



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

ALEX ALTAIR COSTA MACHADO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS
COM AÇÃO FEROMONAL SEXUAL EM OVINOS (*Ovis aries*) DESLANADOS DA
RAÇA MORADA NOVA**

**FORTALEZA – CEARÁ
2018**

ALEX ALTAIR COSTA MACHADO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM
AÇÃO FEROMONAL SEXUAL EM OVINOS (*Ovis aries*) DESLANADOS DA RAÇA
MORADA NOVA

•

Tese apresentada ao Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. José Ferreira Nunes

FORTALEZA – CEARÁ
2018

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

Machado, Alex Altair Costa

Isolamento e identificação de compostos orgânicos voláteis com ação feromonal sexual em ovinos (*Ovis aries*) deslanados da raça Morada Nova/ Alex Altair Costa Machado — 2018.

1 CD-ROM. 1. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Rede Nordeste de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fortaleza, 2018.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Orientação: Prof. Dr. José Ferreira Nunes.

1.Ovinos. 2. compostos orgânicos voláteis. 3. Feromônio. I. Título.

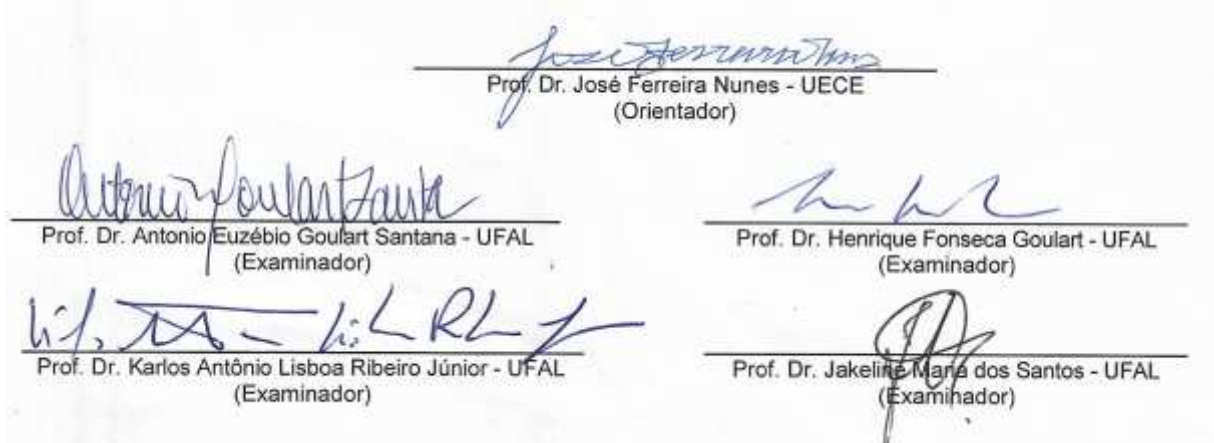
ALEX ALTAIR COSTA MACHADO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM
AÇÃO FEROMONAL SEXUAL EM OVINOS (*Ovis aries*) DESLANADOS DA RAÇA
MORADA NOVA

Tese apresentada ao Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária.

Aprovada em: 23 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Ferreira Nunes - UECE
(Orientador)

Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Santana - UFAL
(Examinador)

Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart - UFAL
(Examinador)

Prof. Dr. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior - UFAL
(Examinador)

Prof. Dr. Jakeline Maria dos Santos - UFAL
(Examinador)

Às pessoas mais importantes da minha vida:
Celeste Costa Machado (mãe), Francisco de
Lima Machado (pai, *in memoriam*) Adriana da
Silva Araújo (esposa), Vivian Celeste Araújo
Machado (filha) e Rodrigo Alex Araújo
Machado (filho).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que me concedeu nesta vida.

À toda minha família, por está sempre ao meu lado em todos os momentos e pela ausência constante durante os trabalhos.

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pela orientação.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goular Santana, pela orientação apoio e amizade.

Ao Dr. Kleibe de Moraes Silva, pela valiosa contribuição com os animais do experimento.

A Dra. Cenira Monteiro de Carvalho por compartilhar a técnica e orientação nos trabalhos de campo e a toda sua família, a qual me acolheu de braços abertos.

Ao Dr. Henrique Fonseca Goulart pela colaboração nas análises nos cromatógrafos.

À Dra. Angelina Bosi Fraga, pela colaborção na análise estatística.

Aos técnicos da EMBRAPA Caprinos e Ovinos, em especial ao amigo Gilberto Schleich, pela ajuda constante no manejo com os animais.

Aos membros da banca, pelas observações, questionamentos e críticas.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE/FAFIDAM), pela concessão do afastamento para cursar o doutorado.

À Universidade Federal de Alagoas e o Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN) do Centro de Ciências Agrárias - CECA.

À Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) pela oportunidade de realizar o curso.

À EMBRAPA Caprinos e Ovinos por ceder os animais para que o trabalho fosse realizado.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, pela concessão da bolsa.

À todos os colegas do Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN), em especial ao Me. Thyago Ribeiro Fernandes Ribeiro e Regina da Silva Acácio Melo, pela ajuda constante durante os trabalhos e pela amizade.

Aos colegas do laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia, em especial à Raisa Rodrigues Santos Rios, Marcimar Silva Sousa e Talita Soares Câmara, que muito colaboraram e sempre estiveram presente com incentivo e amizade.

A todos os que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

“O que distingue os pobres dos ricos (pessoas ou países) não é somente a posse de bens, mas o fato de a maioria deles estarem excluído da criação e dos benefícios do saber científico.”

(Declaração de Budapeste – julho de 1999)

RESUMO

A sincronização estral em animais de produção é um passo fundamental para utilização de várias biotécnicas e a melhora da eficiência reprodutiva do rebanho. A utilização de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) pode ser eficaz para realização desse procedimento sem o uso de hormônios sintéticos obtendo-se assim um rebanho que mais se aproximam da produção orgânica, que vem ganhando cada dia mais espaço no mercado. O objetivo do trabalho foi o isolamento e a caracterização química dos COVs liberados por ovinos da raça Morada Nova com ação na sincronização do estro em fêmeas em anestro. Todo experimento em campo (coleta dos voláteis dos machos e o bioensaio com as fêmeas) foram realizados com animais da EMBRAPA Caprinos e Ovinos (Sobral - CE). A etapa laboratorial foi conduzida nas instalações do Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN) do Centro de Ciências Agrárias - CECA da Universidade Federal de Alagoas (Maceió, Alagoas). Para obtenção dos COVs foram utilizados 30 machos ovinos das raças: Morada Nova (10) Santa Inês (10) e Somalis (10), que foram submetidos a extração dos COVs por metodologia previamente estabelecida. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa e três compostos foram alencados para o ensaio biológico: p-cresol, undecano e o 4-etilbenzaldeído, na proporção de 1:1:1. O ensaio biológico foi conduzido utilizando-se quarenta e duas fêmeas ovinas da raça Morada Nova dividida em dois tratamentos para indução do cio (T1 e T2), no qual T1 foi submetido ao tratamento com os COVs por via olfativa e T2 o grupo controle. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de x-quadrado a 5% de significância, os quais comprovaram eficácia da metodologia utilizada para o isolamento dos voláteis e em promover o estímulo do cio em ovinos Morada Nova, contudo outras substâncias ainda podem ser identificadas e testadas com o objetivo de potencializar a eficácia dos COVs em questão.

Palavras chave: Ovinos. Compostos orgânicos voláteis. Estro.

ABSTRACT

Estrus synchronization in production animals is a fundamental step in the use of various biotechniques and the improvement in reproductive efficiency of the herd. The use of VOCs can be effective to perform this procedure without using synthetic hormones, thus obtaining herds closer to organic production, which have been gaining more and more space in the market. The objective of this work was to isolate and chemically characterize Volatile Organic Compounds (VOCs) released by Morada Nova sheep with synchronous action of estrus in anestrous females. All field experiments (collection of male volatiles and bioassay with females) were carried out with animals from EMBRAPA Caprinos e Ovinos (Sobral - CE). The laboratory stage was conducted at the Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN) of the Centro de Ciências Agrárias - CECA of the Universidade Federal de Alagoas (Maceió, Alagoas). In order to obtain VOCs, 30 male sheep of Morada Nova (10) Santa Inês (10) and Somalis (10) breeds were used and submitted to VOC extraction by previously established methodology. The obtained extracts were analyzed by gas chromatography coupled to the mass spectrometer and three compounds were matched for the biological assay: p-cresol, undecane and 4-ethylbenzaldehyde, in a ratio of 1: 1: 1. The biological assay was conducted by using forty-two Morada Nova ovine females divided into two treatments for estrus induction (T1 and T2), in which T1 was submitted to VOC treatment by olfactory route and T2 control group. The results obtained with the bioassay were statistically analyzed by the x-square test at 5% of significance, which proved the efficacy of the methodology used to isolate the volatiles and to promote the stimulation of heat in Morada Nova sheep, although other substances could still be identified and tested in order to enhance the effectiveness of the VOCs in question.

Key words: Ovine. Volatile organic compounds. Estro.

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 13 |
| 2.1 | FEROMÔNIO..... | 13 |
| 2.1.1 | Classificação dos semioquímicos..... | 13 |
| 2.1.2 | Ação nos invertebrados..... | 14 |
| 2.1.3 | Ação nos vertebrados..... | 14 |
| 2.2 | A OVINOCULTURA..... | 15 |
| 2.3 | CICLO REPRODUTIVO EM OVELHAS DE REGIÕES TROPICAIS..... | 16 |
| 2.4 | TRATAMENTO HORMONAIIS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E OVULAÇÃO EM OVELHAS..... | 17 |
| 2.5 | EFEITO MACHO..... | 18 |
| 2.5.1 | Ação dos COVs na indução e sincronização do estro..... | 18 |
| 2.5.2 | Efeito macho como alternativa aos hormônios exógenos..... | 20 |
| 2.5.3 | Efeito macho associado ao tratamento hormonal..... | 21 |
| 3 | ANÁLISE CROMATOGRÁFICA..... | 22 |
| 3.1 | ESPECTRÔMETRO DE MASSA..... | 23 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 25 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 25 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 5 | PRIMEIRO ARTIGO PROPOSTO..... | 26 |
| 5.1 | RESUMO..... | 26 |
| 5.2 | ABSTRACT..... | 27 |
| 5.3 | INTRODUÇÃO..... | 29 |
| 5.4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 5.4.1 | Local do experimento em campo..... | 29 |
| 5.4.2 | Coleta dos compostos orgânicos voláteis (covs) dos machos..... | 31 |
| 5.4.3 | Extração laborator dos COVs dos animais..... | 31 |
| 5.4.4 | CG-FID (cromatografia gasosa com detector por ionização de chama)..... | 32 |
| 5.4.5 | CG/EM (Cromatografia gasosa acoplada ao expectômetro de massa)..... | 33 |
| 5.4.6 | Identificação dos compostos orgânicos através do sistema CG/EM..... | 34 |

| | | |
|---------|--|-----------|
| 5.5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 35 |
| 5.6 | CONCLUSÃO..... | 36 |
| 5.7 | COMITÊ DE ÉTICA..... | 37 |
| 5.8 | AGRADECIMENTOS..... | 38 |
| 5.9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 39 |
| 6 | PATENTE..... | 41 |
| 6.1 | VANTAGENS DA PATENTE..... | 43 |
| 6.2 | REIVINDICAÇÕES PATENTE..... | 44 |
| 7 | SEGUNDO ARTIGO PROPOSTO..... | 46 |
| 7.1 | INTRODUÇÃO..... | 46 |
| 7.2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 46 |
| 7.2.1 | Local do experimeto em campo..... | 46 |
| 7.2.2 | Coleta dos COVs dos machos..... | 51 |
| 7.2.3 | Extração laboratorial dos COVs dos animais..... | 52 |
| 7.2.4 | Análise no cromatógrafo gasoso..... | 52 |
| 7.2.4.1 | CG-FID (Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama)..... | 52 |
| 7.2.4.2 | CG/EM (Cromatografia gasosa acoplada ao expectômetro de massa)..... | 52 |
| 7.3 | . BIOENSÁIO COM AS FÊMEAS..... | 52 |
| 7.3.1 | Artefato liberador de feromônio ovino (ALFO)..... | 53 |
| 7.3.2 | Fêmeas utilizadas..... | 53 |
| 7.4 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 53 |
| 7.5 | RESULTADOS DISCUSSÃO..... | 57 |
| 7.6 | CONCLUSÃO..... | 57 |
| 7.7 | PERSPECTIVAS..... | 57 |
| 7.8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 57 |
| | REFERÊNCIAS..... | 58 |

1 INTRODUÇÃO

As interações sociais estabelecidas entre as diversas espécies de mamíferos, principalmente, aquelas relacionadas com a função reprodutiva, tanto no que se refere às espécies domésticas, como as de laboratório, estão embasadas em estímulos sensoriais, provenientes de membros da mesma espécie, exalados durante as interações sociais. Pistas olfativas tem-se mostrado especialmente potentes, uma vez que essas substâncias podem impactar muitas fases da vida reprodutiva de animais, incluindo a atração sexual e comportamental (KELLER et. al., 2009).

Estes efeitos são geralmente mediados por estímulos olfativos específicos, muitas vezes conhecidos como “feromônios”, cujos efeitos foram descobertos há 59 anos, pelo pesquisador Karlson e Luscher (1959). Em invertebrados, o efeito da ação dos feromonios é amplamente conhecido .

Segundo Zarbin (2009), os “feromônios” são substâncias químicas naturais classificadas como semioquímicos. Na sua essência, comportam-se como instrumentos eficazes para refinar os padrões de comportamento social, bem como, as estratégias reprodutivas em mamíferos (GUERREIRO, 2002). Uma vez que, essas substâncias parecem estar diretamente envolvidas com a sincronização do estro em fêmeas mamíferas de muitas espécies.

Neste sentido, a utilização comercial de compostos orgânicos voláteis (COVs) em programas estratégicos para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos pode se tornar uma alternativa viável e eficaz para os tratamentos de sincronização do estro em fêmeas de mamíferos minimizando a necessidade da utilização de hormônios para esse fim, uma vez que, o seu emprego contínuo resulta na formação de anticorpos pelo organismo animal, o que pode causar refratariedade a sua ação e comprometer a eficácia do tratamento, além disso, seu custo é bastante elevado.

A maioria das técnicas utilizadas para melhorar a eficiência reprodutiva depende de terapias hormonais ou uma combinação de tratamentos utilizando hormônios e fotoperíodo para induzir o estro ou sincronizar a ovulação de um rebanho. Essas técnicas, amplamente utilizadas, são justificadas para ajustar a época de reprodução com as necessidades de animais e de produtores (CHIMINEAU et al., 2008)

Apesar da necessidade de aumento da demanda no fornecimento de produtos animais para suprir a população, o grande desafio do produtor e da indústria é a obtenção de um produto de baixo custo, que atenda as exigências do consumidor, sem sua falta no mercado e que pondera os aspectos biológicos dos animais. Portanto, métodos alternativos sem o uso de

hormônios e antibióticos são hoje mais desejados, devido atender as expectativas dos produtores e consumidores (AVDI et. al., 2003).

Outro fator importante na atualidade é a grande procura por produtos orgânicos, na qual a legislação não permite a utilização de hormônios convencionais na sua produção, porém a utilização de um produto natural, a base de compostos orgânicos voláteis não iria opor a legislação preconizada. (BRUNETEAU; DOUTEAU, 2011).

Deste modo, objetiva-se por meio deste estudo proceder a identificação e o isolamento de compostos orgânicos voláteis com características feromonais sexuais coletados de machos ovinos da raça Morada Nova, bem como testar sua aplicabilidade para a sincronização do estro em fêmeas ovinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FEROMÔNIO

A interação química entre indivíduos é utilizada por muitos organismos, como meio de comunicação intraespecífica ou de espécies diferentes, para evitar predadores (REDDY et al, 2012); comportamento de alarme (SHIMANO, 2002); atrair predadores (GIUDICE et al, 2011); atração de parceiros sexuais (MORAES et al., 2005; RODSTEIN et al., 2009); manter a agregação ou dispersão (BLATT et al., 1998; ZHANG, et al., 2006); escolha do local de postura dos ovos (NAVARRO-SILVA et al., 2009) entre outros. O conhecimento da ação dessas substâncias também tem sido utilizado pelo homem para o controle comportamental de pragas, como por exemplo, a atração para armadilhas (LIU et al., 2009; KANNO et al., 2012).

