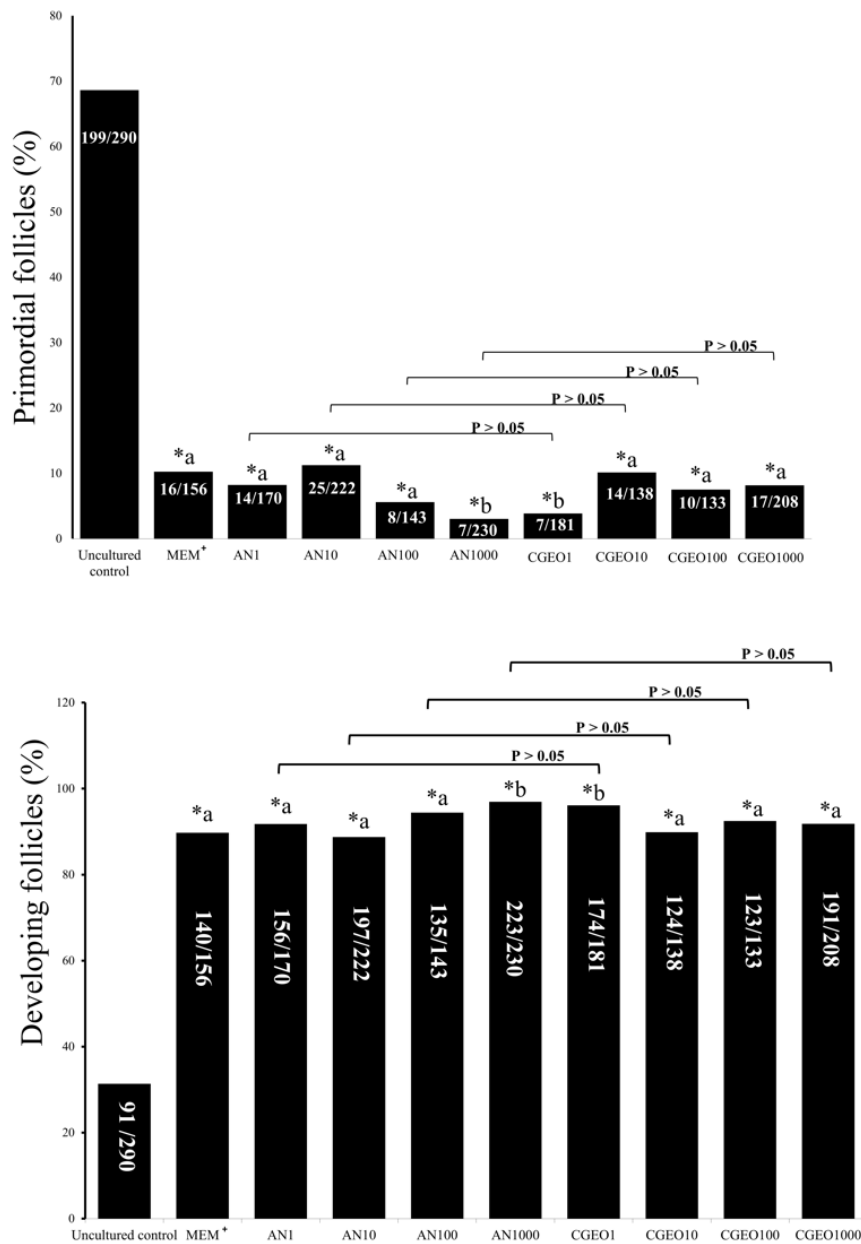


Figure 3. Percentage of morphologically healthy primordial (A) and developing (B) follicles in uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations CGEO or anethole. *indicates significant difference compared to uncultured control. Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between MEM⁺ and other treatments.

3.2.2. Effects of CGEO or anethole on ECM organization and stromal cell density

A significant increase in collagen fibers was seen in ovarian tissues cultured in the presence of 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO or 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole when compared to tissues cultured in control medium ($P < 0.0001$).

Tissues cultured with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO had higher number of stromal cells per area, when compared to uncultured control.

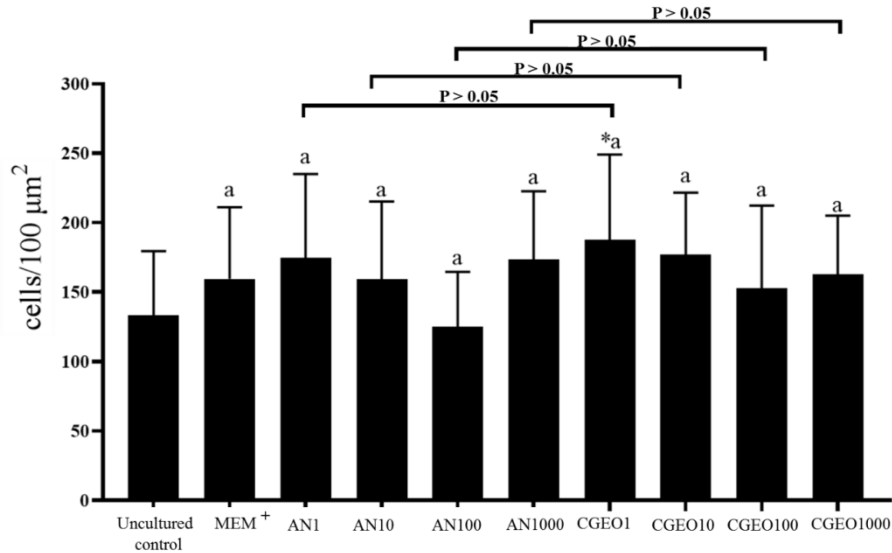


Figure 4. Stromal cell density in uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations of anethole or CGEO for 6 days (mean \pm SEM). *indicates significant difference compared to uncultured control. Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between MEM⁺ and other treatments. AN: anethole.

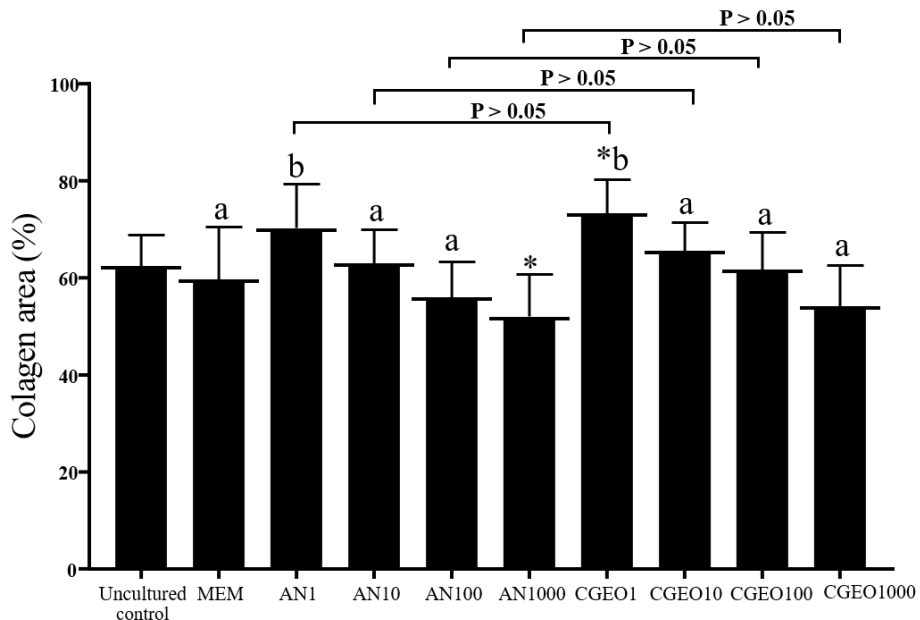


Figure 5. Area of collagen fibers in uncultured tissues and in tissues cultured with different concentrations of anethole or CGEO for 6 days (mean \pm SEM). *indicates significant difference compared to uncultured control. Distinct lower case letters (a,b) indicate difference between MEM⁺ and other treatments. AN: anethole.

No differences were seen in the number of cells in tissues cultured with the same concentration of anethole or CGEO (Figure 4).

Tissues cultured with CGEO had significantly increased the collagen content when compared to the uncultured tissues ($P < 0.01$) (Figure 5). The correlation between the rates of

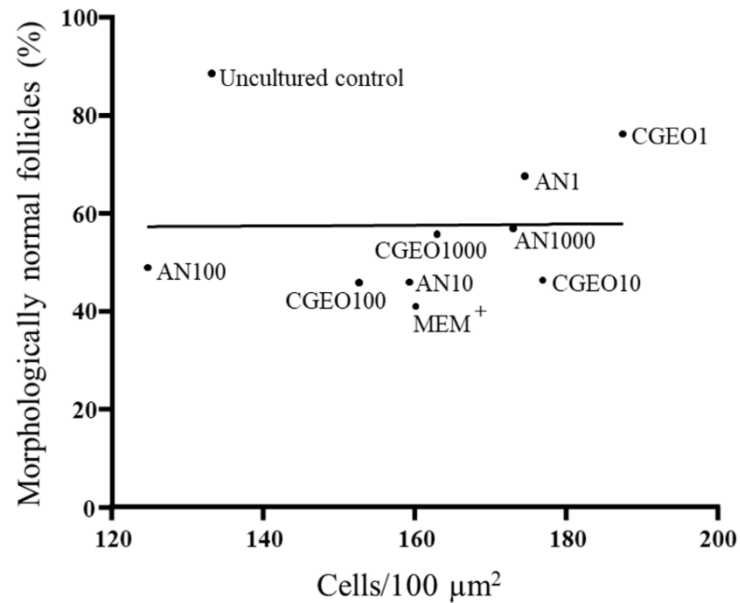


Figure 6. Correlation between stromal cell density and percentage of normal follicles in ovarian tissues. The association between variables (black line) was analyzed by linear regression [Normal follicles = $56.09 + (0.0090 \times \text{stromal cell density})$; $r = 0.011$; $R^2 = 0.0001$; $P > 0.05$]. Each point on the chart represents one treatment evaluated.

morphologically normal follicles and collagen content in bovine ovarian tissue cultured with different concentrations of anethole or CGEO is shown in figure 6. Higher collagen staining was identified in ovarian tissues that had higher rates of morphologically normal follicles. In addition, the tissues that had higher percentages of normal follicles had higher number of stromal cells (Figure 7).

The relationship between the collagen content and the cells in bovine ovarian stroma is shown in figure 8. The tissues that showed higher rates of cells in the ovarian stroma also had higher levels of collagen fibers.

