

Estado da publicação: O preprint foi submetido para publicação em um periódico

Avaliações iniciais do uso do eugenol como antioxidante na maturação in vitro de oócitos ovinos

Sara Rodrigues Pereira dos Santos, Brenna Maria Silva de Souza, Bruna Moura Silva, Damaris Raquel Pires dos Santos, Érika Karoline de Oliveira Aureliano, Andreza Mayara Carneiro Lima, Luana Kealy Pimentel de Oliveira, Sueli de Oliveira Lima, Ailton Batista Pereira, Isabela Maria Lopes, Beatriz Cavalcanti de Freitas, Thais Thatiane dos Santos Souza, Pedro Humberto Félix de Sousa, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Júnior

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.7755>

Submetido em: 2023-12-19

Postado em: 2023-12-22 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

AVALIAÇÕES INICIAIS DO USO DO EUGENOL COMO ANTIOXIDANTE NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS

SARA RODRIGUES PEREIRA DOS SANTOS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-3984-3060>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Correspondência: sr.rodril0@gmail.com

BRENNIA MARIA SILVA DE SOUZA

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1350-736X>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

BRUNA MOURA SILVA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-6689>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

DAMARIS RAQUEL PIRES DOS SANTOS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5269-7983>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

ÉRIKA KAROLINE DE OLIVEIRA AURELIANO

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3875-2494>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

ANDREZA MAYARA CARNEIRO LIMA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6192-5937>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

LUANA KEALY PIMENTEL DE OLIVEIRA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6440-5515>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

SUELI DE OLIVEIRA LIMA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7085-5624>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

AILTON BATISTA PEREIRA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6360-1389>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

ISABELA MARIA LOPES

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2899-3468>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

BEATRIZ CAVALCANTI DE FREITAS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1073-1555>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

THAIS THATIANE DOS SANTOS SOUZA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6887-5677>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

PEDRO HUMBERTO FÉLIX DE SOUSA

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0218-0743>

Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Juazeiro, Bahia, Brasil.

MABEL FREITAS CORDEIRO

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1963-7311>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

EDILSON SOARES LOPES JÚNIOR

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4790-8134>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

RESUMO: Objetivando avaliar o efeito do eugenol na produção *in vitro* de embriões ovinos. Os oócitos, foram aspirados e levados para a maturação *in vitro* (MIV), onde foram divididos em 4 grupos: o CON (controle), no qual os oócitos foram imersos em meio, sem antioxidante, já nos grupos EU10, EU20, EU40 foi utilizado o mesmo meio do grupo CON, acrescido de 10, 20 e 40 μM de eugenol, respectivamente. Foi avaliado o grau de expansão das células do cumulus. Após isso, os oócitos seguiram para a fecundação *in vitro* e cultivo *in vitro*, sendo, ao final desse processo, avaliada a taxa de estruturas clivadas. Em relação à taxa de expansão das células do cumulus, o grupo CON apresentou maiores taxas, quando comparado aos grupos adicionados de eugenol. Avaliando os oócitos com células do cumulus totalmente expandidas, somente o grupo EU40, apresentou-se menor, quando comparado ao restante dos grupos de tratamento. Já observando os oócitos com células do cumulus parcialmente expandidas, o grupo

EU40, apresentou maiores percentuais de expansão, quando comparado aos demais tratamentos. Sobre a presença do primeiro corpúsculo polar nos oócitos, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos de tratamentos. E, por último, em relação às estruturas clivadas, os grupos CON e EU10 apresentaram as maiores taxas, quando comparado aos grupos EU20 e EU40. Dessa maneira, foi possível concluir que a utilização de 10 μM de eugenol na MIV de oócitos ovinos apresentou ser a melhor concentração dessa substância.

Palavras-chave: FIV; MIV; ovelha; PIV; zigoto.