2.1.1 Classificação dos semioquímicos

Segundo Zarbin e colaboradore (2009), as substâncias químicas que mediam a interação entre os organismos são chamados de semioquímicos, que podem ser divididos em aleloquímicos, quando a comunicação ocorre entre espécies diferentes, e feromônios, comunicação entre indivíduos da mesma espécie. Segundo o mesmo autor, os aleloquímicos podem ser divididos em:

- 1 – Alomônios: são aleloquímicos liberado por um organismo que induz uma resposta em um indivíduo de outra espécie, porém favorecendo o emissor.
- 2 – Cairiomônios: são aleloquímicos liberado por um organismo que induz uma resposta em um indivíduo de outra espécie, neste caso, favorecendo o receptor.
- 3 – Sinomônios: são aleloquímicos liberado por um organismo provocando, tanto no emissor como no receptor, uma resposta comportamental ou fisiológica onde ambos são beneficiados.
- 4 – Apneumônios: são aleloquímicos emitidos por uma fonte sem vida, que induzem uma reação, comportamental ou fisiológica, que favorece o receptor embora cause prejuízo a um organismo de outra espécie que entre em contato com a substância emitida.

Segundo Navaro-Silva et al. (2009), ainda fazendo parte dos aleloquímicos temos os antimônios, que são substâncias produzidas ou adquiridas por um organismo que, ao encontrar-

se com outro indivíduo de uma espécie diferente no ambiente natural, ativa no receptor uma reação de repulsão para os indivíduos emissores e receptores.

Já Guerreiro (2012), feromônios são substâncias secretadas para o ambiente por organismos, os quais provocam reações específicas em um receptor da mesma espécie.

Freitas e colaboradores (2011) classificam os feromônios da seguinte forma:

- 1 – Feromônio de agregação: substância liberada pela fêmea ou pelo macho para atrair indivíduos de ambos os sexos.
- 2 – Feromônio sexual: substância liberada pela fêmea ou pelo macho para atrair indivíduos de sexo oposto com o objetivo de copular.
- 3 – Feromônio de alarme: substância liberada por insetos sociais, indicando aos outros membros a aproximação de um inimigo.
- 4 – Feromônio de trilha: substância depositada em uma superfície por um indivíduo que é detectado por outros.

Mesmo denominado de feromônio, segundo Ohara et al. (2009), as substâncias emitidas pelos caprinos podem estimular o aumento do pico do hormônio luteinizante (LH) em fêmeas ovinas e vice-versa. Neste sentido, o feromônio caprino receberá a denominação de aleloquímico, quando estimular fêmeas ovinas.

2.1.2 Ação nos invertebrados

Em invertebrados, os aleloquímicos, assim como os ferormônios, vêm sendo isolado, identificado e caracterizado, por diversos pesquisadores (McELFRESH, et al, 2007; BENGTTSSON et al., 2010; MORAES-BLASSIOLI et al., 2012) como uma alternativa para promover atração de machos ou fêmeas, repulsão, agregação entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes, com os mais variados objetivos, sendo que em geral, utilizado para o controle comportamental de pragas.

2.1.3 Ação nos vertebrados

Nos vertebrados, os feromônios sexuais também tem sido estudado em diversas espécies de roedores (BRONSON; WHITTEN, 1968; WINANS and POWERS, 1977; JOHSTON; BRONSON, 1992; DLUZEN; RAMIREZ, 1981) elefantes (RASMUSSEN; GREENWOOD, 2003) e até em primatas (KEVERNE, 1976).

Em geral, os ciclos reprodutivos em vertebrados são espontâneos e contínuos, porém em alguns casos a presença do macho (RASMUSSEN; GREENWOOD, 2003) ou componentes presentes na urina, lã, entre outros, tem um importante papel no controle reprodutivo, tendo influências, comportamental (cio) e fisiológico (ovulação) (DLUZEN e RAMIREZ, 1981; MOMOZAWA et al., 2007).

Em muitos casos, a exposição aos feromônios pode influenciar em quase todas as fases da vida reprodutiva como a puberdade e maturação sexual, supressão do estro, interrupção da gravidez e até no parto (KELLER et al., 2009). Portanto, estudos visando o isolamento, caracterização, bem como a identificação da(s) substância(s) responsável(is) pela indução do estro, presentes nos COVs, precisam ser realizados.

2.2 A OVINOCULTURA

A ovinocultura apresenta um papel de extrema importância social e nutricional para as populações pobres no mundo, sendo esta atividade a mais recomendada para os países em sub ou em desenvolvimento, com finalidade de disponibilizar proteína animal de baixo custo. O sistema de produção de ovinos nesses países é caracterizado como criação de subsistência e de forma extensiva, sem controle reprodutivo.

No Brasil, a ovinocultura está concentrada na região nordeste. Situada próximo a Linha do Equador, esta região não apresenta sazonalidade reprodutiva, possibilitando a reprodução durante todo o ano, fato que ocorre em todas as regiões equatoriais e tropicais (HAFEZ, 2004; MORAES et al., 2008). Já em regiões de clima temperado, onde a espécie ovina apresenta sazonalidade reprodutiva, a reprodução se concentra em uma determinada época do ano, o que não acontece em regiões como no nordeste do Brasil.

Contudo, o sistema de criação predominante na região nordeste é o extensivo e sem controle na reprodução e apesar de inúmeros esforços de instituições governamentais a ovinocultura na região tem avançado em passos lentos quanto a tecnificação da criação, principalmente na área reprodutiva, devido aos altos custos do material e de mão de obra especializada.

Os hormônios utilizados na reprodução constituem um outro entrave no desenvolvimento da ovinocultura devido aos riscos de contaminação de pessoas, e também por debilitar grandemente os animais expostos a tais tratamentos, levando esses animais a contraírem doenças, principalmente às ligadas aos órgãos reprodutivos como: alterações inflamatórias no ambiente vaginal causadas pela esponja embebida com hormônio, morte

neonatal, retenção de placenta, entre outras (MANES et al., 2018). Neste sentido, novas técnicas de reprodução assistida sem a utilização de hormônios sintéticos necessitam ser adotadas na ovinocultura.

2.3 CICLO REPRODUTIVO DE OVELHAS EM REGIÕES TROPICAIS

Em zonas equatoriais e tropicais, devido a pouca variabilidade na duração da luminosidade diária, os ovinos podem reproduzir-se por todo o ano, (HAFEZ, 2004; MORAES et al., 2008). No entanto, a estacionalidade reprodutiva das ovelhas nestas regiões, na qual o Nordeste brasileiro está inserido, ocorre em virtude da baixa disponibilidade e qualidade dos alimentos no período seco (SILVA et al., 1987).

Um ciclo estral nas ovelhas tem duração média de 17 dias entre uma ovulação e a fase subsequente, variando entre 14 e 19 dias. O início do estro é considerado como o dia zero e a ovulação ocorre no terço final do estro (MORAES et al., 2008). A duração do estro varia de acordo com a idade, a raça e a estação do ano, ficando entre 18 e 72 horas, com uma média de 36 horas; a ovulação ocorre de forma espontânea entre 20 a 40 horas após o início do estro (HENDERSON; ROBINSON, 2000).

O crescimento folicular, é um processo contínuo e independente da fase do ciclo estral e assim como em outras espécies, o ciclo pode ser dividido em duas fases: a fase luteínica e a fase folicular (URIBE-VELÁSQUEZ; OBA; SOUZA, 2007; URIBE-VELÁSQUEZ; SOUZA; OSORIO, 2011). A fase luteínica vai da ovulação à luteólise, com duração aproximada de 14 dias, sendo caracterizada pela formação e permanência de um corpo lúteo (CL) neste período, produzindo progesterona (P4) de forma pulsátil, que atinge seu pico aproximadamente seis dias após a ovulação e mantém um platô até a luteólise.

Luteólise é definida como a perda de função e involução subsequente da estrutura luteal. É caracterizada por um declínio inicial de secreção de progesterona que geralmente é designada como luteólise funcional, diferente da luteólise estrutural ou morfológica que, como sugere o nome, significa a mudança subsequente na estrutura celular, como resultado de apoptoses das células luteais.

SILVA et al., 2010

Já a fase folicular compreende desde a luteólise até a ovulação, com variação de três a quatro dias, com uma média de três ondas foliculares (MORAES et al., 2008).

Na fase luteal, outros hormônios são produzidos e liberados durante o ciclo estral, tais como o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), que é produzido pelo hipotálamo e

apresenta sítio de ação na adeno-hipófise para liberar o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) o qual irá atuar diretamente nos folículos antrais que aceleram o desenvolvimento dos folículos. O hormônio 17β -Estradiol (E2) produzido pelas células da granulosa, é o hormônio responsável pelo comportamento do estro, que ocorre com a redução na concentração de P4 e o pico do Hormônio Luteinizante (LH), este também produzido pela adeno-hipófise, apresentando duas funções independentes, o rompimento do folículo ovulatório e a luteinização das camadas de células da teca e granulosa que formam o corpo hemorrágico e subsequentemente o corpo lúteo (HENDERSON; ROBINSON, 2000; MORAES et al., 2008).

2.4 TRATAMENTO HORMONAL DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E OVULAÇÃO EM OVELHAS

A multiplicação de indivíduos com características genéticas e zootécnicas desejáveis à produção, são requisitos fundamentais para aumentar a produtividade ovina, independentemente dos objetivos da criação (SOUZA, 2013). Desta forma, o conhecimento da dinâmica endócrina do ciclo estral permitiu o desenvolvimento de protocolos hormonais, isolados ou associados às técnicas de manejo, para o controle e apresentação do estro com ovulação (SOUZA, 2013). Tal controle pode ser realizado de duas formas: redução ou aumento da fase lútea mediante uso de prostaglandina ($PGF2\alpha$) ou seus análogos ou prolongamento desta fase mediante o uso de P4 ou progestágenos; pode também ser realizado pela associação das duas técnicas (NOGUEIRA et al., 2009).

O aumento na concentração plasmática de progestágenos, seguido por um declínio repentino aos níveis basais após a lise do CL ou retirada da fonte exógena, ativa o eixo hipófise-ovariano (H-O) levando a regressão dos folículos persistentes e recruta novos folículos saudáveis em um ambiente de baixas concentrações de LH e E2 (HUSEIN; ABABNEH, 2008). Os tratamentos de sincronização do estro de longo prazo (12 a 14 dias) utilizando progestágenos são amplamente aplicados em ovelhas (VINÓLES et al., 2001). Esse tipo de tratamento apresenta altas percentagens de sucesso em relação ao estro, no entanto, menor fertilidade quando comparado ao estro natural (MECHACA; RUBIANES, 2004). Karaca, Ataman e Coyan (2009), utilizando protocolos de sincronização do estro com FGA por sete e 12 dias, suplementados com 400 U.I. de eCG, descreveram taxas de fertilidade em ovelhas de 87,3 e 92,5% respectivamente, em monta natural controlada. Sousa (2014) objetivando comparar a eficiência de protocolo de curta duração (sete dias, P4, 200 U.I de eCG e luteolítico) e o

tratamento tradicional (14 dias, P4, 200 U.I de eCG), ambos com associação de progestágenos e eCG, observou taxas de estro (48,0 e 82,0%) e gestação (34,5 e 72,7%), respectivamente.

Para minimizar os efeitos negativos dos progestágenos, faz-se necessário uma aplicação de eCG, visto que, este hormônio apresenta atividade agonista ao FSH em 80%, e de 20% do LH (BARRET et al., 2004). Nas ovelhas, o eCG incrementa a taxa de ovulação pelo recrutamento dos folículos antrais mais recentes, elevando a taxa de crescimento dos mesmos ao ponto de exercer dominância na produção de E2 sobre os demais folículos (DRIANCOURT; FRY, 1992). Swelum, Alowimer e Abouheif (2015) descreveram taxas de prenhez de 62,41% e 77, 86% em estudo comparando FGA e CIDR, respectivamente, por 14 dias, e associado à 600 U.I. de eCG. No entanto, doses acima de 500 U.I. os animais produzam anticorpos anti-eCG (BARRETT et al., 2004;).

Outro artifício utilizado na sincronização do estro é o uso da $PGF2\alpha$, sendo esta produzida naturalmente pelo endométrio e está associada à luteólise do CL em ovulações sem fecundação (MORAES et al., 2008). Como alternativa para a sincronização do estro, os luteolíticos podem ser empregados para induzir uma regressão prematura do CL e interrupção da fase luteal do ciclo estral, iniciando, assim, um novo ciclo. Estudo realizado por Cox e colaboradores (2012), descreveram taxas de fertilidade de 54,5% utilizando P4, eCG e $PGF2\alpha$ em tratamento de curta duração, ficando aquém dos resultado apresentados em protocolos de longa duração sem a $PGF2\alpha$.

Um fator negativo a ser considerado em relação aos protocolos hormonais diz respeito ao fato de diversos países não permitirem mais a utilização de alguns tratamentos hormonais em animais de interesse zootécnico (SILVA et al., 2010). Por isso, a utilização de métodos naturais para induzir o estro ganha destaque e importância. Na comunidade Européia, as tendências sociais e a legislação (96/22 / CE, 2003/74 / CE e 2008/97 / CE) incentivam produtores à práticas que reduzem ou evitem completamente o uso de substâncias químicas sintéticas e hormônios (PELLICER-RUBIO et al., 2016).

2.5 EFEITO MACHO

2.5.1 Ação dos COVs na indução e sincronização do estro

Já descrito em caprinos (MAHIEU et al., 1989; VÉLIZ et al., 2002), suínos (PRUNIER; SALAÜN, 1989), elefante (THITARAM; BROWN, 2018) e outras espécies, o "efeito macho" tem sido utilizado para induzir a atividade reprodutiva em fêmeas em anestro, quando estas são

expostas aos machos por um período de aproximadamente 72h a uma semana, durante algumas horas por dia (TEJADA et al., 2017).

Secretado pelas glândulas sebáceas do carneiro, a ação dos feromônios nessa espécie ocorre através do estímulo visual, relacionado à presença física dos machos, pelo olfato e pelos órgãos vomeronasal, que conduzem o feromônio até atingirem o tálamo e o hipotálamo, estimulando a secreção de GnRH (FERREIRA-SILVA et al., 2017). Em pequenos ruminantes, como cabras e ovelhas, o chamado “efeito macho”, pode induzir nas fêmeas a saída do anestro estacional, estimulando assim a ovulação (MURATA et al., 2009; RAMÍREZ et al., 2017). O “efeito macho”, foi relatada pela primeira vez em ovelhas a mais de 70 anos atrás (BEDOS et al., 2016) e, embora a identidade química das substâncias feromonais que promovem os efeitos da presença do macho não esteja totalmente elucidada, sabe-se que sua ação estimula a produção de fatores liberadores de GnRH, que por sua vez estimula a adeno-hipófise a liberar o LH que atua de maneira determinante nos eventos reprodutivos, principalmente na ovulação, no caso de um folículo dominante (Signoret, 1991) e formação do corpo lúteo (SCARAMUZZI et al., 2006; MOMOZAWA et al., 2007; KELLER et al., 2009; MAIA, BEZERRA, 2010). No entanto, Gelez e Fabre-Nys (2006), afirmam que a ação dos COVs depende da contribuição de vários fatores como: raça, período do ano, atividade sexual do macho, visualização e vocalização do macho (CHASLES et al., 2016; MUÑOZ et al., 2017).

O uso do efeito macho na espécie ovina tem comprovação científica (Signoret, 1991; Okamura et al., 2010; Sosa et al., 2011), visto que após um período de ausência de reprodutores dentro de um rebanho, há uma dessensibilização do sistema olfativo da fêmea, que na reintrodução de machos púberes no ocorre uma estimulação reprodutiva realizada pelos compostos voláteis, os “feromônios”. Estes estímulos olfativos têm-se mostrado potentes, uma vez que essas substâncias podem impactar nas fases do ciclo reprodutiva dos animais, como já reportado, incluindo a atração sexual e comportamental em ambos os sexos (KELLER et al., 2009; CALDERÓN-LEYVA et al., 2018). Portanto, na espécie ovina, o que se conhece sobre os compostos orgânicos voláteis presentes na pele e no pelo dos machos reprodutores é que os mesmos atuam para estimular a secreção do hormônio luteinizante nas fêmeas e consequentemente a ovulação (COHEN; EINHORN; SIGNORET, 1994).