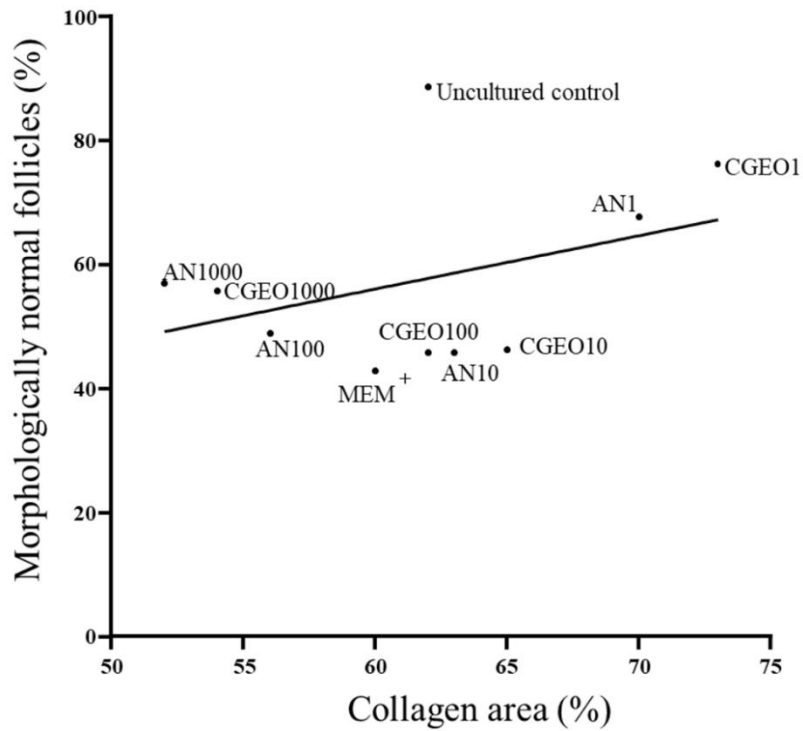


Figure 7. Correlation between collagen area with percentage of normal follicles. The association between variables (black line) was analyzed by linear regression [Normal follicles = $78.40 + (1.329 \times \text{stromal cell density})$]; $r = 0.3738$; $R^2 = 0.2040$; $P > 0.05$]. Each point on the chart represents one treatment evaluated.

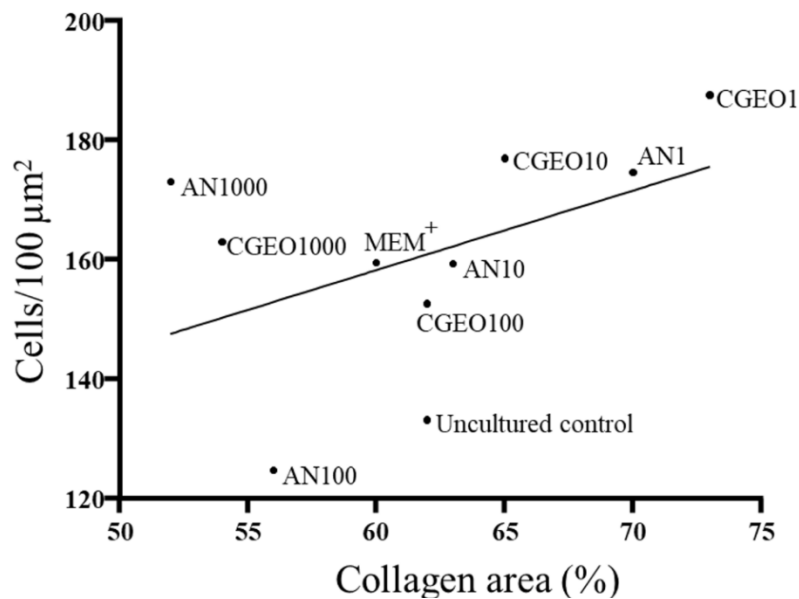


Figure 8. Correlation between collagen area with stromal cell density. The association between variables (black line) was analyzed by linear regression [Collagen area = $78.40 + (1.329 \times \text{stromal cell density})$]; $r = 0.4517$; $R^2 = 0.2040$; $P > 0.05$]. Each point on the chart represents one treatment evaluated.

3.2.7. Redox status

Ovarian tissues culture with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO showed significantly higher thiol levels than those cultured with medium supplemented with anethole (Figure 9). The anethole did not influence thiol levels in cultured tissues.

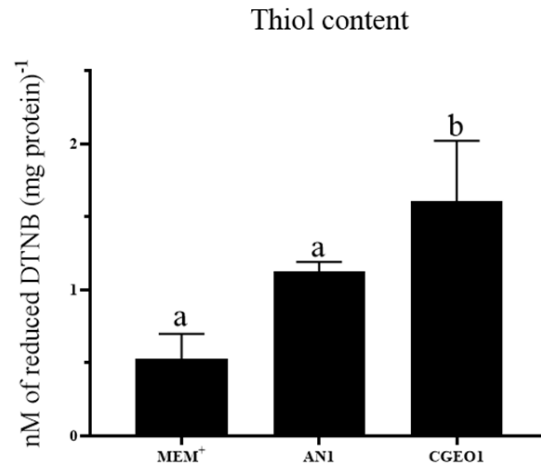


Figure 9. Thiol concentrations in bovine ovarian tissues cultured in control medium alone or with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO or anethole. Values are expressed as mean S.E.M. Distinct lower case letters (a,b) indicates significant difference between groups with anethole (AN1) and CGEO (OE1) ($P < 0,05$).

Figure 10 shows the activity of the enzymes SOD, CAT and GPx in ovarian tissues cultured in control medium alone or supplemented with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or CGEO for 6 days. The SOD activity was reduced in tissues cultured in control medium alone or supplemented with anethole or CGEO. On the other hand, anethole increased CAT activity, while CGEO increased GPx activity when compared with control group.

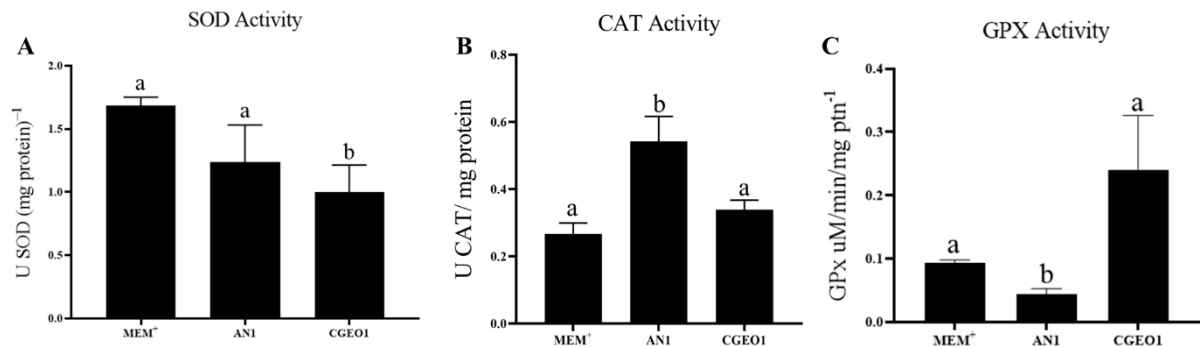


Figure 10. SOD (A), CAT (B), and GPx (C) activity in bovine ovarian tissues cultured in control medium alone or with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or CGEO. Values are expressed as mean S.E.M. a,b: indicates significant differences between tissues cultured in control or supplemented with anethole (AN) or CGEO. ($P < 0.05$).

3.2.8. Expression of mRNA of antioxidants enzymes and Nrf2 on the *in vitro* cultured tissues.

Figure 11 shows the mRNA expression for *SOD*, *CAT*, *GPx1*, and *PRDX6* in tissues cultured for six days in the presence of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO. The presence of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole reduced the levels of mRNA for *NRF2*, *CAT* and *PRDX6* when compared to tissues cultured in control medium (MEM^+) alone ($P < 0.05$). In addition, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO reduced mRNA for *CAT* *SOD* and *PRDX6* ($P < 0.05$).

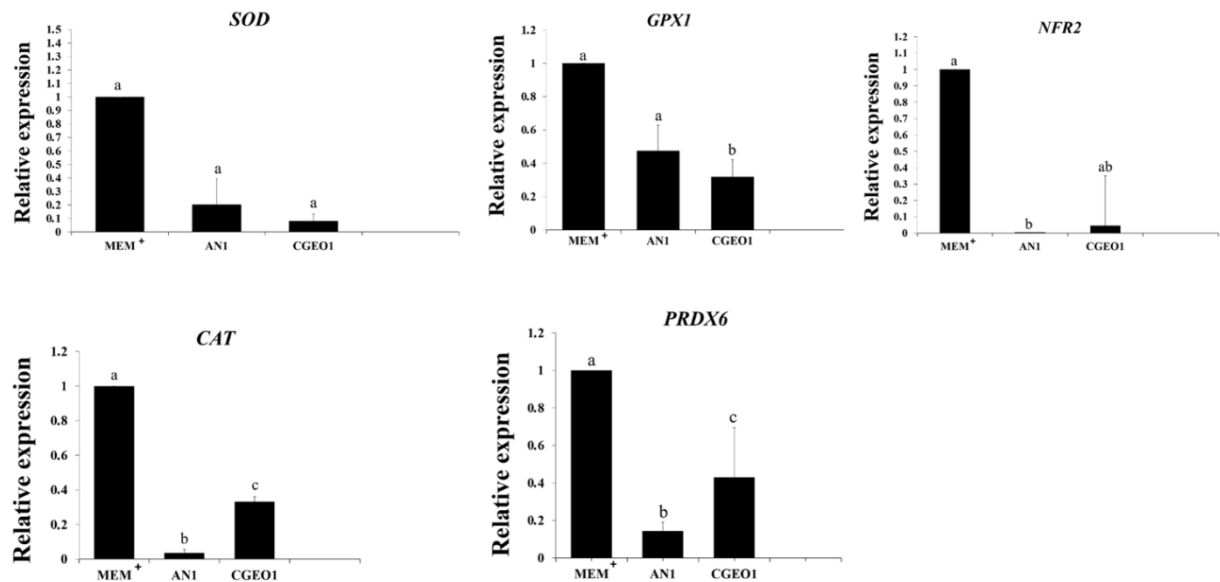


Figure 11. Levels of mRNA expression for *SOD* (A), *CAT* (B), *GPx1* (C), *PRDX6* (D) and *NRF-2* (E) in bovine ovarian tissues cultured in control medium alone or with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or CGEO. a,b: indicates significant differences among treatments ($P < 0,05$).

4. Discussion

This study shows that the potential of CGEO to reduce DPPH and ABTS radicals increases in a concentration-dependent manner. According to Morais et al. (2006), the antioxidant activity of CGEO is due to the large amount of anethole in its composition. The

synergism between anethole and estragole molecules was demonstrated previously and action contributed to increase the antioxidant activity of CGEO (Donati et al., 2015).

Supplementation of culture medium with $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole or CGEO increased the percentages of morphologically normal follicles after 6 days. Oxidative stress is a condition in which there is an imbalance between the production of ROS and the ability of cellular antioxidant machinery to neutralize them (Torres-Osorio et al., 2019). The ROS can cause damage to cellular components such as lipids, proteins and DNA. Our results are in agreement with Sá et al. (2017), who showed that lower concentrations of anethole increased follicular survival *in vitro*. Phenolic antioxidants, such as anethole and estragole, act by inhibiting ROS production, interfering with the spread of the radical chain, and preventing oxidative damage in cells (Donati et al., 2015).