INITIAL EVALUATIONS OF THE USE OF EUGENOL AS AN ANTIOXIDANT IN THE *IN VITRO* MATURATION OF OVINE OOCYTES

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effect of eugenol on the *in vitro* production of ovine embryos. Oocytes were aspirated and taken for *in vitro* maturation (IVM), where they were divided into 4 groups: the CON (control), in which the oocytes were immersed in medium without an antioxidant; in the EU10, EU20, EU40 groups, the same medium as in the COM group was used, supplemented with 10, 20, and 40 μM of eugenol, respectively. The degree of expansion of cumulus cells was evaluated. Subsequently, the oocytes underwent *in vitro* fertilization and *in vitro* culture, and at the end of this process, the rate of cleaved structures was assessed. Regarding the expansion rate of cumulus cells, the CON group exhibited higher rates compared to the groups supplemented with eugenol. Evaluating oocytes with fully expanded cumulus cells, only the EU40 group showed a lower rate when compared to the rest of the treatment groups. Whereas observing oocytes with partially expanded cumulus cells, the EU40 group showed higher expansion percentages compared to the other treatments. Concerning the presence of the first polar body in the oocytes, it was observed that there was no statistical difference between the treatment groups. Lastly, concerning the cleaved structures, the CON and EU10 groups showed the highest rates compared to the EU20 and EU40 groups. Thus, it was possible to conclude that the use of 10 μM of eugenol in the IVM of ovine oocytes proved to be the optimal concentration of this substance.

Key words: IVF; IVM; IVP; sheep; zygote.

EVALUACIONES INICIALES DEL USO DEL EUGENOL COMO ANTIOXIDANTE EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS OVINOS

RESUMÉN: El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del eugenol en la producción *in vitro* de embriones ovinos. Los ovocitos fueron aspirados y llevados para la maduración *in vitro* (MIV), donde se dividieron en 4 grupos: el CON (control), en el cual los ovocitos fueron sumergidos en medio sin antioxidantes; en los grupos EU10, EU20, EU40 se utilizó el mismo medio que en el grupo CON, pero con la adición de 10, 20 y 40 μM de eugenol, respectivamente. Se evaluó el grado de expansión de las células del cúmulo. Después de esto, los ovocitos fueron sometidos a la fecundación *in vitro* y al cultivo *in vitro*, y al final de este proceso se evaluó la tasa de estructuras clivadas. En cuanto a la tasa de expansión de las células del cúmulo, el grupo CON mostró tasas más altas en comparación con los grupos suplementados con eugenol. Al evaluar los ovocitos con células del cúmulo totalmente expandidas, solo el grupo EU40 mostró una tasa más baja en comparación con el resto de los grupos de tratamiento. Mientras que al observar los ovocitos con células del cúmulo

parcialmente expandidas, el grupo EU40 mostró porcentajes de expansión más altos en comparación con los otros tratamientos. Respecto a la presencia del primer corpúsculo polar en los ovocitos, se observó que no hubo diferencia estadística entre los grupos de tratamiento. Por último, en relación con las estructuras clivadas, los grupos CON y EU10 mostraron las tasas más altas en comparación con los grupos EU20 y EU40. Por lo tanto, se pudo concluir que el uso de 10 μ M de eugenol en la MIV de ovocitos ovinos resultó ser la concentración óptima de esta sustância.

Palabras clave: cigoto; FIV; MIV; oveja; PIV.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV), é uma biotécnica da reprodução capaz de gerar produtos viáveis de animais que não estão em condições de se reproduzir, como, por exemplo, animais jovens, animais com problemas reprodutivos, animais mortos e até extintos (1).

Uma das principais etapas dessa biotécnica é a maturação *in vitro* (MIV) onde há uma grande formação das espécies reativas de oxigênio, que causa o estresse oxidativo decorrentes da ausência do sistema de defesa antioxidante materno, manipulação celular e exposição a luz. (2). Atualmente, diversos componentes vêm sendo utilizados para diminuir as espécies reativas de oxigênio nessa etapa, como, por exemplo, os antioxidantes (3).