Além do efeito do macho, também ocorre o efeito “fêmea”, onde as fêmeas em estro induzem pulsos de GnRH, LH e testosterona nos machos, otimizando seu desempenho, além do efeito “fêmea/fêmea”, em que as fêmeas em estro estimulam a indução da ovulação nos animais em anestro, ocasionando em plena manifestação de estro por todas as fêmeas

submetidas à estimulação (MARTIN et al., 2004). No entanto o "efeito fêmea" não têm se mostrado eficiente pra estimular a secreção de LH.

2.5.2 Efeito macho como alternativa aos hormônios exógenos

A utilização de hormônios exógenos tem sido fortemente desencorajadas, seja por possíveis riscos à saúde ou mesmo por pressão social, principalmente na comunidade européia, que vem estimulando os consumidores a adotarem produtos livres de substâncias químicas sintéticas ou hormônios, lei 96/22 / CE, 2003/74 / CE e 2008/97 / CE. O tratamento hormonal nas fazendas orgânicas também não é permitido (2007/834 / CE e 2008/889 / CE), pois o uso contínuo de hormônios pode levar ao desenvolvimento de anticorpos, diminuindo assim a fertilidade dos animais (PELLICER-RUBIO, et al. 2016).

Um método prático para obter os mesmos objetivos alcançados pelos hormônios exógenos é o condicionamento das fêmeas em anestro ao isolamento, seguido pela introdução dos machos. Sua eficiência pode variar conforme a região, época do ano, grau de estacionalidade reprodutiva e o peso corporal das fêmeas (SKINNER et al., 2002; VÉLIZ et al., 2006). Em ovelhas, os relatos concernentes a essa técnica são muito antigos, datam do século XIX (DELGADILLO et al., 2009; BEDOS et al., 2016).

Na região nordeste do Brasil, o “efeito macho” consiste no afastamento dos carneiros das fêmeas por um período de 60 dias. Quando reintroduzidos, espera-se que após 72 horas as fêmeas comecem a entrar em cio (FONSECA, 2005). Sabe-se ainda que a secreção de feromônios pelos carneiros são andrógeno-dependente e que o contato com as fêmeas também seja importante para a produção das substâncias feromonais (CALDERÓN-LEYVA et. al., 2018)

Resultados de pesquisas têm mostrado que altas proporções de fêmeas entram em estro poucos dias após a introdução de um macho no rebanho. E este efeito é mais pronunciado quando ovelhas e carneiros estão completamente separados no período precedente à estação de monta (GILL, 2012). Este efeito só é perceptível quando o isolamento das ovelhas impede ouvir ou sentir o cheiro dos carneiros, recomendando-se uma distância mínima de 1 km entre os machos e as fêmeas (PEARCE; OLDHAM, 1988). Segundo Gordon (1999), a presença do macho induz rapidamente a mudanças no padrão de secreção da glândula pituitária induzindo na fêmea, um pico de LH. O maior ou menor desempenho sexual dos carneiros pode alterar a taxa de ovulação nas fêmeas (PERKINS; FITZGERALD, 1994). No estudo realizado por estes pesquisadores, foi observado que machos de alto desempenho sexual estimularam 17% a mais

a taxa de ovulação e que estes machos realizaram mais cortejos e que também permaneceram mais tempo junto às fêmeas. Em carneiros adultos, previamente selecionados, aqueles que foram tratados com hormônio melatonina, conseqüentemente, apresentaram maiores concentrações de testosterona e induziram maior taxa de ovulação nas fêmeas (ROSA; JUNIPER; BRYANT, 2000; ABECIA et al., 2016).

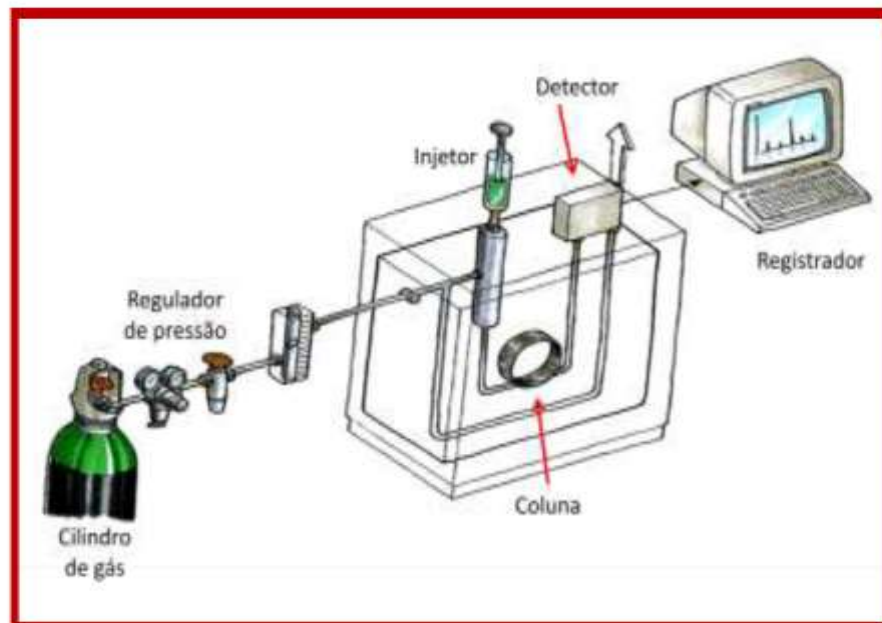
2.5.3 Efeito macho associado ao tratamento hormonal

A associação de tratamentos hormonais com o efeito macho durante uma estação reprodutiva, consiste da imediata exposição de fêmeas ao macho após a retirada da esponja impregnada de progesterona, o que acelera o início do estro (ROMANO; CHRISTIANS; CRABO, 2000). Quando se esperam 48 horas para a introdução do macho, há uma diminuição significativa de fêmeas que apresentam estro. Neste sentido, uso deste procedimento estimula um grande número de fêmeas a manifestar estro ao mesmo tempo, facilitando o manejo reprodutivo, seja por monta ou inseminação artificial (UNGERFELD et al., 2003).

3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A cromatografia gasosa surgiu em meados dos anos 50 e desde então vem sofrendo grandes modificações, melhorando assim seus resultados e sua precisão, consistindo de um método físico de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase gasosa móvel sobre um solvente estacionário. A cromatografia gasosa em seu início foi dividida em duas categorias principais: Cromatografia Gás-Líquido (CGL), neste caso, um líquido não volátil recobre um suporte inerte; e a Cromatografia Gás Sólido (CGS) (Figura 1), que emprega um sólido com grande área superficial como fase estacionária. Como a grande maioria das aplicações atuais é de CGL, essa terminologia foi abandonada, empregando-se, apenas, Cromatografia Gasosa (CG); (NETO; NUNES, 2003). A fase móvel na cromatografia gasosa trata-se de um fluxo de gases inertes. Geralmente os mais usados são: hélio, argônio, nitrogênio e hidrogênio.

Figura 1 - Esquema de como funciona a cromatografia gasosa



Fonte: http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/ig/br/like351gspgbr.nsf/docbyalias/anal_gaschrom

De uma forma geral a cromatografia gasosa é aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300°C e sejam termicamente estáveis. Os injetores cromatográficos constituem da parte onde a amostra é introduzida e podem ser realizados através da vaporização da amostra, mistura do vapor com a fase móvel ou transferência do vapor para dentro da coluna. Sendo então características desejáveis para um injetor: injeção da amostra dentro da fase móvel sem dispersão da amostra; vaporização de todos os solutos instantaneamente sem decomposição térmica; evitar difusão de componentes da amostra na fase móvel; evitar contaminação e perda da amostra (DEL GRANDE, 2008).

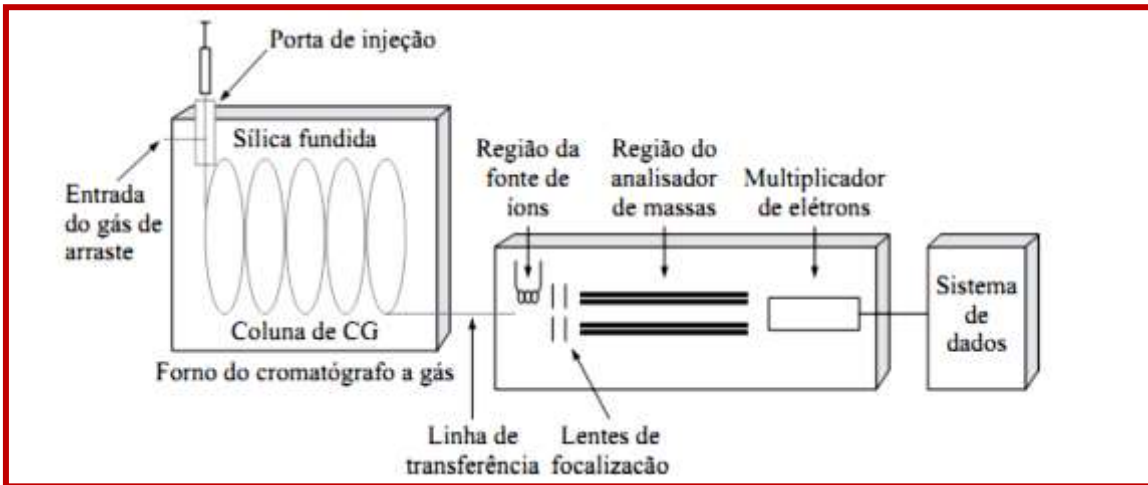
3.1 ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

O espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) de íons que são produzidos pela amostra. A maioria dos íons produzidos apresenta uma carga unitária ($Z = 1$), de forma que a maioria dos espectrometristas de massas refere-se a medida das massas dos íons quando, na verdade, a razão massa/carga que é medida (SKOOG et al., 2006).

A técnica de espectrometria de massas (Figura 2) baseia-se da separação na fase gasosa de íons provenientes ou produzidos a partir dos componentes presentes em amostras sólidas, líquidas, ou gasosas. Tipicamente, as moléculas são ionizadas com um feixe de elétrons ou com íons. Por estarem no estado gasoso, os íons formados podem ter suas trajetórias controladas por um campo elétrico e magnético. Desta forma, um íon pode ser separado de outros de acordo com a relação massa/carga (m/z), permitindo que somente íons selecionados de uma estreita faixa de massa atinjam o detector em um determinado momento (MCLAFFERTY; TURECEK, 1993).

As moléculas da amostra entram no espectrômetro de massas pelo sistema de entrada. No caso de um CG, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de CG e a baixa pressão (10^{-5} a 10^{-8} atm) do sistema do espectro de massas. Um sistema complexo de vácuo é necessário para manter a pressão baixa. As fontes de ionização para espectrometria de massas moleculares são energéticas o suficiente para quebrar ligações das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor essas moléculas em seus átomos constituintes, assim como acontece na espectrometria atômica (SKOOG et al., 2006).

Figura 2- Esquema da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas



Fonte: Skoog et. al, 2008

Após a amostra entrar no sistema de entrada do equipamento, ela vai para a fonte de ionização, onde sofrerá o bombardeamento de elétrons, produzindo íons positivos, íons negativos e espécies neutras. Os íons positivos são dirigidos para o analisador por repulsão eletrostática, chegando no analisador aonde esses íons serão separados de acordo com seus valores de m/z . Então os íons são detectados após colidirem com a superfície de um detector, essas colisões causam a liberação de elétrons, fótons ou outros íons. Estes podem ser medidos por detectores de carga ou radiação. Esses dados gerados podem ser analisados em um sistema de dados de diversas formas (SKOOG et al., 2006).

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Proceder o isolamento e a identificação química de substâncias feromonais coletadas de machos ovinos da raça Morada Nova, bem como testar sua aplicabilidade para promover a sincronização do estro em fêmeas ovinas em anestro funcional.

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Isolar substâncias feromonais, com possível efeito de sincronização de estro em fêmeas ovinas;
- b) Identificar a melhor região anatômica do macho para proceder coleta de material feromonal de reprodutores ovinos.
- c) Testar o efeito das substâncias feromonais sobre a sincronização de estro em fêmeas ovinas da raça Morada Nova

5 PRIMEIRO ARTIGO PROPOSTO

Identificação e caracterização de compostos orgânicos voláteis encontrados na pele de machos ovinos deslanados

Identification and characterization of volatile organic compounds found in the skin of male sheep woolless

Alex Altair Costa Machado, Raisa Rodrigues Santos Rios, José Ferreira Nunes, Cenira Monteiro de Carvalho, Henrique Fonseca Goulart, Antônio Euzébio Goulart Santana, Kleibe de Moraes Silva.

5.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar compostos orgânicos voláteis (COVs) de machos ovinos que possam estar envolvidos no comportamento de estro em fêmeas da mesma espécie. A coleta dos COVs foi realizada em animais criados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Caprinos e Ovinos), sendo utilizados no total de trinta machos, com idade média de três anos, sendo dez de cada uma das raças Santa Inês, Morada Nova e Somalis. A identificação dos COVs ocorreu através de técnicas cromatográficas em aparelhos instalados no Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas. O perfil cromatográfico das amostras coletadas apresentou uma centena de compostos por animal, que apresentaram uma grande similaridade entre os constituintes. Existem diferenças quanto aos COVs identificados quando se comparam as raças, não existindo porém diferença entre as regiões de coleta no animal (cabeça e dorso), e que vinte e um COVs foram comuns às três raças estudadas. Concluindo que há diferenças com relação à quantidade de COVs identificados em machos ovinos quando se comparam as raças e que foram identificados alguns compostos com características feromonais já relatados em outros trabalhos.

Palavras-chave: bioensaio, espectrometria de massa, sincronização estral.

5.2 ABSTRACT

The objective of this study was to identify volatile organic compounds (VOCs) of male sheep that may be involved in estrus behavior in females of the same species. The collection of VOCs was performed on animals raised in the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Goats and Sheep), and used a total of thirty males with an average age of three years, ten of each Santa Inês, and Morada Nova Somalis. The identification of VOCs occurred by chromatographic techniques on devices installed at the Research Laboratory of Natural Resources Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas. The chromatographic profile of the samples presented a hundred compounds per animal, which showed a great similarity between the constituents. There are differences in the identified VOCs when comparing the races, but not existing difference between the collection regions in the animal (head and back), and twenty-one VOCs were common to the three breeds studied. Concluding that there are differences regarding the amount of VOCs identified in male sheep when comparing races and some compounds that have been identified with pheromonal characteristics already reported in other studies.

Keywords: bioassay, mass spectrometry, estrus synchronization.

5.3 INTRODUÇÃO

Os sinais químicos desempenham um papel importante na reprodução e no comportamento animal. Estes sinais são geralmente mediados por estímulos olfativos específicos, muitas vezes conhecidos como “feromônios”, cujos efeitos foram descobertos há mais de cinquenta anos, pelos pesquisadores KARLSON e LUSCHER (1959).

As substâncias químicas que mediam a interação entre os organismos são chamados de semioquímicos (NORDLUND e LEWIS, 1976), que podem ainda ser classificados como infoquímicos, podendo ser subdividido em: aleloquímicos, quando a comunicação ocorre entre espécies diferentes, e feromônios, quando a comunicação ocorre entre indivíduos da mesma espécie (DICK e SABELIS, 1988).

Os feromônios são substâncias químicas naturais, que na sua essência comportam-se como instrumentos eficazes para refinar os padrões de comportamento social, bem como, as estratégias reprodutivas em mamíferos (GUERRERO, 2012), uma vez que essas substâncias parecem estar diretamente envolvidas com a sincronização do estro em fêmeas de mamíferos de muitas espécies. Em invertebrados, o efeito da ação dos feromônios é amplamente conhecido (VILELA e DELLA LUCIA, 1987).

Nos caprinos e ovinos, os feromônios produzidos pelos machos são conhecidos por estimular o sistema neuroendócrino reprodutivo das fêmeas em anestro (CHEMINEAU 1987; KNIGHT e LYNCH, 1980). A exposição de um macho a um grupo de fêmeas em anestro induz à atividade sexual por influenciar a secreção do hormônio luteinizante (LH) e a sincronização da ovulação na ovelha e na cabra (KNIGHT et al, 1978; UNGERFELD et al., 2004).