In the present study, anethole ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) or CGEO ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) increased follicular growth during *in vitro* culture. Sá et al. (2017), showed that $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anethole increased follicular development and intercellular adhesion molecule⁻¹ (ICAM1) mRNA expression. The higher expression of ICAM1 has been previously related to follicular development in rats (Bonello et al., 2004). The CGEO, in addition to anethole, has 2.24% estragole in its composition. Tissues cultured with CGEO ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) had greater follicular development than those cultured in control medium. This may be due to the synergistic effect of anethole and estragole. There is strong evidence that anethole and estragole have synergistic effects when used together which potentiates their antioxidant effects, helping to protect cells from oxidative damage (Donati, et al., 2015).

In our findings, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO increased stromal cell density and collagen fibers in cultured ovarian tissues and maintained the highest rate of morphologically normal follicles. Galicka et al. (2014), reported that anethole ($0.5 \mu\text{M}$) was able to prevent H₂O₂-induced apoptosis in human skin fibroblasts (CRL1474) due to its antioxidant activity. The ovarian

follicles are surrounded by a dense and varied network of cells, including fibroblast-like cells (Kinnear et al., 2020). Stromal cells are very important to maintain tissue metabolism during follicles development. Fibroblast-like cells are responsible for collagen production in the ovarian ECM (Amargant et al., 2020). Then, we evaluated the density of stromal cells in bovine ovarian tissue fragments and correlated it with the rates of morphologically normal follicles. Andruliewicz-Botulińska et al. (2019), reported that anethole (1 μM) inhibited the action of ROS and promoted an increase in the rate of collagen produced by fibroblast cells. Collagen is the main protein of the ECM, acting to stabilize the physical structure of tissues, besides playing an important role in cell growth, differentiation migration, and interactions between the various cell types (Andruliewicz-Botulińska et al., 2019).

The presence of 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ CGEO in culture medium increased the thiol content in cultured tissues. The thiol content is inversely proportional to the amount of H_2O_2 present in a sample. Proteins with thiol (-SH) groups, such as GSH, require H_2O_2 to support disulfide bridge formation (Foyer et al., 1997). Thus, the thiol group present in GSH can be used as an index of the oxidizing environment, because the oxidation of GSH by GPx only occurs in the presence of H_2O_2 . In this process, two molecules of GSH are oxidized, donating two molecules of -SH, which would react with one molecule of H_2O_2 , producing two molecules of H_2O and one molecule of GSSG. Thus, a low thiol content in a sample indicates a higher rate of GSH oxidation and a higher thiol content represents a lower oxidation rate (Radak et al., 2013). Our results suggest that the presence of CGEO or anethole promoted a favorable environment for the action of the antioxidant enzymes CAT and GPx, thus contributing to the maintenance of redox homeostasis. The CAT, like GPx, is a peroxidase that works to eliminate hydrogen peroxide from the system in the form of water and O_2 . The GPx plays a central role in the detoxification of hydrogen peroxide, using glutathione as an electron donor during its activity (Fujii et al., 2005).

In the present study, we demonstrated that supplementation of the culture medium with 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ anethole did not influence mRNA expression for the transcription factor NRF2. NRF2 acts as a key regulator of antioxidant enzyme signaling pathway (Yu et al., 2022). When cells are under high concentrations of ROS, NRF2 is translocated to the nucleus and interacts with DNA in specific regions called antioxidant response elements (ARE) and activates the transcription of antioxidant enzyme genes, such as SOD, CAT, GPx, and PRDX (Sajadimajd and Khazaei, 2018). The lower expression of NRF2 is related to higher activity of thiol-dependent peroxidase enzymes, such as CAT and GPx1, which showed higher activity in tissues cultured with anethole or CGEO. Thus, our findings suggest that the low expression of NRF2 occurred through the maintenance of redox homeostasis by anethole or CGEO.

In conclusion, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ anethole or CGEO improves follicles survival and development, increases stromal cell density and collagen production in bovine ovarian tissue cultured *in vitro*. The CGEO reduces the pro-oxidant environment by increasing thiol and activating antioxidant enzymes such as CAT and GPx1.

Acknowledgment

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, No. 308737/2018-0), Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and FUNCAP (Cearense Foundation for the Support of Scientific and Technological Development). F.F. da Silva is a CAPES scholarship recipient, Brazil.

Author contributions:

Conceptualization: José Roberto Viana Silva. Investigation: Felipe Ferreira da Silva, Venância A. N. Azevedo, Ernando I. T. de Assis. **Formal analysis:** Francisco das Chagas Costa, Solano Dantas Martins, Geovany Amorin Gomes. **Funding acquisition:** José Roberto Viana Silva. **Methodology:** Geovany Amorin Gomes, Valdevane R. Araújo. **Supervision:** José Roberto Viana Silva. **Writing – original draft:** Felipe Ferreira da Silva. **Writing – review & editing:** José Roberto Viana Silva, Valdevane R. Araújo

References

- Telfer, E.E., Andersen, C.Y., 2021. *In vitro* growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes. *Fertil Steril.* 115 (5), 1116–1125.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.004>
- Aguiar, F.L.N., Gastal, G.D.A., Ishak, G.M., Gastal, M.O., Teixeira, D.I.A., Feugang, J.M., Figueiredo, J.R., Gastal, E.L., 2017. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. *Theriogenology.* 99, 24–133.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.045>
- Atrabi, M.J., Alborzi, P., Akbarinejad, V., Fathi, R., 2021. Supplementation of granulosa cells conditioned medium with pyruvate and testosterone could improve early follicular development in cultured 1-day-old mouse ovaries. *Zygote.* 29 (6), 468–475.
<https://doi.org/10.1017/S0967199421000174>
- Arrivabene Neves, C., Dos Santos Silva, L., de Carvalho, C.E.S., Silva Carvalho, M., Sarmiento, J.L.R., Vasconcelos Cavalcante, T., Arrivabene, M., Arrivabene Neves, T., de Sousa Bezerra, M.É., Júnior, A.L.G., da Silva, C.M.G., de Carvalho, M.A.M.,

2020. Culture of goat preantral follicles *in situ* associated with mesenchymal stem cell from bone marrow. *Zygote*. 28 (1), 65-71. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000686>
- Costa, F.D.C., Vasconcelos, E.M., Nunes Azevedo, V.A., Feitosa Melo Paulino, L.R., Soares, M.D., Viana Silva, J.R., Barbalho Silva, A.W., Paz Souza, A.L., 2021. Aloe vera increases mRNA expression of antioxidant enzymes in cryopreserved bovine ovarian tissue and promotes follicular growth and survival after *in vitro* culture. *Cryobiology*. 102, 104⁻¹13. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.07.005>
- Simon, L.E., Kumar, T.R., Duncan, F.E., 2020. *In vitro* ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables†. *Biol Reprod*. 103 (3), 455-470. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa073>
- Eppig, J.J., O'Brien, M.J., 1996. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*. (1), 197-207. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.197>
- Shi, L., Zhang, J., Lai, Z., Tian, Y., Fang, L., Wu, M., Xiong, J., Qin, X., Luo, A., Wang, S., 2016. Long-term moderate oxidative stress decreased ovarian reproductive function by reducing follicle quality and progesterone production. *PloSone*. 11 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162194>
- Barroso, P.A.A., Paulino, L.R.F.M., Silva, B.R., Vasconcelos, G.L., Gomes, D.S., Lima Neto, M.F., Silva, A.W.B., Souza, A.L.P., Donato, M.A.M., Peixoto, C.A., Silva, J.R.V., 2020. Effects of dexamethasone on growth, viability and ultrastructure of bovine secondary follicles cultured *in vitro*. *Zygote*. 28 (6), 504-510. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000416>
- Mbemya, G.T., Guerreiro, D.D., Donfack, N.J., Silva, L.M., Vieira, L.A., Sousa, G.F., Alves, B.G., Izaguirry, A., Santos, F.W., Telefo, P.B., Pessoa, O.D., Smitz, J.E., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P., 2017. *Justicia insularis* improves the *in vitro* survival and

- development of ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *J Pharm Pharmacol.* 5 (9). <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2017.09.009>
- Butnario, M., Sarac, I., 2018. Essential Oils from Plants. *J. Biotechnol. Biomed. Sci.* 1 (4), 35-43. <https://doi.org/10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489>
- Oliveira, S.D., de Oliveira e Silva, A.M., Blank, A.F., Nogueira, P.C., Nizio, D.A., Almeida-Pereira, C.S., Pereira, R.O., Menezes-Sá, T.S., Santana, M.H., Arrigoni-Blank, M.D., 2020. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewioides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. *J Essent Oil Res.* 33 (1), 94-103. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1779139>
- Sousa, A.P., Oliveira, G., Fonseca, L., Rocha, M.D., Rai, M.R., Santos, F.J., de Lima, S.G., 2022. Antioxidant Properties of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. Essential oil and its inclusion complex with β -cyclodextrin prepared by spray drying. *J. Braz. Chem. Soc.* 33 (10), 1244-1253. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220051>
- Sá, N.A.R., Bruno, J.B., Guerreiro, D.D., Cadenas, J., Alves, B.G., Cibin, F.W.S., Leal-Cardoso, J.H., Gastal, E.L., Figueiredo, J.R., 2018. Anethole reduces oxidative stress and improves *in vitro* survival and activation of primordial follicles. *Braz J Med Biol Res.* 51 (8), e7129. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187129>
- Sá, N.A.R., Araújo, V.R., Correia, H.H.V., Ferreira, A.C.A., Guerreiro, D.D., Sampaio, A.M., Escobar, E., Santos, F.W., Moura, A.A., Lôbo, C.H., Ceccatto, V.M., Campello, C.C., Rodrigues, A.P.R., Leal-Cardoso, J.H., Figueiredo, J.R., 2017. Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology.* 89, 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.014>
- Chainy, G.B., Manna, S.K., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2000. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-

- kappaB, AP¹, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene*. 19 (25), 2943-50.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203614>
- Liu, S., Pi, J., Zhang, Q., 2022. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. *Redox biology*. 54, 102389.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102389>
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 54 (3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
- Fisher, A.B., 2011. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxid Redox Signal*. 15 (3), 831-44.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3412>
- Dongare, V., Kulkarni, C., Kondawar, M., Magdum, C., Haldavnekar, V., Arvindekar, A., 2012. Inhibition of aldose reductase and anti-cataract action of trans-anethole isolated from *Foeniculum vulgare* Mill. fruits. *Food Chem*. 132 (1), 385-90.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.005>
- Yu, C., Tong, Y., Li, Q., Wang, T., Yang, Z., 2022. Trans-anethole Ameliorates Intestinal Injury Through Activation of Nrf2 Signaling Pathway in Subclinical Necrotic Enteritis-Induced Broilers. *Front Vet Sci*. 9, 877066.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.877066>
- Silva-Alves, K.S., Ferreira-da-Silva, F.W., Coelho-de-Souza, A.N., Leal-Cardoso, J.H., 2021. Essential oil of *Croton zehntneri* prevents conduction alterations produced by diabetes mellitus on vagus nerve. *Plants (Basel)*. 10 (5), 893.
<https://doi.org/10.3390/plants10050893>
- Adams, R.P., 2009. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4 ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 804p., 2009.