O eugenol (4-alil-2 metoxifenol), é um exemplo dessas substâncias que possui propriedades antioxidantes, além de ação anticancerígena, citotóxica e antitumoral (4). Por ser uma substância lipofílica, o eugenol é, rapidamente, absorvido e tem a capacidade de penetrar as membranas biológicas e atingir alvos intracelulares (4). Um estudo avaliando o óleo essencial de cravo-da-índia, o qual contém como componente primário o eugenol, melhorou a viabilidade das células do cumulus após o processo de MIV em oócitos bovinos (5), além de aumentar as taxas de oócitos em metáfase II, ou totalmente maduros.

Contudo, ainda são escassos os trabalhos encontrados que elucidem os efeitos da adição do eugenol no meio de maturação *in vitro*, principalmente em ovinos. Desta maneira o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do eugenol como antioxidante na maturação *in vitro* de oócitos ovinos, sobre a produção *in vitro* de embriões ovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sendo registrado sob o protocolo de Nº 0005/271022.

Todos os meios e reagentes foram adquiridos na Sigma Aldrich®. As etapas ligadas à PIV foram realizadas Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), situado no Campus Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) em Petrolina-PE, no período de Maio a Julho de 2023.

Os ovários utilizados foram obtidos em abatedouro local, imediatamente após o abate de ovelhas sem padrão racial definido (SRD) e foram transportados até o LAFIBRA, dentro de 1 hora, em solução de NaCl 0,9%, contendo 0,05 g de pentabiótico/L, sendo o pentabiótico composto por estreptomomicina básica, dihidroestreptomomicina básica, benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína e benzilpenicilina potássica, a uma temperatura de 33°C a 34°C, em garrafa térmica. No LAFIBRA, os ovários foram lavados, três vezes, em solução salina aquecida, retirados os tecidos adjacentes e mantidos em banho-maria, a 34°C. Para a colheita dos complexos cumulus-oócitos (CCO), foi utilizada uma bomba de vácuo a uma pressão de 5 mL/min, agulha 18G e o meio de aspiração composto por TCM-199 com 25 mM de HEPES suplementado com 50 UI/mL heparina sódica, 500 UI de penicilina, 0,5 mg estreptomomicina e 1,5 μ g de anfotericina e 1% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente a colheita, os CCO

foram vertidos em placas de petri de 100 mm, analisados sob estereomicroscópio e classificados de acordo com Freitas, Melo (6), sendo selecionados para a maturação *in vitro* apenas os classificados Graus I e II.

Após a classificação oocitária, os complexos cumulus-oócitos (CCO) que apresentaram melhor qualidade foram, igualmente, divididos em quatro grupos de maturação: o grupo CON, no qual os CCO foram imersos em meio contendo TCM-199, suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 0,5 mg/mL de estreptomicina e 1,5 µg/mL de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 10 UI/mL de eCG; e nos grupos EU10, EU20, EU40, os oócitos foram maturados na presença do meio MIV do grupo CON, suplementado com 10, 20 e 40 µM de eugenol, respectivamente. Os CCO foram dispostos em placa de petri, em número de 15 CCO por gota de 75 µL de meio MIV, sob óleo mineral, durante 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Ao final do processo de maturação, os CCO maduros foram avaliados quanto à ocorrência ou não de expansão das células do cumulus. Além disso, foi estimado o grau de expansão das células do cumulus, classificando-os como: não expandido, parcialmente expandido ou totalmente expandido, conforme a metodologia de Marei, Wathes, Fouladi-Nashta (7). Além disso, foi avaliada a presença do primeiro corpúsculo polar e retração do ooplasma.

Uma parte dos oócitos maturados foram desnudos através de sucessivas pipetagens e foram avaliados em microscópio invertido (BEL INV-100®; BEL, São Paulo, Brasil), para avaliar a presença do segundo corpúsculo polar no espaço perivitelínico. Além disso, foi avaliada a presença do ooplasma retraído. Outra parte dos oócitos maturados seguiram para a FIV. Nesse processo, o sêmen foi colhido de carneiros com fertilidade comprovada, pelo método da vagina artificial. Posteriormente, foram dispostos em um gradiente de Percoll 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram recuperados por centrifugação, a 700G, por 15 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 2 mL de meio de FIV (SOF®, suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 0,5 mg/mL de estreptomicina, 1,25 µg/mL de anfotericina B e 10 µg/mL de hipotaurina) e lavado por centrifugação (100G; 5 minutos). O novo precipitado foi ressuspensão em 2 mL de meio FIV. Após a aferição da concentração espermática total, a concentração final foi ajustada para 1x10⁶ espermatozoides/mL, no volume total de 50 µL/gota de meio FIV, em placa de petri, sob óleo mineral. Os oócitos maturados juntamente com os espermatozoides selecionados e capacitados, foram inclusos em gotas de 50 µL de meio de fecundação *in vitro* (FIV). A FIV foi realizada por um período de 18 a 20 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, contendo 5% de CO₂. Concluído o processo de FIV, os presumíveis zigotos foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens, seguindo a metodologia de Mezzalana et al. (8).