Nessas espécies de animais as amostras de urina, fezes, secreções vaginais, saliva, e glândulas odoríferas, incluindo o odor produzido nos pêlos e lã, são considerados fontes de compostos químicos com características feromonais (ALBONE 1984; ARON 1979; PATRA et al., 2012; VAN DEN HURK, 2007). Contudo, pouco ou nenhum estudo foi realizado sobre a identificação e caracterização de compostos voláteis com atuações feromonais sexuais, oriundos de machos ovinos criados e adaptados às condições climáticas da região Nordeste, como é o caso das raças Santa Inês, Morada Nova e Somalis.

Nesse sentido, um produto natural, eficaz no estímulo da glândula hipófise da fêmea e na indução de LH (GORDON, 1999; DELGADILLO et al., 2009), poderá gerar um importante avanço na reprodução animal (BRUNETEAU e DOUTEAU, 2011).

Diante da referida importância, o trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar os compostos orgânicos voláteis presentes em machos ovinos deslanados adultos. Com a

identificação dos COVs, trabalhos futuros poderão ser realizados com interferência no comportamento de estro de fêmeas, com esses compostos atuando como possíveis substâncias feromonais.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Local do experimento no campo

Todo experimento em campo (coleta dos voláteis dos machos e o bioensaio com as fêmeas) foram realizados com animais da EMBRAPA Caprinos e ovinos (Sobral - CE), situado a 03° 41' 10" de latitude sul e 40° 20' 59" de longitude Oeste, Altitude: 83m. Conforme a classificação climática de Köppen, o clima da região Norte do estado Ceará, onde está situada a Embrapa Caprinos e Ovinos é do tipo tropical (AW), quente, com médias térmicas variando de 26 a 30° C, máxima de 40°C e mínima de 26° C e umidade relativa do ar de 60%, segundo a classificação de Koeppen (SAMPAIO et al, 2011).

5.4.2 Coleta dos compostos orgânicos voláteis (covs) dos machos

Foram utilizados 30 ovinos machos adultos, sendo dez Morada Nova, dez Santa Inês e dez Somalis (Figura 3), todos com idade superior a 1,5 anos de idade, criados sob condições semi-intensiva e alimentados segundo Nutrient Requirements Council- NRC (1981) para ovinos. A mineralização foi incorporada à ração e a água fornecida *ad libitum*. O controle sanitário (anti-helmíntico e suplementação vitamínica) foi realizada conforme critérios pré-estabelecidos pela Embrapa- Caprinos e Ovinos.

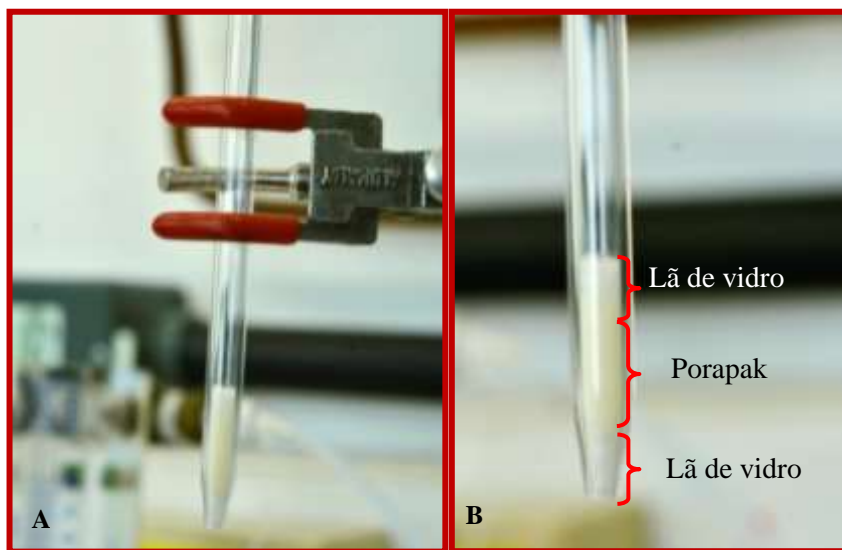
Figura 3 - Raças de ovelhas deslanada. A - Morada Nova; B - Santa Inês; C - Somalis



Fonte: Elaborado pelo autor

A coleta dos COVs ovinos foi realizada com base na metodologia descrita por Carvalho (2012), estabelecida a princípio para bovinos, adaptada para ovinos. Para tanto, foi utilizado um tubo coletor de vidro (pipeta de Pasteur) contendo 100 mg de Porapak Q (50-80 Mesh, Poole, U.K.), como adsorvente, e lã de vidro nas duas extremidades (figura 4). Em seguida esse material foi lavado com 1 ml de hexano grau HPLC e levado a uma estufa de esterilização, na temperatura de 100°C a 130 °C por uma hora para ativar o adsorvente antes do uso.

Figura. 4 - Tubo coletor de voláteis com Porapak



Fonte: Elaborado pelo autor

As amostras dos odores liberados foram coletadas no período diurno, das 8:00 às 16:30h em dois períodos anuais: Primeiro semestre (janeiro à junho) e no segundo semestre (julho a dezembro). No período de coleta os animais foram alocados em baias individuais e contidos, não permitindo a locomoção dos mesmos. As amostras foram coletadas com auxílio do tubo coletor de vidro previamente preparado, como descrito anteriormente. Para auxiliar na coleta, foi acoplada a uma das extremidades do tubo coletor uma mangueira de silicone e na outra extremidade, uma bomba de sucção (figura 5). Os tubos coletores, contendo o adsorvente, foram colocados na região dorsal e na região cefálica dos animais, com um fluxo de ar de 1000 mL/min, com objetivo de arrastar os odores dessas regiões. Para essas aerações foi estipulado o tempo mínimo de uma hora de duração. Foram coletadas também amostras do ambiente, para ser utilizado como controle. Após a aeração os tubos foram recolhidos e embalados em papel alumínio e levados ao laboratório para dessorção dos voláteis.

Figura 5 - Aeração dos voláteis dos animais. A - Região da aeração dos COVs; B - Equipamento de sucção dos voláteis.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.4.3 Extração laboratorial dos compostos orgânicos voláteis (COVs) dos animais

Para a análise dos COVs foram utilizadas as instalações e equipamentos do Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (Maceió, Alagoas).

A extração dos COVs foi realizada com um volume fixo de 1mL de hexano, grau HPLC (Vetec) e quando necessário, foram reduzidos os volumes para aproximadamente 100 μ l, por passagem de nitrogênio puro. Em seguida os COVs foram armazenado a temperatura de -20°C analisados em cromatógrafo gasoso (Figura 6.).

5.4.4 CG-FID (cromatografia gasosa com detector por ionização de chama)

As análises dos extratos orgânicos voláteis (COVs) coletados foram realizadas utilizando um cromatógrafo gasoso (GC-2010, Shimadzu) com detector por ionização de chama, equipado com coluna RTX-1 (100 % Dimetilpolisiloxano)) (30 m de comprimento, 0,25 mm). O gás de arraste foi nitrogênio. O programa de temperatura do forno foi programado para iniciar a 50 °C por 5 min, programado para subir 5°C por minuto até 180 ° C e com o tempo final de espera de 5 minutos, com um total de 46,83 minutos de tempo de operação. Um microlitro de cada amostra selecionada foi injetado no modo sem divisão; a temperatura do injector era de 200 °C e a temperatura do detector era de 270 °C. A identificação dos compostos

voláteis isolados foi realizada pelos seus índices de retenção de Kovats (KI) e a consulta subsequente nas bases de dados Pherobase e NIST. Os KIs foram determinados utilizando séries homólogas de n-alcenos normais, C7-C30 (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO), numa corrida de GC programada para temperatura, como descrito acima.

Figura 6 - Cromatógrafo Gasoso com detector FID



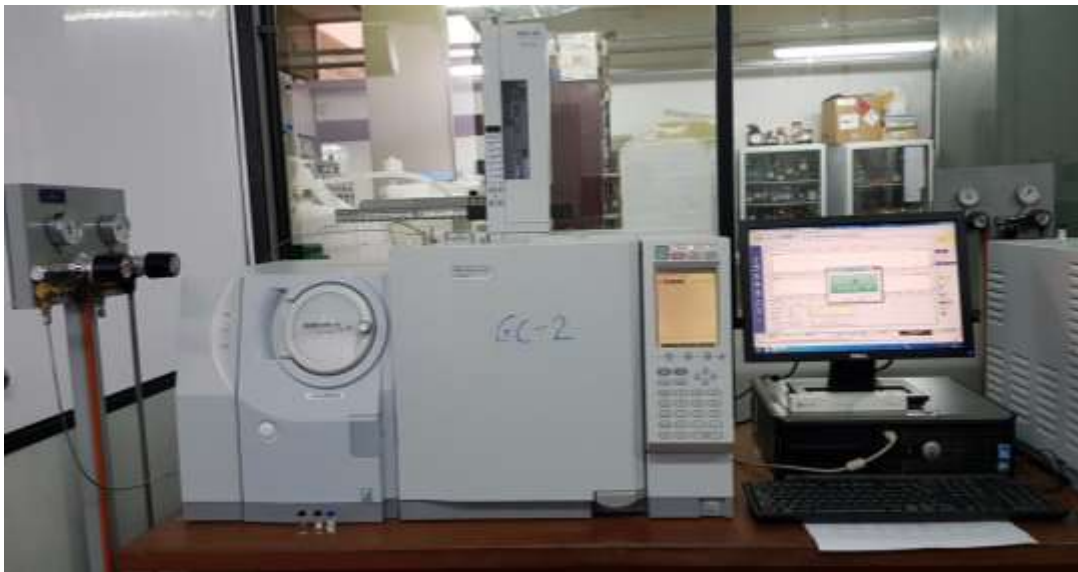
Fonte: Elaborado pelo autor

5.4.5 CG/EM (Cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa)

As amostras obtidas através das aerações foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) (Figura 7). As amostras foram injetadas no CG/EM modelo 2010 PLUS, Shimadzu, em uma coluna Nist-05 (5% Fenil, 95% Dimetilpolisiloxano) com (30 m, d. 0,25 mm). As condições do método usado foram as seguintes: injetor com a temperatura 200°C no modo Splitless(sem divisão de fluxo), a coluna iniciando com 50°C por 5 minutos, seguido por gradiente de 5°C/min até atingir 180°C, que foi mantido por 5 minutos, seguido por gradiente de 12°C/min até atingir 250°C, que foi mantido por 5 minutos. A ionização utilizada foi impacto eletrônico (EI) com 70 e V (elétrons-volts), com a temperatura do detector “ionsource” de 200 °C. A temperatura da interface foi de 250 °C, os valores de fragmentação registrados foram Scan de 35 m/z até 500 m/z e o tempo total da corrida foi 46,83minutos.

Os dados foram coletados usando o GCMS Analysis Editor. A identificação dos compostos voláteis isolados foi realizada por análise do espectro, comparação visual por meio de espectro de massa com espectro literário, observando-se principalmente as características de íon molecular e pico de base, relacionando-se com outros espectros da base computacional Wiley MS (WileyClass 5000, sexta edição) e seus índices de retenção Kovats (KI). Os KIs foram determinados utilizando séries homólogas de n-alcenos normais, C7-C30 (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO) num ciclo de GC programado a temperatura, como descrito acima. A identificação positiva foi assumida quando bons resultados de espectros de massa e KI foram alcançados. Os dados obtidos também foram comparados com várias fontes da literatura.

Figura 7 - Cromatógrafo Gasoso acoplado ao espectrômetro de massa detector (CG/EM), QP-2010 plus



Fonte: Elaborado pelo autor

As amostras coletadas foram inicialmente analisadas pela cromatografia gasosa, com a injeção 2 μ l da amostra em um cromatógrafo gasoso com detector FID (CG/FID), QP2010 plus, usando a coluna RTX-1 (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno ; 0,25 μ m diâmetro do filme; Restek) tendo o nitrogênio como gás de arraste, temperatura inicial do forno de 50 °C com uma rampa de aquecimento de 10 °C por minuto, o tempo de corrida da amostra foi de 46 minutos.

5.4.6 Identificação dos compostos orgânicos através do sistema CG/EM

Para identificação dos compostos presentes nas amostras coletadas, foram utilizados os padrões de *n*-alcanos (Sigma-Aldrich, C₇-C₃₀) para o cálculo do índice de retenção de Kóvats. Os compostos foram identificados por comparação com a biblioteca do espectro de massas através do banco de dados do programa operacional, sendo estes: Willey, NIST, por análise dos espectros de fragmentação obtidos e comparação com os bancos de dados (Pherobase e NIST).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas por CG/EM, concentraram nos compostos que apresentaram os tempos de retenção entre 5 a 45 minutos. Cerca de uma centena de COVs foram identificados, com variações nas quantidades de compostos com relação às raças estudadas. Para a raça Morada Nova foram identificados 65 COVs, para a raça Somalis 63, e para a raça Santa Inês foi determinado o maior número de COVs, 117 compostos em relação as outras raças. Contudo, apenas 21 COVs foram comuns às três raças estudadas (Tabela 1). Quanto à localização de coleta (cabeça e dorso), não foi observado nenhuma diferença entre o número de compostos encontrados entre as regiões da cabeça e do dorso dos animais, variando somente entre as raças. (Figura 8).

No presente estudo, o composto 4 metil-fenol (Figura 9) foi identificado na raça Somalis e localizado nas duas regiões de coleta (cabeça e dorso). Conforme citado posteriormente para bubalinos, este composto parece estar envolvido com o comportamento de estro nas fêmeas, sendo necessário um estudo comportamental para comprovação da atividade do mesmo em ovinos.

Alguns compostos identificados no presente estudo, já foram relatados em outros trabalhos (RAMESHKUMAR et al., 2000) que os caracterizaram como compostos com funções feromonais nas espécies bovinas e bubalinas, sendo eles os compostos: **Undecano e 4-metil-fenol (também chamado de p-cresol)**.

A maioria dos compostos que foram identificados são alcanos, cetonas, álcoois, fenóis, ácidos, aldeídos. Archunan e Rajanarayanan (2010), realizaram um estudo com a urina de vacas bubalinas, e observaram que a maioria dos compostos identificados em todas as fases do ciclo estral, foram oriundos de compostos fenólicos, alcoóis, amidas, alcanos, aldeídos, e cetonas .

Rameshkumar e colaboradores (2000), identificaram em bovinos, dois compostos específicos do estro, os compostos, iodeto de undecila e ftalato de di-n-propila. No entanto, o

ensaio comportamental indicou mais claramente que o iodeto de undecila é capaz de estimular a resposta de comportamento de monta em touros e para o coito, portanto foi considerada como um marcador bioquímico para bovinos (ARCHUNAN e RAMESHKUMAR, 2010). Neste estudo o composto Undecano foi encontrado, podendo estar envolvido no estro, porém é necessário um bioensaio para a comprovação da atividade.

Segundo ARCHUNAN e RAJANARAYANAN (2010), foram identificados quatorze compostos voláteis diferentes, presente em amostras de urina de vacas bubalinas, estes compostos foram identificados em todas as fases do ciclo estral, sendo estes compostos 2-octanona, 2-metil-N-fenil-2 propenamida, ácido decanóico, N, N-bis (2 hidroxí etil) dodecanamida, ácido tetradecanóico e ácido hexadecanóico, estes compostos foram encontrados geralmente ao longo do ciclo (pré-estro, estro, pós-estro e diestro). No entanto, os compostos 1-clorobutano, 4-metil fenol, e ácido 9-octadecenóico ocorreram somente durante o estro. O ensaio comportamental revelou ainda que os touros foram atraídos e exibiram comportamento do reflexo de Flehmen, enquanto que com o composto 4-metil fenol, os touros exibiram ereção do pênis e com o composto ácido-9-octadecanóico exibiram um comportamento de montagem. A existência de três compostos como: fenol, 3-propil fenol, e 9-octadecenal encontrados na urina, pode ser considerada como os pré indicadores de estro, é interessante notar que o fenol volátil presente na fase de pré-estro provavelmente se torna 4-metil-fenol na fase do estro na urina, por adição de um grupo metila (ARCHUNAN e RAJANARAYANAN, 2010)

Em fezes, dois compostos voláteis, o fenol e o 4-metil-trans-verbenol, foram identificados e confirmados como indicadores de estro, sugerindo que as fezes podem ser consideradas como uma fonte indicadora de estro nas búfalas (KARTHIKEYAN et al. 2013). O 4-metil-fenol (p-cresol), pode ser considerado como um composto comum específico do estro, uma vez que está presente na urina (RAJANARAYANAN e ARCHUNAN 2011), fezes (KARTHIKEYAN et al., 2013), e saliva (KARTHIKEYAN, 2011). Assim, este composto parece ser produzido sob a influência de hormônios de estro.