- Lima, C.C., de Holanda-Angelin-Alves, C.M., Pereira-Gonçalves, Á., Kennedy-Feitosa, E., Evangelista-Costa, E., Bezerra, M.A.C., Coelho-de-Souza, A.N., Leal-Cardoso, J.H., 2020. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton zehnteneri*, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. *Heliyon*. 6 (11), e05445. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05445>
- Serra, D.S., Gomes, M.D.M., Cavalcante, F.S.Á., Leal-Cardoso, J.H., 2019. Essential oil of *Croton Zehntneri* attenuates lung injury in the OVA-induced asthma model. *J Asthma*. 56 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/02770903.2018.1430828>
- Coêlho, M.L., Islam, M.T., Laylson da Silva Oliveira, G., Oliveira Barros de Alencar, M.V., Victor de Oliveira Santos, J., Campinho Dos Reis, A., Oliveira Ferreira da Mata, A. M., Correia Jardim Paz, M. F., Docea, A. O., Calina, D., Sharifi-Rad, J., Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante, A., 2022. Cytotoxic and antioxidant properties of natural bioactive monoterpenes nerol, estragole, and 3,7-dimethyl¹-octanol. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2022, 8002766. <https://doi.org/10.1155/2022/800276>
- Alves Júnior, E.B., de Oliveira Formiga, R., de Lima Serafim, C.A., Cristina Araruna, M.E., de Souza Pessoa, M.L., Vasconcelos, R.C., de Carvalho, T.G., de Jesus, T.G., Araújo, A.A., de Araujo Junior, R.F., Vieira, G.C., Sobral, M.V., Batista, L.M., 2020. Estragole prevents gastric ulcers via cytoprotective, antioxidant and immunoregulatory mechanisms in animal models. *Biomed Pharmacother*. 130, 110578. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110578>
- Luís Â, Duarte AP, Pereira L, Domingues F., 2017. Chemical Profiling and Evaluation of Antioxidant and Anti-Microbial Properties of Selected Commercial Essential Oils: A Comparative Study. *Medicines*. 4(2):36. <https://doi.org/10.3390/medicines4020036>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.

- Free Radic Biol Med. 26(9⁻¹⁰), 1231-7. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Rittié, L., 2017. Method for Picosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol Biol.* 1627, 395-407. https://doi.org/10.1007/978⁻¹-4939-7113-8_26
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82 (1), 70-7. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Furtado, R.L., Martins, J.E.R., Oliveira, M.A.F., Guerreiro, D.D., de Sá, N.A.R., Ferraz, A.S.M., Ceccatto, V.M., Rodrigues, A.P.R., Araújo, V.R., 2021. Acute effect of high-intensity interval training exercise on redox status in the ovaries of rats fed a high-fat diet. *Reprod Fertil Dev.* 33 (12), 713-724. <https://doi.org/10.1071/RD20326>
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 32, 279-312. <https://doi.org/10.1002/9780470110539.ch5>
- Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114-21. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015⁻¹](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015<sup>-1</sup)
- Morais, S.M. de., Catunda Júnior, F.E.A., Silva, A.R.A. da., Martins Neto, J.S., Rondina, D., Cardoso, J.H.L., 2006. Antioxidant activity of essential oils from Croton species of northeastern Brazil. *Quím Nova.* 29 (5), 907–10. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500004>
- Donati, M., Mondin, A., Chen, Z., Miranda, F. M., do Nascimento, B. B., Jr, Schirato, G., Pastore, P., Frolidi, G., 2015. Radical scavenging and antimicrobial activities of Croton zehntneri, Pterodon emarginatus and Schinopsis brasiliensis essential oils and their

- major constituents: estragole, trans-anethole, β -caryophyllene and myrcene. *Nat Prod Res.* 29 (10), 939-46. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.964709>
- Bonello, N., Jasper, M.J., Norman, R.J., 2004. Perioovulatory expression of intercellular adhesion molecule⁻¹ in the rat ovary. *Biol Reprod.* 71 (4), 1384-90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030650>
- Galicka, A., Krętownski, R., Nazaruk, J., Cechowska-Pasko, M., 2014. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 394 (1-2), 217-24. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2097-0>
- Kinnear, H.M., Tomaszewski, C.E., Chang, F.L., Moravek, M.B., Xu, M., Padmanabhan, V., Shikanov, A., 2020. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction.* 160 (3), R25-R39. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0501>
- Amargant, F., Manuel, S.L., Tu, Q., Parkes, W.S., Rivas, F., Zhou, L.T., Rowley, J.E., Villanueva, C.E., Hornick, J.E., Shekhawat, G.S., Wei, J.J., Pavone, M.E., Hall, A.R., Pritchard, M.T., Duncan, F.E., 2020. Ovarian stiffness increases with age in the mammalian ovary and depends on collagen and hyaluronan matrices. *Aging Cell.* 19 (11), e13259. <https://doi.org/10.1111/accel.13259>
- Andrulewicz-Botulińska, E., Kuźmicz, I., Nazaruk, J., Wosek, J., Galicka, A., 2019. The concentration-dependent effect of anethole on collagen, MMP-2 and GAG in human skin fibroblast cultures. *Adv Med Sci.* 64 (1), 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2018.08.008>
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum.* 100, 241-254. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04780.x>

- Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H., Atalay, M., 2013. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal.* 18 (10), 1208-46.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4498>
- Fujii, J., Iuchi, Y., Okada, F., 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol.* 3, 43. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-43>
- Sajadimajd, S., Khazaei, M., 2018. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Curr Cancer Drug Targets.* 18 (6), 538-557.
<https://doi.org/10.2174/1568009617666171002144228>
- Torres-Osorio, V., Urrego, R., Zuluaga, J.J.E., Lopez-Herrera, A., 2019. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción *in vitro* de embriones mamíferos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.* 10 (2), 433-459.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>

7 CONCLUSÕES GERAIS

- O óleo essencial de *C. grewioides* e anetol, na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, assegura a sobrevivência e desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais presentes em tecido ovariano bovino.
- O óleo essencial de *C. grewioides*, na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ promove o aumento da densidade celular e conteúdo de colágeno em tecido ovariano bovino.
- O óleo essencial de *C. grewioides*, e anetol, na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, garantem maior concentração de grupos tiol e promove maior atividade de CAT em tecido ovariano bovino.
- O óleo essencial de *C. grewioides* e anetol, na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, garantem proteção antioxidante mantendo assim a expressão de RNAm para enzimas SOD, CAT, GPX1 e PRDX6, assim como para NRF2, em níveis reduzidos em tecido ovariano bovino.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados com o uso de óleo essencial de *C. grewioides* no cultivo de tecido ovariano de bovinos, alcançados neste trabalho, contêm informações relevantes à bioprospecção de produtos de origem natural aplicados ao cultivo de células. A análise da composição química do óleo essencial de *C. grewioides* poderá auxiliar pesquisas futuras envolvendo essa espécie vegetal. Além disso, os componentes presentes no óleo essencial de *C. grewioides* (quimiotipo anetol) demonstraram efeito sinérgico importante no sequestro de radicais oxidantes, o que pode servir de base para estudos farmacológicos futuros. O anetol tem se mostrado um excelente candidato como suplemento antioxidante aos meios de cultura de folículos ovarianos e os resultados obtidos neste trabalho poderão fomentar ainda mais essa perspectiva. Em relação ao uso do óleo essencial de *C. grewioides* como suplemento de meio de cultivo, os resultados obtidos da atividade de enzimas antioxidantes em conjunto com os dados de expressão de RNAm para essas enzimas servirão para compreensão de como a importância da homeostase redox é fator chave para a sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos, porém mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos de ação do respectivo óleo essencial.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4 ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 804p., 2009.
- ADWAS, ALMOKHTAR. *et al.* Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of Biotechnology**. v. 6, ed. 1, p. 43-47, 2019. DOI: 10.15406/jabb.2019.06.00173
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**. v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGUIAR, F. L. N. *et al.* Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. **Theriogenology**, v. 99, p. 124–133, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.045>.
- AMORATI, R; FOTI, M.C; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **J. Agric. Food Chem**. v. 61, p. 10835–10847, 2013.
- ANDRADE, C.C. NEVES. Potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae: um estudo *in vitro*. **DISSERTAÇÃO** (Mestrado em Produtos Naturais). Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Campus de João Pessoa, 2021.
- ANTONINO, D. C. *et al.* Morfometria de ovários de fetos bovinos: isolamento e quantificação de folículos pré-antrais. **Revista Uningá**, v. 22, ed. 1, p. 18-22, 2017.
- APAK, R. *et al.* Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, ed. 5, p. 997–1027, 2016. DOI:10.1021/acs.jafc.5b04739
- ARORA, N.K., Mishra, I. United Nations Sustainable Development Goals 2030 and environmental sustainability: race against time. **Environmental Sustainability**, v. 2, p. 339–342, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00092-y>
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**. v. 74, ed. 5 p. 884-94, 2010.doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.04.013
- ATRABI, M. J. *et al.* Supplementation of granulosa cells conditioned medium with pyruvate and testosterone could improve early follicular development in cultured 1-day-old mouse ovaries. **Zygote**, v. 29, n. 6, p. 468-475, 2021.
- AUMAILLEY M. The laminin family. **Cell Adh Migr**, v. 7, p.48–55, 2013.
- Azevedo, V. A. N. *et al.* Effects of Aloe vera extract on growth, viability, ultrastructure and expression of mRNA for antioxidant enzymes in bovine secondary follicles cultured *in*

in vitro. **Animal reproduction science**, v. 247, ed. 107078, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107078>

BADEGGI, U. M. *et al.* Green Synthesis of Gold Nanoparticles Capped with Procyanidins from *Leucosidea sericea* as Potential Antidiabetic and Antioxidant Agents. **Biomolecules**, v. 10, 2020.

BADR, A. N. *et al.* Natural antioxidants: Preservation roles and mycotoxicological safety of food. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, ed. 1, p. 285-298, 2021.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, p. 279-312, 1987.

BARBOSA, C.O. *et al.* Chemical composition and antioxidant potential of essential oils from different *Ocimum* species (Basil). **Braz. J. Dev.** v. 7, ed. 3, p. 24422-24442, 2021.

BARUSELLI, P. S. *et al.* Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. **Animal reproduction**, v. 16, ed. 3, 364–375, 2019. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0050>

BÓ, G. A. *et al.* Treatments for the synchronization of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, ed. 1, p. 272-7, 2012.