Os presumíveis zigotos foram, então, submetidos ao cultivo *in vitro* por 48 h em meio contendo 50 µL de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 0,5 mg/mL de estreptomicina, 1,25 µg/mL de anfotericina B e 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), sob óleo mineral, em placas de petri, contendo de 10 a 15 estruturas por gota. As placas foram cultivadas em estufa de cultivo a 38,5°C com 5% de CO₂. O número de estruturas clivadas foi registrado no fim do período de cultivo. Os dados foram expressos em porcentagens e comparados usando o teste do Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). As diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta dos dados, foi possível observar que, em relação à taxa de expansão das células do cumulus, os grupos tratados com eugenol (EU10; EU20 e EU40) reduziram a expansão das células do cumulus, quando comparado ao grupo CON (P<0,05) (Tabela 1). As

células do cumulus, após a MIV, tendem a expandir através da produção de ácido hialurônico. A produção desse ácido ocorre através da estimulação de fatores produzidos pelo oócito e pela ação dos hormônios endógenos, (9).

Tabela 1 – Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* nos grupos controle (CON) e na presença de eugenol (EUG10;EUG20;EUG40;)

Tratamentos	Nº CCO I e II	Taxa de expansão % (n)	Grau de expansão % (n)	
			Totalmente expandido	Parcialmente expandido
CON	154	96,1% (148/154) ^a	55,4% (82/148) ^{Aa}	43,9% (65/148) ^{Bb}
EU10	164	81,0% (133/164) ^b	64,6% (86/133) ^{Aa}	47,3% (63/133) ^{Bb}
EU20	167	77,8% (130/167) ^b	56,9 % (74/130) ^{Aa}	54,6% (71/130) ^{Ab}
EU40	160	86,2% (138/160) ^b	40,5% (56/138) ^{Bb}	73,1% (101/138) ^{Aa}

^{a,b} Valores com letras minúsculas diferentes entre colunas indicam diferença significativa (P<0,05); ^{A, B} Valores com letras maiúsculas diferentes entre linhas indicam diferença significativa (P<0,05).

Dessa maneira, quanto maior a expansão das células do cumulus, maior a probabilidade de esse ter alcançado o estágio de metáfase II (MII). Através desses resultados, foi possível observar que a adição de 40 µM de eugenol foi tóxica, reduzindo a expansão das células do cumulus, demonstrando que a utilização ideal de eugenol em oócitos ovinos está entre 10 e 20 µM. Um estudo avaliando o óleo essencial de cravo-da-índia, o qual contém, como componente primário, o eugenol, apresentou resultados diferentes, devido a utilização de unidades de medida diferentes da unidade de medida utilizada no presente trabalho onde foi possível observar que a utilização de 15 e 20 µg/mL de eugenol na MIV de oócitos bovinos melhorou a viabilidade das células do cumulus após o processo de MIV (10). Em oócitos suínos, também foram observados os mesmos resultados, ao utilizar o mesmo óleo essencial na MIV. As mesmas concentrações citadas como melhores em bovinos apresentaram resultados satisfatórios em relação à expansão das células do cumulus (11). Já utilizando o eugenol em tecido ovariano, foi observado que a adição de 40 µM melhorou a sobrevivência folicular, independente da classe folicular, além de proteger o tecido contra espécies reativas de oxigênio (ERO) e contra a metilação da histona lisina (12), diferente do nosso estudo, que mostrou que a adição de 40 µM de eugenol diminui a expansão das células do cumulus, que é um parâmetro importante para a maturação.