5.6 CONCLUSÕES

Há diferenças com relação à quantidade de COVs identificados em machos ovinos quando se comparam as raças estudadas e foram identificados alguns compostos com características feromonais já relatados em outros trabalhos.

5.7 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), com registro 5440125/2014.

5.8 AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA Caprinos e Ovinos.

Ao Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) - CECA

À FUNCAP, pela concessão da bolsa

5.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBONE E.S. **Mammalian Semiochemistry**. The investigation of chemical signals between mammals. John Wiley & Sons; 1984.

ARON C. Mechanisms of control of the reproductive function by olfactory stimuli in female mammals. **Physiology**. v. 59, p. 229–284, 1979.

ARCHUNAN G, RAJANARAYANAN S. Composition for enhancing bull sex libido. Patent No. 244991, dated December 28, 2010.

BRUNETEAU, É; DOUTEAU, É; L'effet mâle : une méthode alternative à L'utilisation des hormones exogènes. **L'égide** n°65 Dez 2011.

CARVALHO, C. M. Comportamento da Mosca dos chifres, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae) frente aos Compostos Orgânicos Voláteis de Diferentes Raças Bovinas. 2012. 94 f. Tese (Doutorado) Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Maceió, Alagoas, 2012.

CHEMINEAU P. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats—A review. **Livestock Production Science**. v.17, p .135–147, 1987.

DELGADILLO, J. A., GELEZ, H., UNGERFELD, R., HAWKEN, P. A. R., MARTIN, G. B. The ‘male effect’ in sheep and goats – Revisiting the dogmas - Review. **Behavioural Brain Research**. v. 200, p. 304 – 314. 2009.

DICKE, M.,M.W.SABELIS. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than orifin of compounds?, **Function Ecology**. v.2, p. 131-139. 1988.

GORDON, I. Controlled reproduction en sheep and goats. **Cab International**, v.2. 1999.

GUERRERO, A. Inter and intraspecificity of Chemical communication. **Chemical Ecology**, 2012. Disponível em: [http://www. Eolss.net/Eolss-sampleAllChapter.aspx](http://www.Eolss.net/Eolss-sampleAllChapter.aspx). Acessado em 03 nov 2013.

KARLOS, P.; LUSHER, M. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, v.183 p.55- 56,1959.

KARTHIKEYAN K. TIRUCHIRAPPALLI. Prediction of estrus in murrh buffao species *Bubalus bubalis* based on volatile compounds from body fluids. Ph.D. thesis, Indian, Bharathidasan University; 2011.

KARTHIKEYAN K, MUNIASAMY S, SANKARGANESH D, ACHIRAMAN S, RAMESH SARAVANAKUMAR V, ARCHUNAN G. Faecal chemical cues in water buffalo that facilitate estrus detection. **Animal Reproduction Science** v.138, p. 163–167, 2013.

KNIGHT T.W, LYNCH P.R. Source of ram pheromones that stimulate ovulation in the ewe. **Animal Reproduction Science** v.3,p. 133–136, 1980.

KNIGHT T.W, PETERSON A.J, PAYNE E. The ovarian and hormonal response of the ewe to stimulation by the ram early in the breeding season. *Theriogenology*. v.10, p. 343–353, 1978.

NORDLUND, D.A., W, J., LEWIS. Terminology of chemical- releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal Chemical Ecology**. v.2, p.211-220. 1976.

PATRA M.K, BARMAN P, KUMAR H. Potential application of pheromones in reproduction of farm animals—A review. **Agriculture Review**. v.33, p. 82–86, 2012.

RAJANARAYANAN S, ARCHUNAN G. Identification of urinary sex pheromones in female buffaloes and their influence on bull reproductive behaviour. **Research Veterinary Science**. v.91, p.301–305, 2011.

RAMESHKUMAR K, ARCHUNAN G, JEYARAMAN R, NARASIMHAN S. Chemical characterization of bovine urine with special reference to estrus. **Veterinary Research Commun** v.24, p. 445–454, 2000.

UNGERFELD R, DAGO A.L, RUBIANES E, FORSBERG M. Response of anestrus ewes to the ram effect after follicular wave synchronization with a single dose of estradiol-17 beta. **Reproduction Nutrition Development**. v.44, p. 89–98, 2004.

VAN DEN HURK R. Zeist: Pheromone Information Centre; Brugakker, Netherlands: 2007. Intraspecific chemical communication in vertebrates with special attention to its role in reproduction.

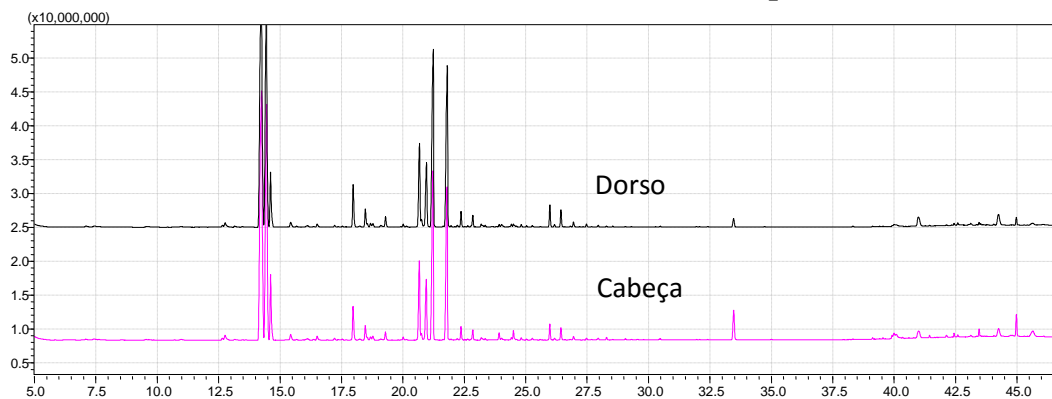
VILELA, E. F. & DELLA LUCIA, T. M. C. 1987. Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Viçosa, Imprensa Universitária. p.155

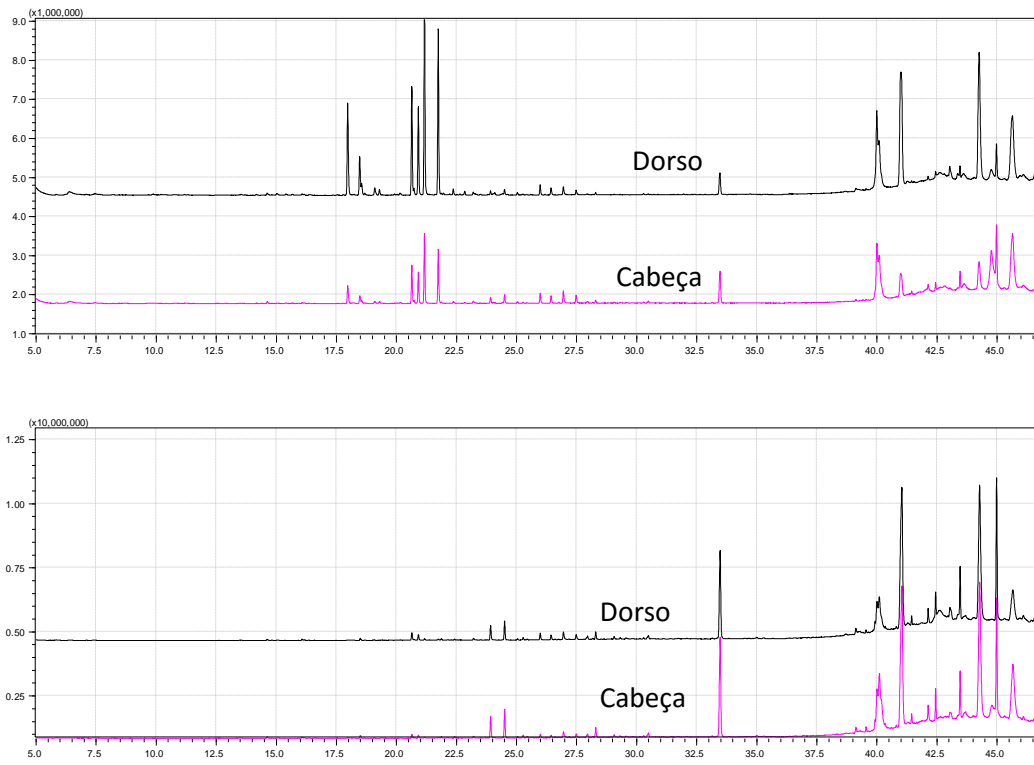
Tabela 1 - compostos orgânicos voláteis (COVs) comuns às três raças ovinas deslanadas Santa Inês, Morada Nova e Somalis, identificados após a espectrometria de massas encontrados na região da cabeça e dorso, com os respectivos tempos de retenção e KIs.

| Tempo de retenção | KI | Nome do composto |
|-------------------|------|---|
| 14615 | 1059 | 3,7-dimetildecano |
| 16070 | 1100 | Undecano |
| 20635 | 1241 | 4-(1-hidroxietil)benzaldeído |
| 21865 | 1281 | 4,6-dimetildodecano |
| 22425 | 1300 | Tridecano |
| 22850 | 1315 | Benzenopropanoato de 3-fenil-2 propenila |
| 25275 | 1400 | n-tetradecano |
| 25980 | 1426 | 1,4-diacetilbenzeno |
| 27480 | 1482 | Ácido α -hidroxi- α -metil-benzoacético |
| 28165 | 1508 | 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-fenol |
| 28170 | 1529 | Triclorooctadecilsilano |
| 28295 | 1513 | Butil- hidroxitolueno |
| 29050 | 1543 | Heneicosano |
| 39540 | 1925 | Hexadecanoato de metila |
| 40000 | 1952 | Hexacosano |
| 40335 | 1972 | Butil-heptadecil sulfuroso |
| 42435 | 2122 | Octadecanoato de metila |
| 43465 | 2200 | Docosano |
| 44970 | 2299 | Pentacosano |
| 45960 | 2354 | 14- β -H-pregna |
| 46085 | 2360 | Eicosano |

Fonte: Elaborado pelo autor

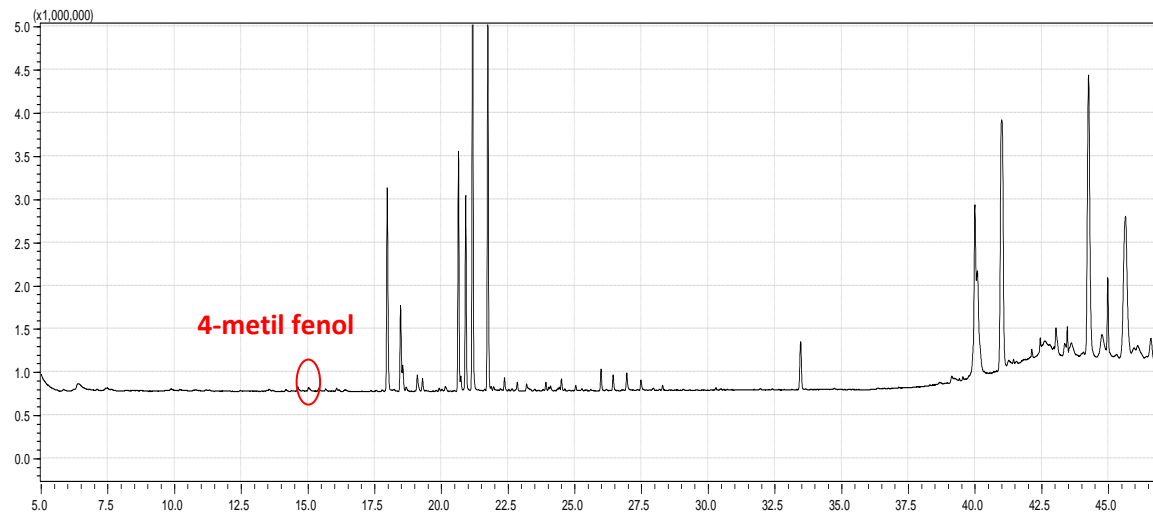
Figura 8 - perfis cromatográficos das regiões (cabeça e dorso) dos animais da raça Santa Inês, Somalis e Morada Nova, respectivamente.





Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9 - perfil cromatográfico do animal da raça Somalis, localizando o composto 4 metil-fenol na região do dorso.



Fonte: Elaborado pelo autor

6 PATENTE



10/10/2018 870180139844
12-37



29409161810066718

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 070891 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Ação de Feromônio sexual de ovinos (*Ovis aries*) deslanados

Resumo: A sincronização estral em animais de produção é um passo fundamental para utilização de várias biotécnicas e a melhora na eficiência reprodutiva do rebanho. O objetivo da referente invenção é encontrar a composição química do feromônio sexual de machos ovinos deslanados da raça Morada Nova ao estímulo do comportamento de cio nas fêmeas ovinas, simulando assim, o efeito macho. A utilização de compostos orgânicos voláteis(COVs) pode ser eficaz para sincronização de estro sem o uso de hormônios sintéticos obtendo-se assim um rebanho que mais se aproximam da produção orgânica, que vem ganhando cada dia mais espaço no mercado. Foram coletados os COVs de 30 ovinos machos, sendo dez animais das respectivas raças Morada Nova, Santa Inês e Somalis, pertencentes a EMBRAPA Caprinos e Ovinos, localizada em Sobral, Ceará. As análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de Pesquisa de Recursos Naturais (LPqRN), utilizando técnicas cromatograficas e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, após essas análises foram identificados três compostos presentes em todas as raças estudadas. Os compostos identificados foram:undecano, p-cresol e 4 etilbenzaldeído. Para o bioensaio comportamental foram utilizadas 42 fêmeas ovinas da raça Morada Nova, sendo divididas em dois grupos de tratamento.

6.1 VANTAGENS DA PATENTE

O uso de feromônios e conseqüentemente a redução na utilização de hormônios sintéticos são desejáveis para a obtenção de produtos, de melhor qualidade e maior valor agregado, constituindo assim uma prática com respeito ao bem está animal. A vantagem ecológica dessa invenção é proporcionada pelo uso de uma substância feromonal que é específica, interferindo assim somente na espécie alvo, não atingindo outros organismos, nem mesmo quem esteja manipulando o produto.

Atualmente, o manejo reprodutivo para sincronização do cio em ovelhas ocorre com o uso de hormônios sintéticos. O referido produto é útil para estimular o cio em ovelhas em anestro sem fazer uso de qualquer tipo de hormônio sintético nem do uso do macho ("efeito macho").

Uma das principais vantagens da formulação do feromônio sexual em questão, está na eficiência da técnica em função de não precisar de mão de obra especializada, da obtenção de resultados semelhantes ao "efeito macho", não causar nenhum tipo de contaminação no animal, não contaminar o ambiente e de um baixo custo. O uso da invenção proposta nesse relatório mostrou-se eficiente em promover um cio funcional e conseqüentemente gestações bem sucedidas.

Outra vantagem do produto apresentado neste relatório é que o mesmo contribui para o desenvolvimento sustentável por ser uma técnica ecologicamente correta, que viabiliza o estímulo ao cio dos ovinos da raça Morada Nova de maneira saudável sem causar contaminação da carne ou seus derivados, constituindo assim uma produção orgânica.

6.2 REIVINDICAÇÕES

- 1 - Formulação de Feromônio sexual, eficaz para o estímulo do cio em ovinos deslanados (*Ovis aries*) caracterizado por compreender uma combinação de: p- cresol, undecano e 4-etilbenzaldeído.
- 2 - Formulação de Feromônio sexual, eficaz para o estímulo do cio em ovinos deslanados (*Ovis aries*) de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pela razão entre os componentes p-cresol, undecano e 4-etilbenzaldeído variando na proporção 1:1:1 a 20:20:20, respectivamente.
- 3 - Formulação de Feromônio sexual, eficaz para o estímulo do cio em ovinos deslanados (*Ovis aries*) de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas por se apresentarem na forma líquida, seja na forma em suspensão ou gel, ou, na forma sólida por se apresentarem micronizada em pó ou em grânulos.
- 4 - Formulação de Feromônio sexual, eficaz para o estímulo do cio em ovinos deslanados (*Ovis aries*) de acordo com a reivindicação 1 a 3, caracterizadas por serem usadas em qualquer forma de aplicação nessa espécie.