BOLETIN AGROEXPORT. Canal Rural, São Paulo, 11 de outubro, 2022. Brasil pode bater recorde na exportação de carne bovina e de frango. Disponível em: <<https://www.canalrural.com.br/noticias/pecuaria/brasil-pode-bater-recorde-na-exportacao-de-carne-bovina-e-de-frango/>>. Acesso em: 12 de outubro de 2022.

BONNANS, C. *et al.* Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, p. 786–801, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. **Anal. Biochem**; v. 72, 1976.

BRAGA, T. F; FRANCO, M. M. Clonagem por transferência nuclear e genes relacionados à pluripotência celular. **Rev. Bras. Reprod. Anim**; v. 37, ed. 4, p.334-338, 2013.

BUTNARIO, M; SARAC, I. Essential Oils from Plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**. v. 1, ed. 4, p. 35-43, 2018.

CAI, Y. J; CHOI, T. M. A United Nations' Sustainable Development Goals perspective for sustainable textile and apparel supply chain management. **Transportation research. Part E, Logistics and transportation review**, v. 141, ed. 102010, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tre.2020.102010>

CALAF, G. M. *et al.* Oxidative stress in female cancers. **Oncotarget**, v. 9, ed. 34, p. 23824-23842, 2018.

CARUSO, GIUSEPPE. *et al.* Antioxidant Properties of Second-Generation Antipsychotics: Focus on Microglia. **Pharmaceuticals**, vol. 13, ed. 12, p. 457, 2020.
DOI:10.3390/ph13120457

CARVALHO, J. M. *et al.*, Avaliação citotóxica das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **Conapesc**, Recife, v. 1, ed. 1, p. 1-8, 2018.

CASTRO, K. N. de C. *et al.* Acaricidal potential of volatile oils from Croton species on *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, ed. 6, p. 811-815. 2019. ISSN 1981-528X.

CAVALCANTE, B. N. *et al.* Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 54, ed. 12, p. 1567-1573, 2019.

CAVALCANTE, D. F. G; SILVEIRA, D. M; SILVA, G. C. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). **Braz. J. of Develop**; v. 6, ed. 7, p. 45931-45946, 2020. ISSN 2525-8761

CAVALCANTI, J. M. *et al.* The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 144, ed. 2, p. 240–247, 2012.

CELESTINO, J. J. H. *et al.* Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, ed. 3, p. 591-599, 2007.

CHAINY, G. B. *et al.* Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP¹, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, ed. 25, p. 2943–2950, 2000.

CHEBBAC, KHALID. *et al.* Antioxidant and Antimicrobial Activities of Chemically-Characterized Essential Oil from *Artemisia aragonensis* Lam. against Drug-Resistant Microbes. **Molecules**, v. 27, ed. 3, p. 1136, 2022.

CHELOMBITKO, M. A. Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. Moscow Univ. **Biol. Sci. Bull**; v. 73, p. 199-202, 2018.

CHIKHOUNE, A. *et al.* *In vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 31, ed. 3, p. 411-420, 2015.

COELHO-de-SOUZA, A. N. *et al.* Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & Clinical Pharmacology's**, v. 27, ed. 3, p. 288-298, 2013.

COSTA, F. das Chagas. Efeito da *aloe vera* no cultivo *in vitro* e na criopreservação de Folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de bovinos. **DISSERTAÇÃO** (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2020.

COSTA, JOSÉ G. M. *et al.* Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, ed. 4, p. 583–586, 2008.

DA SILVA, A. D. *et al.* *Croton grewoides* Baill. (Euphorbiaceae) shows antidiarrheal activity in mice. **Phcog. Res.** v.8, p.202-5, 2016.

D'ADDABBO, TRIFONE. *et al.* Nematicidal Activity of Essential Oil from Lavandin (*Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel.) as Related to Chemical Profile. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol. 26, ed. 21, p. 6448, 2021.

DALY, Jamee *et al.* “Towards Improving the Outcomes of Assisted Reproductive Technologies of Cattle and Sheep, with Particular Focus on Recipient Management.” *Animals : an open access journal from MDPI* vol. 10,2 293. 13 Feb. 2020, doi:10.3390/ani10020293

DONG, N. Q; Lin, H. X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. **J. Integr. Plant. Biol.** v. 63, ed.1, p.180-209, 2021. doi:10.1111/jipb.13054

DONGARE, V. *et al.* Inhibition of aldose reductase and anti-cataract action of trans-anethole isolated from *Foeniculum vulgare* Mill. fruits. **Food Chemistry**, v. 132, ed. 1, p. 385–390, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.005>.

EL-GAWAD, A. A. B. D. *et al.* Volatiles Profiling, Allelopathic Activity, and Antioxidant Potentiality of *Xanthium Strumarium* Leaves Essential Oil from Egypt: Evidence from Chemometrics Analysis. **Molecules**, vol. 24, ed. 3, p. 584, 2019. DOI:10.3390/molecules24030584

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 82, ed. 1, p. 70–77, 1959.

EMBRAPA. **Agrobiologia: Pesquisa e Desenvolvimento: Pastagens**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agrobiologia/pesquisa-e-desenvolvimento/pastagens>. Acesso em: 20 jun. 2023.

EMBRAPA. **Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>. Acesso em: 18 jun. 2023.

EMBRAPA. Qualidade da carne bovina. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina> >. Acesso em: 13 ago. 2022.

ERDEM, H. *et al.* Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Tropical Animal Health and Production*, v. 52, ed. 5, p. 2541-2547, 2020.

FARHOOSH, REZA. New insights into the kinetic and thermodynamic evaluations of lipid peroxidation. **Food chemistry**, vol. 375, 2022.

FENG, KAI. *et al.* Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model. **Journal of cellular physiology**, vol. 234, ed. 10, 2019. DOI:10.1002/jcp.28452

FERREIRA-DA-SILVA, F. W; et al. Essential oil of *Croton zehntneri* prevents electrophysiological alterations in dorsal root ganglia of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats, **Phytomedicine Plus**, v. 3, ed. 2, 2023. 100443, ISSN 2667-0313, <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100443>.

FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Advances *in vitro* folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal reproduction**, v. 16, ed. 1, p. 52-65, 2020. DOI:10.21451/1984-3143-AR2018⁻¹²³

FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 31, p. 143⁻¹⁵², 2007.

FONTENELLE, R. O., et al. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of applied microbiology**, v. 104, ed. 5, p. 1383–1390, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03707.x>

FREIRE, R. S. *et al.* Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, ed. 13, p. 4353–4358, 2005.

FUJISAWA, S. et al. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v. 177, ed. 1, p. 39–54, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00194-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00194-4)

FUKASE, EMIKO; MARTIN, WILL. Economic growth, convergence, and world food demand and supply, **World Development**, v. 132, 104954, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2020.104954>.

GALICKA, A. *et al.* Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 394, p. 217-224, 2004.

GHASEMI-DEHNOO, M. et al. Anethole Ameliorates Acetic Acid-Induced Colitis in Mice: Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2022, 9057451, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9057451>

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta Med.** v. 67, p. 564-566, 2001.

GODFRAY, H. C. J. Food for thought. **Proc. Natl. Acad. Sci**; v.108, p. 19845, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118568109>

GOUGEON, A. The early stages of follicular growth. **Biology and Pathology of the Oocyte: Role in Fertility, Medicine and Nuclear Reprograming**, ed. 2, p. 50-61, 2013. DOI:10.1017/CBO9781139135030.006.

GOUVEIA, C. et al. Lessons Learned from Somatic Cell Nuclear Transfer. **Int. J. Mol. Sci**; v. 21, ed. 2314, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21072314>

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. *In vitro* culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, ed. 1, p. 229-238, 2016.

GREENWOOD, P. L. Review: An overview of beef production from pasture and feedlot globally, as demand for beef and the need for sustainable practices increase. **Animal**, v. 1, p. 100295, 2021. doi: 10.1016/j.animal.2021.100295.

GROSBOIS, J. et al. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during *in vitro* culture. **Human reproduction**, v. 38, ed. 3, p. 444-458, 2023. DOI: 10.1093/humrep/dead008

GUGJOO. M. B. Amarpal, Fazili MR, Shah RA, Sharma GT. Mesenchymal stem cell: Basic research and potential applications in cattle and buffalo. **J Cell Physiol**, v. 234, ed. 6, p. 8618-8635, 2019. doi: 10.1002/jcp.27846

GUIMARÃES, R. V. et al. Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir cattle, **Theriogenology**, v. 148, p. 149-161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.014>.

GULCIN, İLHAMI. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of toxicology**, v. 94, ed. 3, 2020.

GUPTA, P.S. *et al.* Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, ed. 1, p. 57-63, 2008.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. **Biomed J**; v. 37, ed. 3, p. 99-105, 2014.

HEADEY, D. et al. Animal Sourced Foods and Child Stunting. **American journal of agricultural economics**. v. 100, ed. 5, p. 1302-1319, 2018. <https://doi.org/10.1093/ajae/aay053>

IDELCHIK, M. del P. S. *et al.* Mitochondrial ROS control of cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 47, p. 57-66, 2017.

ISMAN, MURRAY B. Bioinsecticides based on plant essential oils: a short overview. **Journal of biosciences**, v. 75, n, 7-8, p. 179-182, 2020.

JIANG, S. *et al.* Chemistry and Pharmacological Activity of Sesquiterpenoids from the *Chrysanthemum* Genus. **Molecules**, v. 26, ed. 10, p. 3038, 2021.

JUGREET, B. S. *et al.* Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 89-105, 2020.

KANG, J. T. *et al.* Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, ed. 1, p. 15-20, 2013.

KENNEDY, L. *et al.* M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. **Biomolecules**, v. 10, ed. 10, p. 1429, 2020.

KESRAOUI, S. *et al.* Direct and Indirect Effects of Essential Oils for Sustainable Crop Protection. **Plants**, v. 11, ed. 16, p. 2144, 2022.

KHANNA, S. *et al.* Protective effects of anetholedithiolethione against oxidative stress-induced cytotoxicity in human Jurkat T Cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, ed. 1, p. 61–69, 1998.

KHATKAR, A; SHARMA, K. KANT. Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, ed. 16, p. 2655-2675, 2019.
DOI:10.1080/10408398.2019.1653822

KUMARIYA, S. *et al.* Autofagia em ovário e síndrome do ovário policístico: papel, disputa e perspectiva futura. **Autofagia**, v. 17, ed. 10, p. 2706-2733, 2021.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, ed. 5, p. 244–282, 2007.

LAMB,G.C.; MERCADANTE, V. R. G. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, ed. 2, p. 335-334, 2016.