Já analisando os oócitos com a presença do primeiro corpúsculo polar, foi possível observar que os grupos não apresentaram diferença estatística em relação a esse parâmetro (P>0,05) (Tabela 2).

Tabela 2 –Taxa de presença do primeiro corpúsculo polar (%) após maturação *in vitro* nos grupos controle (CON) e na presença de eugenol (EUG,10;EUG,20;EUG,40;).

Tratamentos	N	CP	Retraído
CON	29	27,5% (8/29) ^a	24,1% (7/29) ^{ab}
EU10	35	37,1% (13/35) ^a	11,4% (4/35) ^b
EU20	32	31,25% (10/32) ^a	37,5% (12/32) ^a
EU40	33	27,2% (9/33) ^a	27,2% (9/33) ^{ab}

^{a,b} Valores com letras minúsculas diferentes entre colunas indicam diferença significativa (P<0,05)

O estudo de Silva et al. (12) apresentou resultados iguais ao presente estudo, pois, mesmo testando diferentes concentrações, não foi possível observar diferença estatística em relação aos oócitos com a presença do 1º corpúsculo polar (1º CP). Com relação aos oócitos com ooplasma retraído, foi identificado que qualquer concentração de eugenol não reduziu a proporção de oócitos retraídos, quando comparado ao grupo controle (CON) ($P > 0,05$) (Tabela 2). Oócitos com ooplasma retraído têm menos chances de serem fecundados e seguem o desenvolvimento embrionário normal.

Quando avaliada a taxa de estruturas clivadas, 10 μM de eugenol (EU10) não aumentou a proporção de estruturas clivadas, quando comparado ao grupo controle (CON) ($P > 0,05$). Contudo, foi observado que os grupos com as maiores concentrações de eugenol (EU20 e EU40) reduziram a proporção de estruturas clivadas ($P < 0,05$). (Tabela 3).

Diferente dos nossos resultados, Silva et al. (12) mostraram que a utilização de 40 μM de eugenol, em oócitos bovinos, promoveu maior taxa de clivagem, quando comparado aos demais tratamentos, sendo possível observar uma correlação positiva entre a taxa de clivagem e a concentração de eugenol. Diferente do nosso estudo, Oliveira et al. (11) observaram que tanto a utilização do óleo essencial de cravo-da-índia quanto a utilização do eugenol na MIV, após a FIV, promoveu melhora na taxa de clivagem.

Tabela 3 – Taxa de estruturas clivadas (%) após fecundação *in vitro* de oócitos ovinos maturados *in vitro* nos grupos controle (CON) e na presença de eugenol (EUG10; EUG20; EUG40;).

Tratamentos	N	% de estruturas clivadas
COM	125	40,0% (50/125) ^a
EU10	125	37,6% (47/125) ^a
EU20	125	20% (25/125) ^b
EU40	127	18,4 % (23/125) ^b

^{a, b} Valores com letras minúsculas diferentes entre colunas indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Santos et al. (10), ao avaliarem o desenvolvimento partenogênico de embriões bovinos após a MIV e utilizando o óleo essencial do cravo-da-índia, a concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ melhorou as taxas de blastocistos no D8, quando comparado aos outros grupos acrescidos de outras concentrações do mesmo óleo, diferente do nosso estudo que utilizou o eugenol puro e não o óleo. Os nossos resultados mostraram que a concentração de 20 e 40 μM promoveram menores taxas de estruturas clivadas, demonstrando que, para oócitos ovinos, altas concentrações de eugenol podem ser tóxicas.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a utilização de eugenol não influenciou na MIV de oócitos ovinos devido ao número experimental ser baixo. Mais estudos devem ser feitos a fim de identificar melhor como age o eugenol em oócitos ovinos.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS DA PESQUISA

Todo o conjunto de dados de apoio aos resultados deste estudo foi publicado no próprio artigo.

DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Autor 1 – Conceitualização, curadoria de dados, pesquisa, metodologia, administração do projeto e redação do manuscrito.