7 SEGUNDO ARTIGO PROPOSTO

AVALIAÇÃO DE UMA VARIAÇÃO DE FEROMÔNIO OVINO (*Ovis aries*) PARA O USO NA SUBSTITUIÇÃO DO EFEITO MACHO

INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil têm seu maior rebanho na região Nordeste e Sul, respectivamente. No entanto, apesar de possuir o maior rebanho, a região Nordeste apresenta problemas com a produtividade, pois a limitação climática, imposta por um período seco e animais com baixos índices reprodutivo. (SILVA et. al., 2011).

No Nordeste brasileiro, a ovinocultura está bastante arraigada à cultura, porém a maioria dos ovinocultores ainda mantém um perfil de subsistência. Dentre essa grande maioria, alguns, que conseguem produção excedente não a obtém com qualidade satisfatória. E, a demanda crescente por proteína de origem animal exige que os sistemas produtivos sejam mais eficientes. A intensificação no Nordeste e na região central do país tem impulsionado uma demanda de novas técnicas de manejo para maximização da produção de cordeiros (RIBEIRO, 2011).

Biotécnicas reprodutivas simples como sincronização do estro e inseminação artificial (IA), pode ser uma alternativa viável para impulsionar a ovinocultura na região (MORAES et. al., 2008). No entanto, essas biotécnicas, em geral, fazem uso de hormônios sintéticos os quais têm causado distúrbios reprodutivos oriundos da utilização desses hormônios exógenos. Outro fato, é a crescente procura por alimentos orgânicos, que têm levado os produtores a buscar alternativas saudáveis e que cause menor sofrimento aos animais (ZHU et. al., 2017).

O "efeito macho" tem sido uma alternativa limpa, de baixo custo e sem a necessidade de mão de obra qualificada, principalmente quando associada ao uso de prostaglandina (PGF 2α) (ALAVEZ-RAMÍREZ, 2016). O Efeito macho também vem sendo utilizado para diminuir o tempo entre os partos, potencializando assim os animais de reprodução (FERREIRA E SILVA et. al., 2017).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar uma variação de substâncias feromonais extraídas do ovinos, para testar sua eficácia em promover o "efeito macho".

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.2 - Local do experimento no campo

Todo experimento em campo (coleta dos voláteis dos machos e o bioensaio com as fêmeas) foram realizados com animais da EMBRAPA Caprinos e ovinos (Sobral - CE), situado a 03° 41' 10" de latitude sul e 40° 20' 59" de longitude Oeste, Altitude: 83m. Conforme a classificação climática de Köppen, o clima da região Norte do estado Ceará, onde está situada a Embrapa Caprinos e Ovinos é do tipo tropical (AW), quente, com médias térmicas variando de 26 a 30° C, máxima de 40°C e mínima de 26° C e umidade relativa do ar de 60%, segundo a classificação de Koeppen (SAMPAIO et al, 2011).

7.1.3 - Coleta dos compostos orgânicos voláteis (COVs) dos machos

Foram utilizados 30 ovinos machos adultos, sendo dez Morada Nova, dez Santa Inês e dez Somalis (Figura 10), todos com idade superior a 1,5 anos de idade, criados sob condições semi-intensiva e alimentados segundo Nutrient Requeriments Council- NRC (1981) para ovinos. A mineralização foi incorporada à ração e a água fornecida *ad libidum*. O controle sanitário (anti-helmíntico e suplementação vitamínica) foi realizada conforme critérios pré-estabelecidos pela Embrapa- Caprinos e Ovinos.

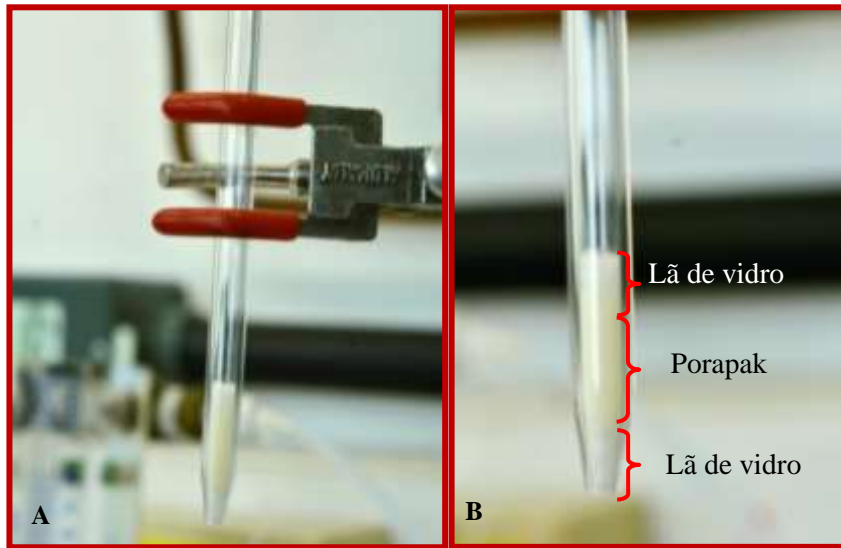
Figura 10 - Raças de ovelhas deslanada. A - Morada Nova; B - Santa Inês; C - Somalis



Fonte: Elaborado pelo autor

A coleta dos COVs ovinos foi realizada com base na metodologia descrita por Carvalho (2012), estabelecida a princípio para bovinos, adaptada para ovinos. Para tanto, foi utilizado um tubo coletor de vidro (pipeta de Pasteur) contendo 100 mg de Porapak Q (50-80 Mesh, Poole, U.K.), como adsorvente, e lã de vidro nas duas extremidades (figura 11). Em seguida esse material foi lavado com 1 ml de hexano grau HPLC e levado a uma estufa de esterilização, na temperatura de 100°C a 130 °C por uma hora para ativar o adsorvente antes do uso.

Figura. 11 - Tubo coletor de voláteis com Porapak



Fonte: Elaborado pelo autor

As amostras dos odores liberados foram coletadas no período diurno, das 8:00 às 16:30h em dois períodos anuais: Primeiro semestre (janeiro à junho) e no segundo semestre (julho a dezembro). No período de coleta os animais foram alocados em baias individuais e contidos, não permitindo a locomoção dos mesmos. As amostras foram coletadas com auxílio do tubo coletor de vidro previamente preparado, como descrito anteriormente. Para auxiliar na coleta, foi acoplada a uma das extremidades do tubo coletor uma mangueira de silicone e na outra extremidade, uma bomba de sucção (figura 12). Os tubos coletores, contendo o adsorvente, foram colocados na região dorsal e na região cefálica dos animais, com um fluxo de ar de 1000 mL/min, com objetivo de arrastar os odores dessas regiões. Para essas aerações foi estipulado o tempo mínimo de uma hora de duração. Foram coletadas também amostras do ambiente, para ser utilizado como controle. Após a aeração os tubos foram recolhidos e embalados em papel alumínio e levados ao laboratório para dessorção dos voláteis.

Figura 12 - Aeração dos voláteis dos animais. A - Região da aeração dos COVs; B - Equipamento de sucção dos voláteis.



Fonte: Elaborado pelo autor

7.1.4 - Extração laboratorial dos compostos orgânicos voláteis (COVs) dos animais

Para a análise dos COVs foram utilizadas as instalações e equipamentos do Laboratório de Pesquisa e Recursos Naturais (LPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (Maceió, Alagoas).

A extração dos COVs foi realizada com um volume fixo de 1mL de hexano, grau HPLC (Vetec) e quando necessário, foram reduzidos os volumes para aproximadamente 100 µl, por passagem de nitrogênio puro. Em seguida os COVs foram armazenado a temperatura de -20°C analisados em cromatógrafo gasoso (Figura 13.).

7.1.5 análise no cromatógrafo gasoso

7.1.5.1 CG-FID (Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama)

As análises dos extratos orgânicos voláteis (COVs) coletados foram realizadas utilizando um cromatógrafo gasoso (GC-2010, Shimadzu) com detector por ionização de chama, equipado com coluna RTX-1 (100 % Dimetilpolisiloxano) (30 m de comprimento, 0,25 mm). O gás de arraste foi nitrogênio. O programa de temperatura do forno foi programado para iniciar a 50 °C por 5 min, programado para subir 5°C por minuto até 180 ° C e com o tempo final de espera de 5 minutos, com um total de 46,83 minutos de tempo de operação. Um microlitro de cada amostra selecionada foi injetado no modo sem divisão; a temperatura do injector era de 200 °C e a temperatura do detector era de 270 °C. A identificação dos compostos

voláteis isolados foi realizada pelos seus índices de retenção de Kovats (KI) e a consulta subsequente nas bases de dados Pherobase e NIST. Os KIs foram determinados utilizando séries homólogas de n-alcenos normais, C7-C30 (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO), numa corrida de GC programada para temperatura, como descrito acima.

Figura 13 - Cromatógrafo Gasoso com detector FID



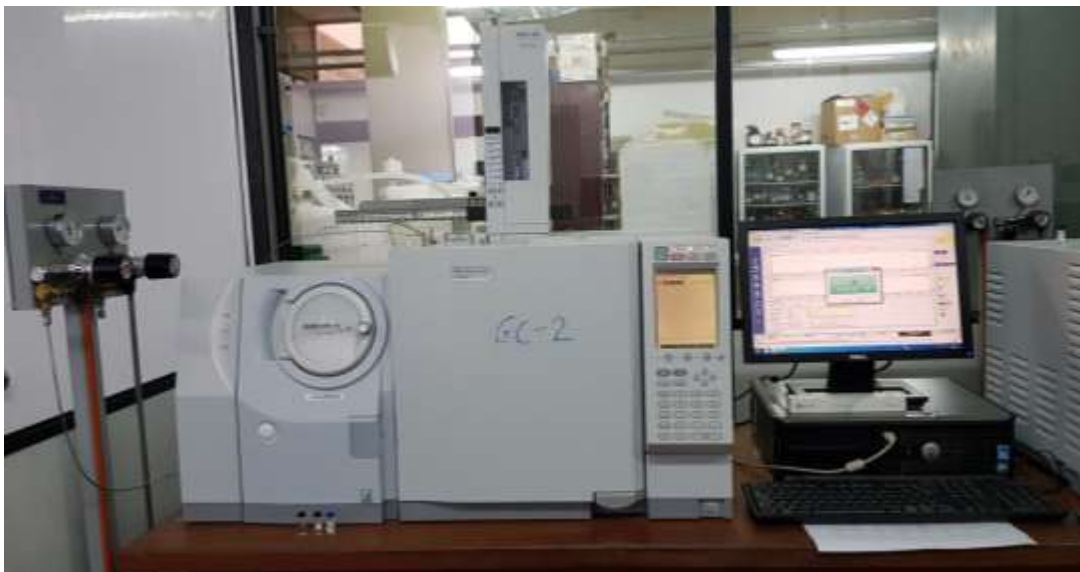
Fonte: Elaborado pelo autor

7.1.5.2 CG/EM (Cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa)

As amostras obtidas através das aerações foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) (Figura 14). As amostras foram injetadas no CG/EM modelo 2010 PLUS, Shimadzu, em uma coluna Nist-05 (5% Fenil, 95% Dimetilpolisiloxano) com (30 m, d. 0,25 mm). As condições do método usado foram as seguintes: injetor com a temperatura 200°C no modo Splitless(sem divisão de fluxo), a coluna iniciando com 50°C por 5 minutos, seguido por gradiente de 5°C/min até atingir 180°C, que foi mantido por 5 minutos, seguido por gradiente de 12°C/min até atingir 250°C, que foi mantido por 5 minutos. A ionização utilizada foi impacto eletrônico (EI) com 70 e V (elétrons-volts), com a temperatura do detector “ionsource” de 200 °C. A temperatura da interface foi de 250 °C, os valores de fragmentação registrados foram Scan de 35 m/z até 500 m/z e o tempo total da corrida foi 46,83 minutos.

Os dados foram coletados usando o GCMS Analysis Editor. A identificação dos compostos voláteis isolados foi realizada por análise do espectro, comparação visual por meio de espectro de massa com espectro literário, observando-se principalmente as características de íon molecular e pico de base, relacionando-se com outros espectros da base computacional Wiley MS (WileyClass 5000, sexta edição) e seus índices de retenção Kovats (KI). Os KIs foram determinados utilizando séries homólogas de n-alcenos normais, C7-C30 (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO) num ciclo de GC programado a temperatura, como descrito acima. A identificação positiva foi assumida quando bons resultados de espectros de massa e KI foram alcançados. Os dados obtidos também foram comparados com várias fontes da literatura.

Figura 14 - Cromatógrafo Gasoso acoplado ao espectrômetro de massa detector (CG/EM), QP-2010 plus



Fonte: Elaborado pelo autor

7.2 BIOENSAIO COM FÊMEAS

7.2.1 Artefato liberador de feromônio ovino (ALFO)

Os feromônios são substâncias altamente voláteis, produzidas por glândulas específicas e liberadas paulatinamente. Para simular a liberação dos COVs isolados dos ovinos, foi confeccionado um artefato específico para este fim, ALFO (Figura 15. a). Para isso, foi utilizado mangueira de silicone com diâmetro apropriado e perfurado em vários pontos para facilitar a liberação dos COVs. O interior foi preenchido com algodão e nas extremidades da mangueira foram colocadas presilhas metálicas para evitar a perda do material. Em seguida, um barbante resistente foi utilizado para prende-las em volta do pescoço dos animais (figura 15 b).

Figura 15 - Artefato liberador de feromônio ovino (ALFO)



Fonte: Elaborado pelo autor

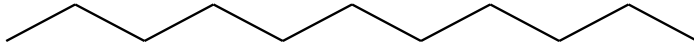
7.2.2 Fêmeas utilizadas

Foram utilizadas 42 fêmeas ovinas da raça Morada Nova, onde as mesmas foram mantidas isoladas dos machos por dois meses (60 dias). Essas ovelhas foram divididas em dois grupos (T1 e T2) de maneira randômica, separados por uma área de aproximadamente dez metros, para em seguida serem submetidas ao tratamento com os COVs, oriundo dos machos ovinos da seguinte maneira:

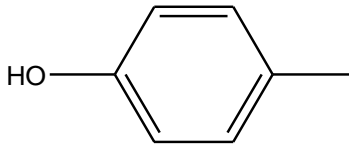
T1: 22 fêmeas que não receberam o tratamento, tornando-se assim o grupo controle;

T2: 20 que foram submetidas ao tratamento com os COVs ovino por via olfativa, utilizando um artefato desenvolvido para este fim (figura. 8), de acordo com o seguinte protocolo:

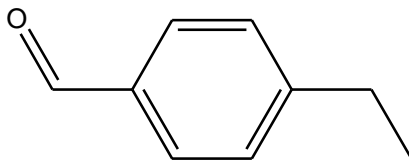
- Undecano, Concentração Molar = 9×10^{-5} , peso = 4,68mg/3mL de hexano;



- p-cresol, Concentração Molar = 9×10^{-5} , peso = 3,24mg/3mL de hexano;



- 4-etilbenzaldeído, Concentração Molar = 9×10^{-5} , peso = 4,02mg/3mL de hexano.



Os três COVs isolados dos machos ovinos, nas referidas concentrações descritas acima, foram misturados na proporção de 1:1:1 e em seguida foi utilizado 40 μ L da referida mistura no chumaço de algodão colocado dentro do artefato confeccionado. Esse procedimento foi realizado em metade dos animais do tratamento 2 (T2) e repetido em dias alternados durante 30 dias.

Ao longo dos 30 dias do experimento, uma fêmea androgenizada com 1 mL de 17-beta estradiol (gonadiol) era colocada durante cinco minutos no período da manhã e cinco minutos durante a tarde, entre as fêmeas dos dois grupos (T1 e T2) para verificar o comportamento de cio. Comprovado o cio, a fêmea era submetidas à monta natural e na sequência, após 35 dias era realizado a ultrasonografia para avaliação da taxa de fecundação e em seguida a taxa de nascimento.