LEE, H. NAM; E. MI CHANG. Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency. **Clinical and experimental reproductive medicine**, v. 46, ed. 2, p. 43-49. 2019. DOI:10.5653/cerm.2019.46.2.43

LI, CHENG. *et al.* Elabela may regulate SIRT3-mediated inhibition of oxidative stress through Foxo3a deacetylation preventing diabetic-induced myocardial injury. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 25, ed. 1, 2021. DOI:10.1111/jcmm.16052

LIMA, CRYSTIANNE C. *et al.* Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton zehnteneri*, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. **Heliyon**, v. 6, ed. 11 e05445, 2020. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e05445

LIN, XIAOCAI. *et al.* The Chemical Compositions, and Antibacterial and Antioxidant Activities of Four Types of *Citrus* Essential Oils. **Molecules**, v. 26,ed. 11, p. 3412, 2021.
DOI:10.3390/molecules26113412

LIU, S; PI, J; ZHANG, Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. **Redox Biol**; v. 54, p. 102389, 2022.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Méthods**, v. 25, ed. 4, p.402-408, 2001. DOI:10.1006/meth.2001.1262

- LU, J. *et al.* A novel and compact review on the role of oxidative stress infemale reproduction. **Reprod. Biol. Endocrinol**, v. 16, ed. 1, p. 80, 2018.
- MAHDI, A. A. *et al.* Enhancement of antioxidant activity, antifungal activity, and oxidation stability of *Citrus reticulata* essential oil nanocapsules by clove and cinnamon essential oils. **Food Bioscience**, v. 43, 2021. DOI:10.1016/j.fbio.2021.101226
- MAIDARTI, M; ANDERSON, R.A; TELFER, E. E. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing. **Cells**, v. 9, ed. 1, p. 200, 2020
- MALEKI, E. M. *et al.* A comparative study of saffron aqueous extract and its active ingredient, crocin on the *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, and *in vitro* culture of mouse oocytes. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 53, ed. 1, p. 21-25, 2014.
- MALEKI, E. M. *et al.* Effects of crocin supplementation during *in vitro* maturation of mouse oocytes on glutathione synthesis and cytoplasmic maturation. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 10, ed. 1, p. 53-61, 2016.
- MANCIANTI, F; VALENTINA, V. E. Biological Activity of Essential Oils. **Molecules**, v. 25, ed. 3, p. 678, 2020. DOI:10.3390/molecules25030678
- MANSUY, D. *et al.* A new potent inhibitor of lipid peroxidation *in vitro* in vivo, the hepatoprotective drug anthiolhione. **Biochemical and biophysical research communication**, v. 135, ed. 3, p. 1015-1021, 1986.
- MAPLETOFT, R.J.; BO, G. Bovine embryo transfer. **International Veterinary Information Service Reviews in Veterinary Medicine**, v. 9, p. 1-66, 2016.
- MARINO, S. *et al.* Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. **Molecules**, v. 13, ed. 6, p. 1219-1229, 2008.
- MBEMYA, G. T. *et al.* Reports on *in vivo* and *in vitro* contribution of medicinal plants to improve the female reproductive function. **Reprodução & Climatério**, v. 32, ed. 2, p. 109-119, 2017.
- MCMILLAN, W. H. 1998. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**. v. 50, p. 1053-1070. doi:10.1016/s0093-691x(98)00207-6
- MEDBOUHI, ALI. *et al.* Essential Oil of Algerian Eryngium campestre: Chemical Variability and Evaluation of Biological Activities. **Molecules**, v. 24, ed. 14, p. 2575, 2019, doi:10.3390/molecules24142575
- MONZANI PS, Adona PR, Long SA, Wheeler MB. Cows as Bioreactors for the Production of Nutritionally and Biomedically Significant Proteins. **Adv Exp Med Biol**. v. 1354, p. 299-314, 2022. doi: 10.1007/978-3-030-85686-1_15.

MORAIS, M. L. G. DOS SANTOS. Efeitos da suplementação de anetol ou robinona na vitrificação e incubação *in vitro* do tecido ovariano ovino. **DISSERTAÇÃO** (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, ed. 5, p. 907-910, 2006.

MORETTI, E. *et al.* Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, ed. 4, p. 651-657, 2012.

NASCIMENTO, R. K. Taxa de concepção em vacas leiteiras submetidas a inseminação artificial em tempo fixo do programa de melhoramento genético do governo de Sergipe. **MONOGRAFIA** (Ciências veterinárias), Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2022.

NEVES, C. A. *et al.* Culture of goat preantral follicles *in situ* associated with mesenchymal stem cell from bone marrow. **Zygote**, v. 28, ed. 1, p. 65-71, 2020

OKEDIRAN, B. S. *et al.* Haematological and antioxidant enzyme response to Lead toxicity in male Wistar rats. **Ceylon Journal of Science**, v. 46, ed. 2, p. 31-37, 2017.

OKTAY, M; GÜLÇİN, İ; KÜFREVIÖĞLU, Ö.İ. Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, ed. 2, p. 263-271, 2003.

OLIVEIRA, S. D. DA S. Atividade antioxidante dos óleos essenciais de genótipos de *Croton grewoides* Baill, *Croton tetradenius* Baill e seus compostos majoritários. **DISSERTAÇÃO** (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade), Sergipe, 2018.

OLIVEIRA, S. D. DA S. et al. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, ed. 1, p. 94-103, 2021. DOI: 10.1080/10412905.2020.1779139

OLIVEIRA, S.D. et al. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. **J. Essent. Oil Res**; v. 33, ed. 1, p. 94-103, 2020.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1779139>

OLSON, S. E; SEIDEL, G. E; Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin e improves development *in vitro* and after transfer to recipients. **Biol. Reprod.** v. 62, ed. 2, p. 248-252, 2000.

ONU News. População mundial atinge 8 bilhões de pessoas. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2022/11/1805342> . Acesso em: 18 jun. 2023.

PAULINO, L. R. F. M. et al. Why Is It So Difficult To Have Competent Oocytes from *In vitro* Cultured Preantral Follicles? **Reproductive sciences**, v. 29, ed. 12, p. 3321-3334, 2022. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00840-8>

PESSOA, CLÁUDIA et al. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Advanced in Phytomedicine**, v. 2, p. 197–211, 2006. doi:10.1016/S1572-557X(05)02012-X

PONTES, J. H. F. et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**. v. 74, p. 1349–1355, 2010. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010. 06.004

PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information . PubChem Compound Summary for CID 637563, Anethole, 2004. Acesso em 14 de dezembro de 2021. **Disponível em:** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Anethole>.

RAJABI-TOUSTANI, R. *et al.* Effect of *Papaver rhoeas* L. extract on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v. 114, ed. 1, p. 146–151, 2013.

RAMALHO, V. C; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, ed. 4, p.755-760, 2006.

RASHID, NORHASHIMA A. *et al.* The role of natural antioxidants in cisplatin-induced hepatotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, 2021.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods Mol. Biol.** v. 1627, p. 395-407, 2017.

ROSARIO, R.; CHILDS, A. J.; ANDERSON, R. A. RNA-binding proteins in human oogenesis: Balancing differentiation and self-renewal in the female fetal germline. **Stem Cell Research**, v. 21, p. 193–201, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2017.04.008>.

SÁ, N. A. R. *et al.* Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 226-234, 2016.

SÁ, N.A.R. *et al.* Anethole reduces oxidative stress and improves *in vitro* survival and activation of primordial follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 51, ed. 8, 2018.

SAID-AL AHL, H. A. H.; HIKAL, W. M.; MAHMOUD, A. A. Essential Oils: Biosynthesis, chemistry and biological functions. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, ed. 8, p. 190-200, 2017.

SAJADIMAJD, S; KHAZAEI, M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 18, ed. 6, p. 538-557, 2018.

SAKHTEMAN, AMIRHOSSEIN. *et al.* An Assay on the Possible Effect of Essential Oil Constituents on Receptors Involved in Women's Hormonal Health and Reproductive System Diseases. **Journal of evidence-based integrative medicine**, v. 25, 2020. doi:10.1177/2515690X20932527

SANTOS, M. *et al.* Use of natural antioxidants in *in vitro* mammalian embryo production. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 39, ed. 1, p. 431, 2018.

SANTOS, M. V. O. *et al.* Syzygium aromaticum essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. **Theriogenology**, v. 128, p. 74-80, 2019.

SANTOS, N. C. *et al.* Bioactivity of essential oils from *Croton grewoides* and its major compounds: toxicity to soybean looper *Chrysodeixis includens* and selectivity to the predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. **Environ Sci Pollut Res Int**; v. 30, ed. 7, p. 18798-18809, 2023. doi: 10.1007/s11356-022-23414-w..

SCHNITZLER, PAUL. Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. **Chemotherapy**, v. 64, ed. 1, p. 1-7, 2019. doi:10.1159/000501062

SCHOFIELD, J. H; SCHAFFER, . T. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitophagy: A Complex and Nuanced Relationship. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 34, ed. 7, p. 517-530, 2021.

SENEDA, M. M., et al. Folliculogenesis, Fertility and Biotechnology in Dairy Cattle. 2021. DOI: 10.5772/intechopen.101243.

SENEDA, M. M., et al. Biotécnicas da reprodução em bovinos: aplicações práticas. **Revista Brasileira de Buiatria**, v. 1, p. 1-21, 2022. DOI: 10.4322/2763-955X.2022.003.

SERRA, D. S. *et al.* Essential oil of *Croton Zehntneri* attenuates lung injury in the OVA-induced asthma model. **Journal of Asthma**, v. 56, ed. 1, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1080/02770903.2018.1430828

SHAH, S. M; Chauhan, M. S. (2019). Modern biotechnological tools for enhancing reproductive efficiency in livestock. **Indian journal of genetics and plant breeding**, v. 79, p. 241-249.

SHI, L. *et al.* Long-Term Moderate Oxidative Stress Decreased Ovarian Reproductive Function by Reducing Follicle Quality and Progesterone Production. **PloSone**, v. 11, ed. 9, 2016.

SILVA, A.B. et al. Estratégias para a melhoria da eficiência do cultivo folicular *in vitro*: Importância da suplementação do meio e estudo das alterações epigenéticas. **Research, Society and Development**, v. 10, ed. 9, e22910918022, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18022>

SILVA, G. V. CLÉIA. *et al.* Composition and Insecticidal Activity of the Essential Oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman), **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, ed. 2, p. 179-182, 2008.

SILVA, J. A. G. *et al.*, Atividade tóxica *in vitro* de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, ed. 1, p. 112-115, 2018.

SILVA, K.F. *et al.* High Doses of Essential Oil of *Croton Zehntneri* Induces Renal Tubular Damage. **Plants**, v. 10, ed. 7, p. 1400, 2021.

SILVA-ALVES, K. S. *et al.* Essential oil of *Croton zehntneri* and its main constituent anethole block excitability of rat peripheral nerve. **Planta medica**, v. 81, ed. 4, 292-297, 2015. DOI:10.1055/s-0034-1396309

SIMON, L. E; KUMAR, T. R; DUNCAN, F. E. *In vitro* ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables. **Biology of Reproduction**, v.103, ed. 3, p. 455-470, 2020.