Autor 2 – Pesquisa e metodologia.

Autor 3 – Pesquisa e metodologia.

Autor 4 – Pesquisa e metodologia.

Autor 5 – Pesquisa e metodologia.

Autor 6 – Pesquisa e metodologia.

Autor 7 – Análise de dados, pesquisa, metodologia e redação do manuscrito.

Autor 8 – Pesquisa, metodologia e redação do manuscrito.

Autor 9 – Pesquisa e metodologia.

Autor 10 – Pesquisa e metodologia.

Autor 11 – Redação e revisão final do manuscrito.

Autor 12 – Pesquisa e metodologia.

Autor 13 - Pesquisa e metodologia.

Autor 14 – Pesquisadora supervisora responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

Autor 15 – Pesquisador supervisor responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Luedke FE, Lavach FL, Cassanta FG, Nunes LF do N, Schlotefeld C, de Paiva SM, dos Santos SI, Neves AP. Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. PESQ. AGROP. GAÚCHA. 2019;25(1/2):120-32. doi: 10.36812/pag.2019251/2120-132
2. Crocomo L, Filho W, Alvarenga F, Bicudo S. Peculiarities of oocyte harvesting for *in vitro* production of sheep embryos. Rev Bras Reprod Animal. 2012;(1):25–31.
3. Kawamoto TS, Amorim LS, Oliveira LL, Shiomi HH, Costa EP, Guimarães JD. Adição da proteína específica do oviduto de porcas (pOSP) e da melatonina em meios de maturação e o efeito na clivagem *in vitro* de embriões suínos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2016;68(6):1497–1504. doi: 10.1590/1678-4162-8597
4. Bezerra D, Militão G, de Moraes M, de Sousa D. The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. Nutrients. 2017;9(12):1367. doi: 10.3390/nu9121367
5. Santos MVO, Nascimento LE, Praxedes EA, Borges AA, Silva AR, Bertini LM, Pereira AF. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. Theriogenology. 2019;1;128:74–80. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.031
6. Freitas VJF, Melo LM. *In vitro* embryo production in small ruminants. Revista Brasileira de Zootecnia. 2010;39:409–13. doi: 10.1590/s1516-35982010001300045
7. Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. Reproduction. 2010 Jun;139(6):979–88.

8. Mezzalira A, Cucco DC, Bunn S, Cruz FB, Werlich DE, Vieira AD, Santos RM. Metodologias de desnudamento parcial de oócitos bovinos maturados e submetidos à vitrificação. 2005;31;10(2). doi: 10.5380/avs.v10i2.4425
9. Santos JDR, Batista RITP, Magalhães LC, Paula Jr. AR, Souza SS, Salamone DF, Bhat MH, Paula Jr AR, Souza SS, Salamone DF, Bhat MH, Teixeira DIA, Feitas VJ, Melo LM. Overexpression of hyaluronan synthase 2 and gonadotropin receptors in cumulus cells of goats subjected to one-shot eCG/FSH hormonal treatment for ovarian stimulation. *Animal Reproduction Science*. 2016;170:15–24. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.03.008
10. Santos MVO, Nascimento LE, Praxedes EA, Borges AA, Silva AR, Bertini LM, Pereira AF. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Theriogenology*. 2019;1;128:74–80. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.031
11. Oliveira LRMR, Aquino LVC, Santos MVO, Freitas VJF, Bertini LM, Pereira AF. Antioxidant effect of bioactive compounds isolated from *Syzygium aromaticum* essential oil on the *in vitro* developmental potential of bovine oocytes. *Livestock Science*. 2022;1;260:104932–2. doi: 10.1016/j.livsci.2022.104932
12. Silva RF, Lima LF, Ferreira ACA, Silva AFB, Alves DR, Alves BG, Oliveira AC, Morais SM, Rodrigues APR, Santos RR, Figueiredo JR. Eugenol Improves Follicular Survival and Development During *in vitro* Culture of Goat Ovarian Tissue. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022 Apr 28;9. doi: 10.3389/fvets.2022.822367

Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.