7.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os animais testados (que utilizaram a substância) e o grupo testemunha (sem a substância), foi realizado pelo software "R", utilizando o teste do Qui Quadrado (X^2) com correção de continuidade de Yates. Para comparação entre as taxas de cobertura e a taxa de parição entre o ano de **2016**, que teve a utilização do uso dos COVs, e os

anos (2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 e 2017) que não tiveram exposição das ovelhas aos COVs, utilizando-se apenas o efeito macho, foi utilizado o teste do χ^2 ($P < 0,05$) para dar respaldo estatístico à resposta, utilizando-se o software R 3.4.0 (R core Team 2017).

7.4 RESULTADOS DISCUSSÃO

A tabela 2, mostra os COVs mais comuns nas três raças de ovinos (Morada Nova - MN: 10 animais; Santa Inês - SI: 10 animais e Somalis - SM: 10 animais), coletados no período seco e chuvoso. Foi considerada a presença do composto quando este esteve presente no mínimo em seis animais em cada raça.

O 4-etilbenzaldeído foi alencado para ser testado como uma possível substância feromonal, por ter sido encontrada na maioria dos animais nas três raças coletadas (pelo menos em seis) e por apresentar um grupamento etil específico, identificado em várias substâncias (MURATA, et al, 2014). Estes componentes com etil específicos, também já foram encontrado em foromônios de outros animais, como no jacarés (Krückert et al, 2006). Já o p-Cresol e o Undecano, foram escolhido por já terem sido identificados em outros animais, já discutido anteriormente.

Tabela 2 Lista dos COVs presentes em uma das três raças de ovinos deslanados: MN, SI e SM

| | T.R | KI | Composto | MN | SI | SM |
|-----------|---------------|--------------|---|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 6.577 | 841 | CYCLOPENTANONE, 3-METHYL- (CAS) 3-METHYLCYCLOPENTANONE | X | | |
| 2 | 7.036 | 854 | ETHYLBENZENE | | | X |
| 3 | 13.376 | 1.024 | 2-ETHYL-1-HEXANOL | X | X | |
| 4 | 13.401 | 1.025 | 1-LIMONENE | | | X |
| 5 | 14.546 | 1.057 | DODECANE (CAS) N-DODECANE | X | X | |
| 6 | 16.004 | 1.098 | NONANAL | | | X |
| 7 | 17.895 | 1.155 | 4-ETHYLBENZALDEHYDE | X | X | X |
| 8 | 18.495 | 1.173 | 2-PROPENAL, 3-PHENYL- | X | | |
| 9 | 18.615 | 1.177 | NAPHTHALENE (CAS) WHITE TAR | | X | |
| 10 | 20.569 | 1.239 | 4-(1-HYDROXYETHYL) BENZALDEHYDE | X | | X |

| | | | | | | |
|----|--------|-------|---|---|---|---|
| 11 | 20.836 | 1.248 | BENZENEMETHANOL, 4-(1-METHYLETH | X | X | X |
| 12 | 21.096 | 1.256 | 3-ETHYLACETOPHENONE | X | X | X |
| 13 | 21.671 | 1.275 | 4-ETHYLACETOPHENONE | X | ? | ? |
| 14 | 25.921 | 1.424 | ETHANONE, 1,1'-(1,3-PHENYLENE)BIS- | X | X | X |
| 15 | 26.378 | 1.441 | ETHANONE, 1,1'-(1,4-PHENYLENE)BIS- | X | X | X |
| 16 | 33.385 | 1.707 | OXALIC ACID, CYCLOHEXYLMETHYL TRIDECYL ESTER | | | X |
| 17 | 39.905 | 1.946 | PENTACOSANE | X | | |

Fonte: Elaborado pelo autor

Os COVs selecionados (Undecano, P-cresol e 4-Etilbenzaldeído) foram misturados na proporção de 1:1:1 e utilizados para induzir o estro em fêmeas de ovelhas da raça Morada Nova em anestro, após dois meses afastadas dos machos. Foram utilizadas 42 fêmeas divididas aleatoriamente em dois grupos: Com COVs presos a região do pescoço (desafio) e sem COVs na região do pescoço (testemunho). Esses dois grupos ficaram separados por uma distância de 10 metros em um ambiente de contenção de aproximadamente 30m² e foram obtidos os seguintes resultados, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Resultado do teste com os COVs em ovelhas fêmeas em anestro após sessenta dias separadas dos machos.

| | Com COVs | Sem COVs/Controle | Total |
|----------------------|-----------|-------------------|-----------|
| Não apresentaram Cio | 4 | 7 | 11 |
| Apresentaram Cio | 16 | 15 | 31 |
| Total | 20 | 22 | 42 |

Fonte: Elaborado pelo autor

Apesar da pequena diferença numérica entre os dois grupos, eles não diferiram significativamente, pois o χ^2 calculado foi menor que o tabelado sendo inferior a 10% de probabilidade e, portanto, a média do número de ovelhas que apresentaram cio com o uso dos COVs não diferiu significativamente do número de ovelhas que não foram expostas aos COVs.*- Essa semelhança provavelmente tenha acontecido devido ao fato dos dois grupos de animais estarem próximos demais, levando o grupo sem os COVs a sentirem o cheiro dos COVs dos animais com que estavam com ele, pois segundo Pearce e Oldham, (1998), a distância recomendada para não sentir o cheiro dos machos é de um quilômetro. Já Okamura et al, (2010) e Bedos et al, (2016), afirmam que é bem conhecido que o odor do macho é a característica

sensorial mais importante para a indução do cio nas fêmeas. Ainda com relação a distância, MOEINI et al. (2015), testou a distância de 1; 12,5; 25 e 50 metros de distância entre fêmeas em anestro e machos e verificou estímulo mais efetivo nas curtas distâncias (1 e 12,5m) quando comparado a distâncias maiores (25 e 50m).

A tabela 4 mostra a comparação da taxa de parição dos ovinos Morada Nova no ano de 2016, quando foi utilizado os COVs isolados, com os anos de 2010 - 2017, onde foi utilizado somente o macho para promover o cio nas fêmeas.

Tabela 4. Dados reprodutivos das ovelhas Morada Nova de 2010 - 2017

| | 2017 | 2016 | 2015 | 2014 | 2013 | 2012 | 2011 | 2010 |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Total de Fêmeas Expostas | 42 | 53 | 57 | 74 | 66 | 53 | 71 | 76 |
| Total Fêmeas Coberta | 42 | 44 | 55 | 74 | 66 | 53 | 69 | 76 |
| Total de parto | 37 | 41 | 45 | 58 | 56 | 50 | 62 | 70 |
| Taxa de parição | 88,09 | 93,18 | 81,82 | 78,38 | 84,85 | 94,34 | 89,86 | 92,11 |

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Tabela 5 Comparação entre o grupo de ovelhas MN que utilizaram a substância feromonal pra induzir o cio, com as ovelhas MN nos outros anos, porém utilizando o "efeito macho".

| Variável | 2017 | 2016 | 2015 | 2014 | 2013 | 2012 | 2011 | 2010 |
|--------------------------|------|------|-------|-------|------|-------|------|------|
| Total de Fêmeas Expostas | 42 | 20 | 57 | 74 | 66 | 53 | 71 | 76 |
| Não paridas | 5 | 3 | 12 | 16 | 10 | 3 | 9 | 6 |
| Total de parto | 37 | 17 | 45 | 58 | 56 | 50 | 62 | 70 |
| χ^2 calculado | 1 | | 0.07 | 0.12 | 1 | 0.67 | 1 | 0.29 |
| p-value | 1 | | 0.795 | 0.734 | 1 | 0.413 | 1 | 0.59 |

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A tabela 5 mostra a comparação entre uso das substâncias voláteis (COVs) extraídas de ovinos machos da raça Morada Nova e sua eficiente para induzir o cio nas fêmeas e promover partos no ano de 2016, comparado com o método utilizando o "efeito macho" empregados nos anos de 2010 - 2015 e 2017.

Nossa hipótese seria que a porcentagem de ovelhas que apresentaram cio e pariram com o uso dos COVs no ano de 2016 é igual a porcentagem de ovelhas que apresentaram cio e pariram sem exposição aos COVs, mas com a presença do macho nos anos de 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 e 2017.

Então, o X^2 calculado para todos os anos foram maiores que os tabelados em nível de 5% de probabilidade, como mostra a tabela 5. Portanto, a hipótese de que o número médio das ovelhas que pariram com o uso dos COVs foi igual do número médio de ovelhas que pariram sem COVs mostrou-se verdadeira, comprovando assim a eficiência dos COVs em estimular o cio nas fêmeas de ovelhas desladas da raça Morada nova.

Apesar do consenso em relação à eficiência do "efeito macho" em estimular o cio em ovelhas em anestro funcional (TEJADA et al., 2017), porém pouco se sabe sobre quais substâncias são responsáveis por estimular o eixo hipotálamo - hipófise - ovário (DELGADILLO et al, 2009; OHARA, et al. 2014). Em 2017, Kekan et al, (2017) relataram a presença de aproximadamente 15 substâncias feromonais na urina de búfalos entre os quais inclui-se fenois, cetonas, alcanos, álcoois, amidas, ácidos e aldeídos alencando os compostos 2-octanona, 2- metil-N-fenil-2 propenamida, ácido decanóico, N, N- bis (2 hidroxietil) dodecanamida, ácido tetradecanóico e ácido hexadecanóico. Já em relação aos ovinos os compostos 1, 2-hexadecanodiol e 1, 2-octadecanodiol foram alencados como as principais substâncias feromonais dos ovinos, contudo tais substâncias não foram encontradas em nossas análises. No entanto a pesquisa em questão foi realizada em raças indianas, o que pode ter ocasionado tais discrepâncias de resultados, porém em relação aos fenois, cetonas, alcanos, álcoois, amidas, ácidos e aldeídos os resultados corroboram.

7.5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a metodologia utilizada para o isolamento e identificação de substâncias feromonais dos ovinos através da aeração e análise cromatográfica foi efetiva para esta finalidade.

Concluimos ainda que a combinação das substâncias isoladas e caracterizadas por cromatografia, a saber: o Undecano, o p-cresol e o 4 - etilbenzaldeído, foram eficazes na estimulação do cio das fêmeas ovinas da raça Morada Nova, contudo outras substâncias ainda podem ser identificadas e testadas com o objetivo de potencializar a eficácia das substâncias testadas.

7.6 PERSPECTIVAS

A continuidade das análises dos COVs precisam ser conduzidos para testar novas substâncias e também ampliar a análise para outras raças de ovinos, além de testar seu uso em outras espécies de mamíferos, principalmente caprinos.

7.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biotecnologias aplicada à reprodução em ovinos vem desempenhando um papel muito importante na produção e qualidade de seus produtos, mas a utilização de fármacos hormonais, devem ser utilizados com cautela visto que há possibilidade de contaminação residual dos produtos, do meio ambiente e de pessoas que não possuem qualificação para o manuseio desse hormônios.

Em contrapartida a utilização de manejos reprodutivos com técnicas de indução do estro de forma sincronizada e natural com o “efeito macho” pode incrementar a rentabilidade e qualidade dos produtos, uma vez que não há custos com mão de obra especializada e nem gastos com fármacos hormonais além de agregar valor aos produtos finais em virtude de ser um método onde se utiliza substâncias naturais, caracterizando assim uma produção dentro dos moldes da pecuária orgânica.

REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A.; CHEMINNEAU, P.; KELLER, M.; FORCADA, F.; DELGADILLO, J. A. Presence of photoperiod-melatonin-induced, sexually-activated rams in spring advances puberty in autumn-born ewe lambs. **Animal reproduction science**, v. 170, p. 114-120, 2016.
- ABECIA, J. A.; FORCADA F.; ZUÑIGA O. A note on the effect of individual housing conditions on LH secretion in ewes after exposure to a ram. **Applied Animal Behavioural Science**, v.75, p.347-352, 2002.
- ALAVEZ-RAMÍREZ, A.; MONTES-PÉREZ, R.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; ORTEGA-PACHECO, A. Effect of the combination of male effect with PGF2 α on estrus synchronization of hair sheep in Mexican tropic. **Tropical animal health and production**, v. 48, n. 3, p. 655-658, 2016.
- AVDI, M.; BANOS, G.; KOUTTOS, A.; BODIN, L.; CHEMINEAU, P. Sources of variation and genetic prole of spontaneous, out-of-season ovulatory activity in the Chios sheep. **Genetic Selection Evoution**. v. 35, p. 65-76, 2003.
- BEDOS, M.; PORTILLO, W.; DUBOIS, J. P.; DUARTE, G.; FLORES J. A.; CHEMINEAU P.; KELLE, M.; PAREDES R. G.; DELGADILLO J. A. A high level of male sexual activity is necessary for the activation of the medial preoptic area and the arcuate nucleus during the ‘male effect’ in anestrus goats. **Physiology & Behavior**, v.165, 2016
- BENGTSSON, J. M.; CHINTA, S. P.; HAWARIAT, Y. W.; NEGASH, M.; SEYOUM, E.; HANSSON, B. S.; SCHLYTER, F.; SCHULZ, S.; HILLBUR, Y. Pheromone-based mating and aggregation in the sorghum chafer, *Pachnoda interrupta*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36. p. 768 – 777, 2010.
- BLATT, S. E.; BORDEN, J. H.; PIERCE JR, H. D.; GRIES, R.; GRIES, G. Alarm Pheromone System of the Conifer Seed Bug. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, 1998.

BRONSON, F. H. and WHITTEN, W.K. Oestrus-accelerating pheromone of mice: assay, androgen-dependency and presence in bladder urine. **J. Reprod. Fert.**, v. 15, p. 31 – 34, 1968.

BRUNETEAU, É; DOUTEAU, É; L'effet mâle : une méthode alternative à L'utilisation des hormones exogènes. *L'égide*, n. 65. 2011.

CALDERÓN-LEYVA, G.; MEZA-HERRERAC. A.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, R.; ANGEL-GARCIA, O.; RIVAZ-MUÑOZ, R.; DELGADO-BERMEJO, J.V. Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes. **Theriogenology**, v. 106, p. 79-86, 2018.

CARVALHO, C. M. **Comportamento da Mosca dos chifres, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae) frente aos Compostos Orgânicos Voláteis de Diferentes Raças Bovinas.** 2012. 94 f. Tese (Doutorado Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia, Marceió, Alagoas. 2012.

CHASLES, M.; CHESNEAU, D.; MOUSSU, C.; DELGADILLO, J. A.; CHEMINEAU, P.; KELLER, M. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. **Animal Reproduction Science**, v. 168, p. 86-91, 2016.

CHEMINEAU, P.; BODIN, L., MIGAUD, M., THIERY, J. C., MALPAUX, B. Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, (suppl 3) p. 42-48. 2010.

CHEMINEAU, P.; GUILAUME, D., MIGAUD, M., THIERY, J. C., POLLICER-RUBIO, M. T., MALPAUX, B. Seasonality of Reproduction in Mammals: Regulatory Mechanisms and Practical Implications. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 43 (suppl.2), p. 40 – 47.2008.

COHEN TANNOUDJI, J; EINHORN, J; SIGNORET, J.P. Ram sexual pheromone: First approach of chemical identification. **Physiology Behavioural.**, v.56, p.955-961, 1994.

DEL GRANDE, M. **Princípios básicos de cromatografia gasosa**. disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/eventos/seminariodequimica/1%20B0%20Minicurso%20Produ%E7%E3o%20e%20Qualidade%20de%20Biodiesel/cromatografiagasosa.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2014.

DELGADILLO, J. A., GELEZ, H., UNGERFELD, R., HAWKEN, P. A. R., MARTIN, G. B. The ‘male effect’ in sheep and goats – Revisiting the dogmas - Review. **Behavioural Brain Research.**, v. 200, p. 304 – 314. 2009.

DELGADO A. R.; GÓMEZ-URVIOLA, N. Comportamiento reproductivo del ovino criollo en el altiplano Peruano. **Archivos Zootecnia**, v.54, p.541-544, 2005.

DLUZEN, D. E.; RAMIREZ, V. D. Male vole urine changes luteinizing hormone-Releasing hormone and norepinephrine in female olfactory bulb. **Science**, v. 212, p. 573 – 575, 1981.

FERREIRA-SILVA, J. C.; BURNETT, T. A.; SOUTO, P. F. M. P.; FILHO, P. C. B; G.; PEREIRA, L. C.; ARAUJO, M. V.; MOURA, M. T.; OLIVEIRA, M. A. L. Progesterone (P4), luteinizing hormone (LH) levels and ovarian activity in postpartum Santa Inês ewes subject to a male effect. **Archiv Animal Breeding**, v. 60, n. 2, p. 95, 2017.