SOLLECITO, N. V. *et al.* *In vitro* production of bovine embryos in culture medium containing different concentrations of antioxidant extracted from Lippia oil organoides. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 13, ed. 3, p. 490-490, 2016.

SOUSA, ANTÔNIO J. P. *et al.* Antioxidant Properties of [Croton zehntneri Pax et Hoffm. Essential Oil and Its Inclusion Complex with β -Cyclodextrin Prepared by Spray Drying. **Journal of the Brazilian Chemical Society** [online], v. 33, ed. 10, pp. 1244-1253, 2022.

SOUSA, M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, ed. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, L. C. BARROS. PIVE e IATF Aplicadas à Reprodução de Bovinos de Corte. **TCC**, graduação, Zootecnia, Goiânia, 2020.

STELLER, J. G; ALBERTS, J. R; RONCA, A. E. Oxidative Stress as Cause, Consequence, or Biomarker of Altered Female Reproduction and Development in the Space Environment. **Int. J. Mol. Sci**; v. 19, ed. 12, p. 3729, 2018.

TAKAHASHI, H. N. Y; TUZIMURA, K. Fluorometric Determination of Glutathione by N-9-Acridinyl -maleimide and Its Application to Biological Materials. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, ed. 4, p. 769-774, 1978.

TANG, VW. Collagen, stiffness, and adhesion: the evolutionary basis of vertebrate mechanobiology. **Mol Biol Cell**, v. 31, p. 1823-1834, 2020.

TELFER, E. E; ANDERSEN, C. Y. *In vitro* growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes. **Fertility and Sterility**, v. 115, ed. 5, p.1116-1125, 2021.

TELFER, EVELYN E. Future developments *in vitro* growth (IVG) of human ovarian follicles. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 98, ed. 5, p. 653-658, 2019. doi:10.1111/aogs.13592

TORRES, V. *et al.* Ascorbic acid-cyclodextrin complex alters the expression of genes associated with lipid metabolism in *in vitro* produced bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, ed. 1, p. 55-62, 2019. doi:10.1111/rda.13311

TORRES-OSORIO, VIVIANA. *et al.* Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción *in vitro* de embriones mamíferos. Revisión. **Rev. Mex. de Cienc. Pecuarias**, v. 10, ed. 2, p. 433-459, 2019.

TOSSETTA, G. *et al.* Role of NRF2 in Ovarian Cancer. **Antioxidants**, v. 11, ed. 4, p. 663, 2022.

VALGIMIGLI, L.; PRATT, D. A. Antioxidants in chemistry and biology. **Encycl. Radic. Chem. Biol. Mater**, v. 3, p. 1623–1677, 2012.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D.. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VASCONCELOS, E. M. *et al.* Chemical composition and effects of *Ocimum gratissimum* essential oil (OGEO) on the expression of mRNA for antioxidant enzymes during *in vitro* culture of bovine ovarian secondary follicles, **Journal of Essential Oil Research**, 34:5, 446-454, 2022. DOI: 10.1080/10412905.2022.2067256

VASCONCELOS, E. M. *et al.* Eugenol influences the expression of messenger RNAs for superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 in bovine secondary follicles cultured *in vitro*. **Zygote**, v. 29, ed. 4, p. 301-306, 2021. doi:10.1017/S0967199420000908

VÁSQUEZ, N. A; TORRES, V; ROJANO, B. A. Efecto del ácido ascórbico durante maduración *in vitro* de oocitos bovinos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y competencia para el desarrollo embrionario. **Inf. Tecnol., La Serena**, v. 25, ed. 2, p. 141–50, 2014.

VIANA, J. H. M. *et al.* Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, ed. 1, p. 12⁻¹⁸, 2018.

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm Animals. A publication of International Embryo Technology Society (IETS) Embryo Technology Newsletter. 2018;2017;36(4):8–19.

VINDIN H, Mithieux SM, Weiss AS. Elastin architecture. **Matrix Biol** 2019;84:4–16.

WANG, F. *et al.* Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 101, ed. 2, p. 577 586, 2014.

WAŚKIEWICZ, AGNIESZKA; BESZTERDA, MONIKA; GOLIŃSKI, PIOTR. Nonenzymatic Antioxidants in Plants. Oxidative Damage to Plants, **Academic Press**, Chapter 7, p. 201-234, 2014. ISBN 9780127999630, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1>.

WERRIE, PIERRE-YVES. *et al.* Phytotoxicity of Essential Oils: Opportunities and Constraints for the Development of Biopesticides. A Review. **Foods**, v. 9, ed. 9, p. 1291, 2020,. doi:10.3390/foods9091291

WIECZYŃSKA, JUSTYNA; CAVOSKI, IVANA. Antimicrobial, antioxidant and sensory features of eugenol, carvacrol and trans -anethole in active packaging for organic ready-to-eat iceberg lettuce. **Food Chemistry**, v. 259, p. 251–260, 2018. doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.137

WOJTUNIK, K. A.; CIESLA, L. M.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Model studies on the antioxidante activity of common terpenoid constituents of essential oils means the 2,2-diphenil¹-picrylhydrazyl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, ed. 37, p. 9088-9094, 2014.

WU, QIJING. *et al.* Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111308>.

YANG, YINGHUA. *et al.* Theca cells can support bovine oocyte growth *in vitro* without the addition of steroid hormones. **Theriogenology**, v. 142, p. 41-47, 2020. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.09.037

YOU, J. *et al.* Anthocyanin stimulates *in vitro* development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. **Theriogenology**, New York, v. 74, ed. 5, p. 777-785, 2010.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **J. Clin. Pathol**, v. 54, ed. 3, p. 176–186, 2001.

YU, CAIYUN *et al.* Effects of star anise (*Illicium verum* Hook.f.) essential oil on laying performance and antioxidant status of laying hens. **Poultry Science**, vol. 97, ed. 11, p. 3957-3966, Nov, 2019. doi:10.3382/ps/pey263

ZHANG S, Ma X, Wang Z, Zhang P, Li Z. Production of transgenic cattle expressing lysine-rich polypeptide in milk by somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res.* 2019 Aug;28(3-4):317-325. doi: 10.1007/s11248-019-00124-7. Epub 2019 Mar 26. PMID: 30911938.

ZHU, J.; Moawad, A.R.; Wang, C.Y.; Li, H.F.; Ren, J.Y.; Dai, Y.F. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018, 6, S15–S26.

ZOLLINGER AJ, Smith ML. Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol* 2017;60–61:27–37.

ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 Campus de Sobral – Faculdade de Medicina
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

CERTIFICADO

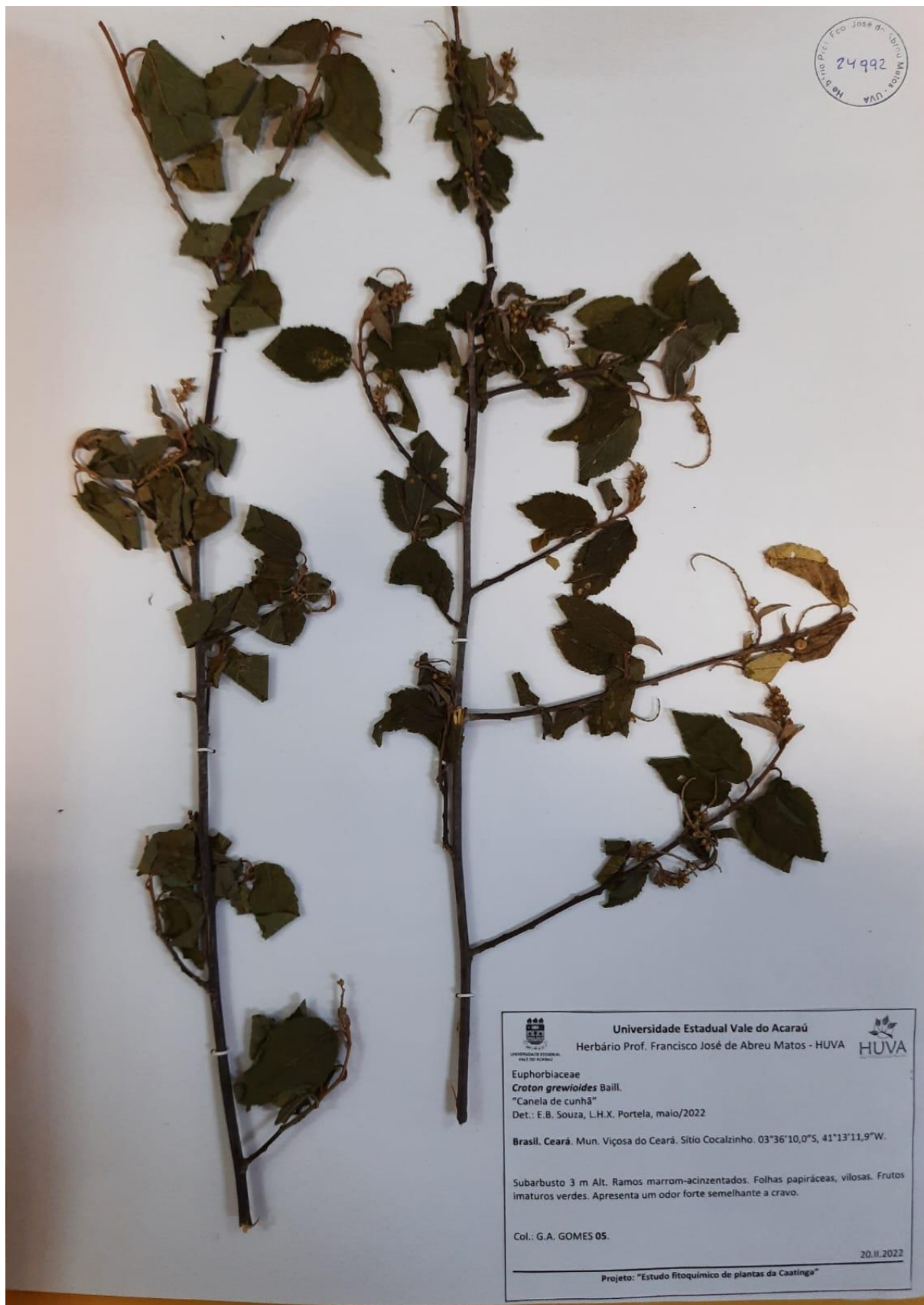
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Caracterização química do óleo essencial de *Croton grewoides* e avaliação dos seus efeitos e do anetol como suplementos de meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos bovinos", registrado como Protocolo CEUA UFC Sobral nº 02/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino). O projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Campus da UFC em Sobral, em cumprimento à deliberação registrada na terceira reunião ordinária de 03/05/2022.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/05/2022 até 30/03/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus</i> / Bovino de corte
Nº de animais	16 (dezesseis)
Peso/Idade	400 kg / 3-8 anos
Sexo	Fêmeas (♀)
Origem	Abatedouro Vasconcelos & Cavalcante Ltda CNPJ: 12.134.855/0002-75 CRMV: CE-00962-VP ART: 688612

Sobral, 03 de maio de 2022.

Prof. Igor Iuço Castro da Silva
 Professor de Registro Técnico
 Curso de Pós-graduação: Mestrado em Saúde
 DCT/UFCE/Sobral

Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

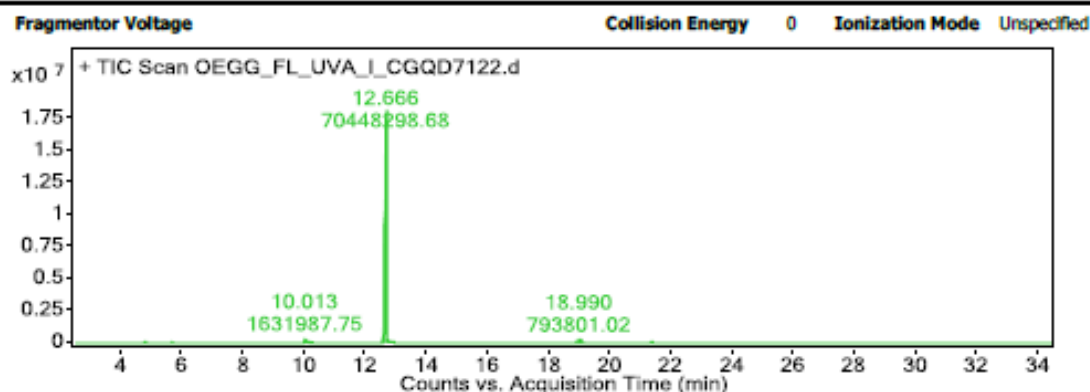
ANEXO B - EXCICATA DE *CROTON GREWIOIDES*

ANEXO C - CROMATOGRAMA DO OECG POR CG-EM

Qualitative Analysis Report

Data Filename	OEGG_FL_UVA_I_CGQD7122.D	Sample Name	OEGG_FL_UVA_I_CGQD7122
Sample Type		Position	2
Instrument Name		User Name	
Acq Method	Oleo_essencial_HP_MS_30m.M	Acquired Time	4/27/2022 11:15:11 AM
IRM Calibration Status	Not Applicable	DA Method	default.m
Comment			
Expected Barcode		Sample Amount	
Dual Inj Vol	1	TuneName	atune.u
TunePath	D:\MassHunter\GCMS\1\5977	MSFirmwareVersion	6.00.21
Acquisition Time #2	2022-04-27 14:15:11Z	OperatorName	
RunCompletedFlag	True	Acquisition SW Version	MassHunter GC/MS Acquisition B.07.01.1805 12- Mar-2014 Copyright © 1989- 2014 Agilent Technologies, Inc.

User Chromatograms

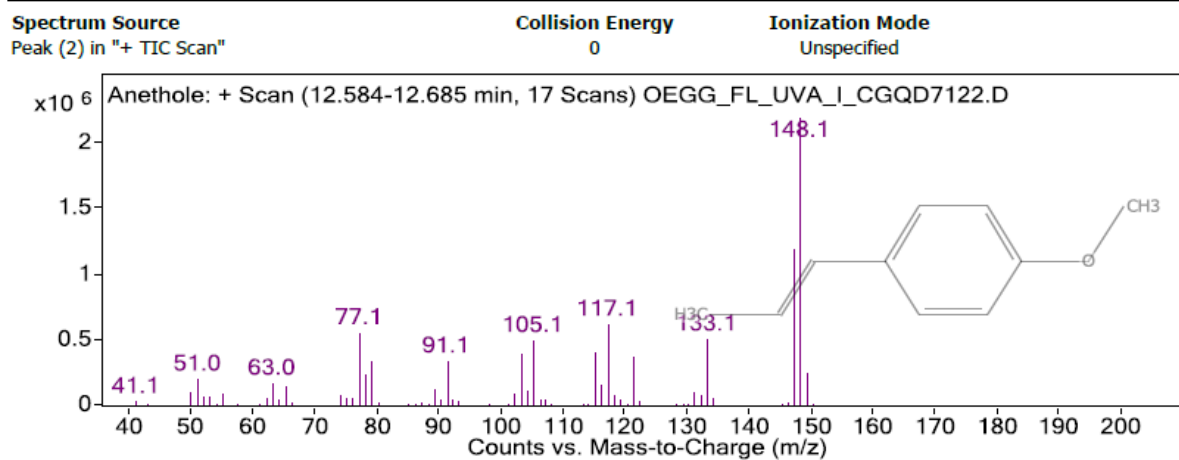


Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	AreaSumPercent
1	9.975	10.013	10.287	326645.89	1631987.75	2.24
2	12.554	12.666	12.749	18096997.6	70448298.68	96.67
3	18.901	18.99	19.137	262078.65	793801.02	1.09

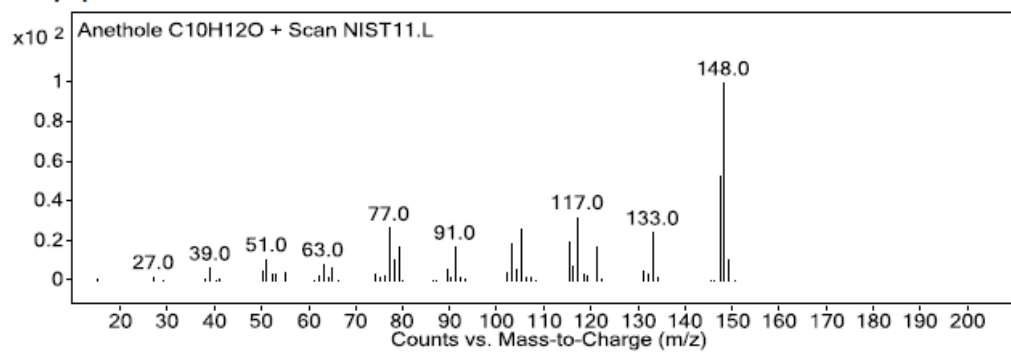
User Spectra

Spectrum Source	Collision Energy	Ionization Mode
Peak (1) In "+ TIC Scan"	0	Unspecified



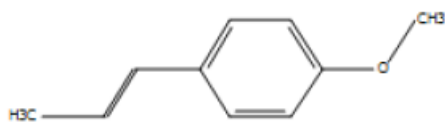
Qualitative Analysis Report

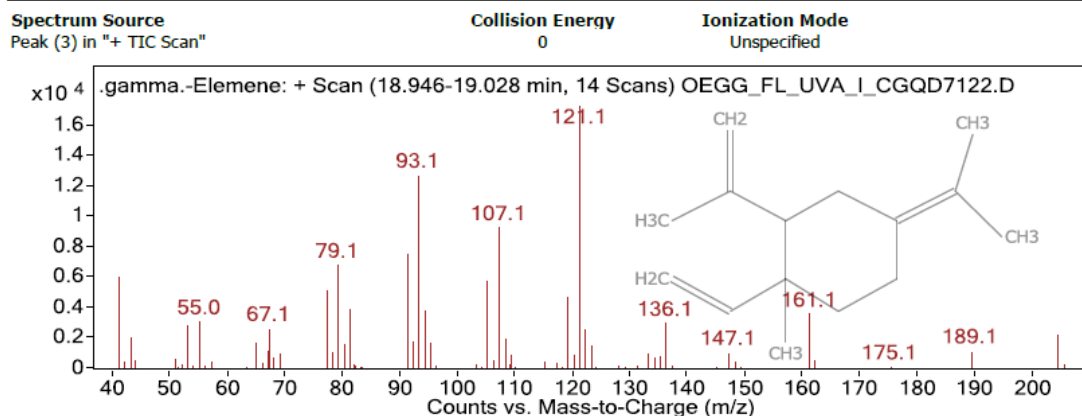
Library Spectrum



Spectrum Structure

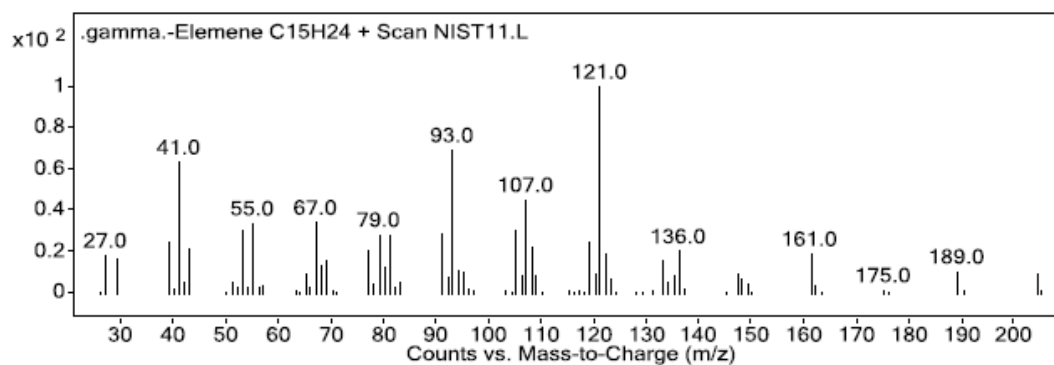
Anethole





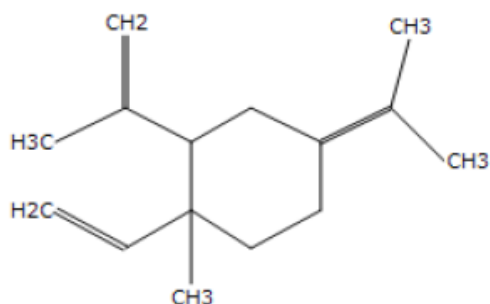
Library Spectrum

Qualitative Analysis Report



Spectrum Structure

.gamma.-Elemene



ANEXO D - CROMATOGRAMA DO OECG POR CG-DIC

Informações da amostra

Analysis Date & Time : 10/05/2022 11:50:50
 User Name : Hilton Magalhaes
 Vial# : 12
 Sample Name : OE
 Sample ID : OE
 Injection Volume : 1,00
 Data Name : C:\GCsolution\Data\Externo\2022\UVA_Sobra\Dados_BioEnz05mai22\09mai22\10mai22\UVA_OECG_prof
 Original Data Name : C:\GCsolution\Data\Externo\2022\UVA_Sobra\Dados_BioEnz05mai22\09mai22\10mai22\UVA_OECG_prof
 Method Name : C:\GCsolution\Data\Externo\2022\UVA_Sobra\Dados_BioEnz05mai22\09mai22\10mai22\Oleo_essencia_RT
 Batch Name : C:\GCsolution\Data\Externo\2022\UVA_Sobra\Dados_BioEnz05mai22\09mai22\10mai22\AnalisesBioEnz_10

Tabela de Picos - Oleos essenciais - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Area%	Height	Height%	Area/Height	Name
1	13,020	115832	2,2653	40504	4,7930	2,860	
2	16,124	4997486	97,7347	804560	95,2070	6,211	
Total		5113318	100,0000	845064	100,0000		