FERREIRA-SILVA, J. C.; BURNETT, T. A.; SOUTO, P. F. M. P.; PEREIRA, L. C.; ARAUJO, M. V.; MOURA, M. T.; OLIVEIRA, M. A. L. Progesterone (P4), luteinizing hormone (LH) levels and ovarian activity in postpartum Santa Inês ewes subject to a male effect. **Archives Animal Breeding**, v. 60, n. 2, p. 95-100, 2017.

FREITAS, J. D.; CAVALCANTE, S. K. M.; SANTOS, E. D.; ANTUNES, L. O.; FREITAS, A. D. J.; FREITAS, M. L.; GOULARD, H. F.; SANTANA, A. E. G. Padronização da síntese dos principais constituintes feromônais de insetos dos gêneros *Metamasius* e *rhynchophorus*. **HOLOS**, v. 2, p. 15 – 27, 2011.

GELEZ, H.; FABRE-NYS, C. Role of the olfactory systems and importance of learning in the ewes’ response to rams or their odors. **Reproduction Nutrition Development.**, v. 46, p. 401 – 415, 2006.

GILL W. Applied sheep behavior. **Agricultural Extension Service**, 2012. Disponível em: <<http://animalscience.ag.utk.edu/sheep/pdf/AppliedSheepBehavior-WWG-2-04.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2013.

GIUDICE, L. G.; RIEDEL, M.; ROSTÁS, M.; PARI, E.; COLAZZA, S. Host sex discrimination by na egg parasitoid on brassica leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 622 – 628, 2011.

GIUDICE, L. G.; RIEDEL, M.; ROSTÁS, M.; PARI, E.; COLAZZA, S. Host sex discrimination by na egg parasitoid on brassica leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 622 – 628, 2011.

GORDON, I. Controlled reproduction en sheep and goats. **Cab International**, v.2, 1999.

GUERREIRO, A. Inter and intraspecificity of Chemical communication. **Chemical Ecology**. Disponível em: <<http://www.Eolss.net/Eolss-sampleAllChapter.aspx>>. Acesso em: 02 nov 2012.

GUERRERO, A. Inter and intraspecificity of Chemical communication. **Chemical Ecology**, 2012. Disponível em: <<http://www.Eolss.net/Eolss-sampleAllChapter.aspx>>. Acesso em: 03 nov 2013.

HAWKEN, P. A. R.; BEARD, A. P.; ESMAILI, T.; KADOKA, W. A. H.; EVANS, A. C. O.; BLACHE, D.; MARTIN, G. B. The introduction of rams induces an increase in pulsatile LH secretion in cyclic ewes during the breeding season''. **Theriogenology**, v.68, p.56-66, 2007.

JOHNSTON, R. E.; BRONSON, F.; Endocrine controlo of female mouse odors that elicit luteinizing homone surges and attraction in males. **Biology of reproduction.**, v. 27, p. 1174 – 1180, 1982.

KANNO, K.; KUENEN, L. P. S.; KLINGLER, K. A.; MILLAR, J. G.; CARDÉ, R. T. Attractiveness of a Four-component Pheromone Blend to Male Navel Orangeworm Moths. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, p. 584 – 591, 2010.

KARLOSNI, P.; LUSHER, M. Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. **Nature**, v. 183, p. 55- 56, 1959.

Kekan, P. M.; Ingole, S. D.; Sirsat, S. D.; Bharucha, S. V.; Kharde, S. D.; Nagvekar, A. S. The role of pheromones in farm animals-A review. **Agricultural Reviews**, v. 38, n. 2, 2017.

KELLER, M.; BAUM, M. J.; BROCK, O.; BRENNAN, P. A.; BAKKER, J. The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. **Behavioural Brain Research.**, v. 200, p. 268–276, 2009.

KEVERNE, E. B. Sex attractants in primates. **Journal Society Cosmetic Chemists**, v. 27, p. 257-269, 1976.

Kendrick, K.M. Pheromones: o cheiro de um macho. **Current Biology** , v. 24, n. 6, p. R228-R230, 2014

KEVERNE, E. B. Sex attractants in primates.**J. Soc. Cosmet.C hem.** v. 27, p. 257-269,1976.

KRÜCKERT, K.; FLACHSBARTH, B.; SCHULZ, S.; HENTSCHEL, U.; WELDON, P. J. Ethyl-branched aldehydes, ketones, and diketones from caimans (Caiman and Paleosuchus; Crocodylia, Reptilia). **Journal of natural products**, v. 69, n. 6, p. 863-870, 2006.

LASSOUED N, NAOUALI M, KHALDI G, REKIK M. Influence of the permanent presence of rams on the resumption of sexual activity in postpartum Barbarine ewes. **Small Ruminants Research**, v. 54, p. 25-31, 2004.

LE DANVIC, C.; GÉRARD, O.; SELLEM, E.; PONSART, C.; CHEMINEAU, P., HUMBLLOT, P.; NAGNAN-LE MEILLOUR, P. Enhancing bull sexual behavior using estrus-specific molecules identified in cow urine. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1381-1388, 2015.

LIU, Y. J.; HALL, D.; CROSS, J.; FARMAN, D.; AMARAWARDANA, L.; LIU, Q. R.; HE, X. K. (2S, 8Z)-Butyroxy-8-heptadecene: Major component of sex pheromone of chrysanthemum gall midge, *Rhopalomya longicauda*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35. p. 715 – 723, 2009.

MAHIEU, M., JEGO, Y., DRIANCOURT, M. A., CHEMINEAU, P. Reproductive Performances of Creole and Black-Belly Ewes in the West Indies. A New Major Gene Controlling Ovulation Rate? **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 235 – 243, 1989.

MANES, J.; FIORENTINO, M. A.; SAN MARTINO, S.; UNGERFELD, R. Changes in the vaginal microbiota in ewes after insertion of intravaginal sponges at different stages of the oestrous cycle. **Livestock Science**, v. 208, p. 55-59, 2018.

MARTIN G. B.; OLDHAM C. M.; COGNIE, Y.; PEARCE D. T. The physiological response of anovulatory ewes to the introduction of rams- a review. **Livestock Production Science**, v. 15, p. 219-247, 1986.

MC-LAFFERTY F. W.; TURECEK, F. 1993. **Interpretation of Mass Spectra Ed.** [S.l.]: University Science Book, 4th edition.

MOEINI, M. M.; CHAPDAREH, W. Mohammadi; SOURI, M. The " Male Effect" Onestrous Synchronization and Reproductive Characteristics of Female Markhoz Goat during the Breeding Season. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 5, n. 4, 2015.

MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; KITAGO, M.; MASUDA, K.; KAKUMA, Y.; HASHIZUME, C.; ICHIMARU, T.; MOGI, K.; OKAMURA, H.; YONEZAWA, T.; KIKUSUI, T.; MOTI, Y; Gene Expression profiles linked to the hormonal induction of male effect pheromone synthesis in goats (*Capra hircus*). **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 102–107, 2007.

MORAES, J. C. F. et al. Controle do estro e ovulação em ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 83.

MORAES, M. C. B.; MILLAR, J. G.; LAUMANN, R. A.; SUJIL, E. R.; PIRES, C. S. S.; BORGES, M. Sex attractant pheromone from the neotropical red-shouldered stink bug, *Thyanta perditor* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1415 – 1427, 2005.

MORAES, M. C. B.; MILLAR, J. G.; LAUMANN, R. A.; SUJIL, E. R.; PIRES, C. S. S.; BORGES, M. Sex attractant pheromone from the neotropical red-shouldered stink bug, *Thyantaperditor* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, nº 6, p. 1415 – 1427, 2005.

MORAES-BLASSIOLI, M. C.; LAUMANN, R. A.; OLIVEIRA, M. W. M; WOODCOCK, C. M.; MAYON, P.; HOOPER, A.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; BORGES, M. Sex pheromone communication in two sympatric neotropical stink bug species *Chinavia ubica* and *Chinavia impicticornis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, june 2012.

MUÑOZ, A. L.; BEDOS, M.; AROÑA, R. M.; FLORES, J. A.; HERNÁNDEZ, H.; MOUSSU, C.; BRIEFER, E.F; CHEMINEAU, P.; KELLER, M.; DELGADILLO, J. A. Efficiency of the male effect with photostimulated bucks does not depend on their familiarity with goats. **Physiology & behavior**, v. 158, p. 137-142, 2016.

MUÑOZ, A. L., CHESNEAU, D., HERNÁNDEZ, H., BEDOS, M., DUARTE, G., VIELMA, J.; ZARAZAGA, L. A.;CHEMINEAU, P.; KELLER, M.; DELGADILLO, J. A . Sexually active bucks counterbalance the seasonal negative feedback of estradiol on LH in ovariectomized goats. **Domestic animal endocrinology**, v. 60, p. 42-49, 2017.

MURATA, K.; TOMOGAMI, S.; ITOU, M.; OHKUBO, Y.; WAKABAYASHI, Y.; WATANABE, H.;OKAMURA, H.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Identification of an Olfactory Signal Molecule that Activates the Central Regulator of Reproduction in Goats. **Current Biology**, v.24 p. 681 - 686, 2014.

MURATA, K.; WAKABAYASHI, Y.; KITAGO, M.; OHARA, H.; TAMOGAMI, S.;WARITA, Y.MAGISHI, K.; ICHIKAWA, M. Modulation of gonadotrophin in small ruminants. **Journal of Neuroendocrinology**, v.21, p. 346–350, 2009.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F.A.; DUQUE L, J. E. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, p. 1-6, 2009.

MARCOS NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S.; **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. 2003. Editora Interciência, cap. 5, 71-83 p.

OHARA, H., NIKAIDO, M., DATE-ITO, A., MOGI, K., OKAMURA, H., OKADA, N., TAKEUCHI, Y., MORI, Y., YAMAGISHI, K. H. Conserved repertoire of orthologous vomeronasal type I receptor genes in ruminant species. **BME Evolutionary Biology**, v. 9, 2009.

OHARA, H.; MOGI, K.; ICHIMARU, T.; OHKURA, S.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y.; OKAMURA, H. Efeitos da exposição a extratos de pêlo de cabra em secreção do hormônio luteinizante e ativação neuronal em ovelhas com anestesia sazonal. **Journal of Veterinary Medical Science** , v. 76, n. 10, p. 1329-1337, 2014.

OKAMURA, H.; MURATA, K.; SAKAMOTO, K.; WAKABAYASHI, S.; OHKURA, Y.; MORI, Y. Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, p. 825–832, 2010.

OLIVEIRA, R. P. M.; OLIVEIRA, F. F. Manipulação do ciclo estral em ovinos. **PUBVET**, v.2, n.7, 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=146>>. Acesso em: 20 jun 14.

OTTO DE SÁ, C.; SÁ, J. L. **Ciclo Estral de Ovelhas**. 2001. Disponível em:<http://www.crisa.vet.br/exten_2001/cestral.htm> Acesso em: 20 jun 2014.

PEARCE G. P, OLDHAM C. M. Importance of non-olfactory ram stimuli in mediating ram-induced ovulation in the ewe.**JReprodFertil**, v.84, p.333-339, 1988.

PEARCE G. P.; OLDHAM C. M. Importance of non-olfactory ram stimuli in mediating ram-induced ovulation in the ewe. **Journal Reproduction Fertil**, v.84, p.333-339, 1988.

PELLICER-RUBIO, M.; BOISSARD, K.; FORGER, Y.; POUGNARD, J. L.; BONNÉ, J. L.; LEBOEUF, B.. Evaluation of hormone-free protocols based on the “male effect” for artificial insemination in lactating goats during seasonal anestrus. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 960-969, 2016.

PERKINS, A.; FITZGERALD, J. A.; The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 51-55, 1994.

PONCE, J. L.; HERNÁNDEZ, H.; FLORES, J. A.; KELLER, M.; CHEMINEAU, P.; DELGADILLO, J. A. One day of contact with photostimulated bucks is sufficient to induce ovulation in seasonally anestrous goats. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 880-886, 2015.

PRUNIER, A. and SALAÛM, M. The influence of boar stimulation on puberty attainment in tethered and group penned gilts. **Theriogenology**, v. 32, n° 6, p. 949 – 959, dez. 1989.

PRUNIER, A.; SALAÛM, M. The influence of boar stimulation on puberty attainment in tethered and group penned gilts. **Theriogenology**, v. 32, p. 949 – 959, 1989.

R CORE Team **A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.

RAMÍREZ, S.; BEDOS, M.; CHASLES, M.; HERNÁNDEZ, H.; FLORES, J. A.; VIELMA, J.; DUARTE, G.; RENATA-MARQUEZ, M. S.; KELLER, M.; CHEMINEAU, P. Fifteen minutes of daily contact with sexually active male induces ovulation but delays its timing in seasonally anestrous goats. **Theriogenology**, v. 87, p. 148-153, 2017.

RASMUSSEN, L. E. L.; GREENWOOD, D. Frontali: a chemical message of musth in Asian elephants (*Elephas maximus*). **Chemical senses**, v. 28, p. 433 – 446, 2003.

REDDY, G. V. P; GADI, N.; TAIANAO, A. J. Efficient sex pheromone trapping: catching the sweetpotato weevil, *Cylas formicarius*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, 2012.

RIBEIRO, L.A.O; DREYER, C.T; LEHUGEUR, C.M. Manejo da ovelha durante o encarneamento e a parição: novas técnicas para reduzir perdas reprodutivas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.171-174, abr./jun. 2011

RODSTEIN, J.; MCELFRISH, S.; BARBOUR, J. D.; RAY, A. M.; HANKS, L. M.; MILLAR, J. G. Identification and synthesis of a female-produced sex pheromone for the cerambycid beetle *prionuscalifornicus*. **Journal of Chemical Ecology**, v 35. p. 590 – 600, 2009.

ROMANO, J. E.; CHRISTIANS, C. J.; CRABO, B. G. Continuous presence of rams hastens the onset of estrus in ewes synchronized during the breeding season. **Applied Animal Behavioural Science**, v. 66, p. 65-70, 2000.

ROSA, H. J. D.; JUNIPER, D. T.; BRYANT, M. J. Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behavior and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes. **Journal Reproduction Fertil**, v.120, p.169-176, 2000.

SAMPAIO, M. S. et al. Uso de Sistema de Informação Geográfica para comparar a classificação climática de Koppen-Geiger e de Thornthwaite. **Sensoriamento Remoto**, v. 8858, 2011.

SHIMANO, S.; SAKATA, T.; MIZUTANI, Y.; KUWAHARA, Y.; AOKI, J. Geranial: the Alarm Pheromone in the Nymphal Stage of the Oribatid Mite, *Nothrus palustris*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, nº 9. 2002.

SHIMANO, S.; SAKATA, T.; MIZUTANI, Y.; KUWAHARA, Y.; AOKI, J. Geranial: the Alarm Pheromone in the Nymphal Stage of the Oribatid Mite, *Nothruspalustris*. **Journal of Chemical Ecology**. v. 28, n. 9, 2002.

SIMITZIS, P, E.; DELIGEORGIS, S. G.; BIZELIS, J. A. Effect of breed and age on sexual behaviour of rams. **Theriogenology**, v. 65, p. 1480-1491, 2006.

SILVA, Alanna do Socorro Lima; TEIXEIRA, Pedro Paulo Maia; VICENTE, Wilter Ricardo Russianno. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da luteólise: revisão de literatura. **Rev. Cien. Eletr. Med. Vet**, v. 8, p. 15, 2010.

SILVA, R. A. B. et al. Caracterização zoonosológica da ovinocultura e da caprinocultura na microrregião homogênea de Teresina, Piauí, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 593-8, 2011.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2006. cap. 31, 899-920 p.

TEJADA, L. M.; MEZA-HERRERA, C. A.; RIVAS-MUÑOZ, R.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, R.; CARRILO, E.; MELLADO, M.; VÉLIZ-DERAS. Appetitive and consummatory sexual behaviors of rams treated with exogenous testosterone and exposed to anestrus Dorper ewes: efficacy of the male effect. **Archives of sexual behavior**, v. 46, n. 3, p. 835-842, 2017.

THITARAM, C. and BROWN, J. L.; Monitoring and controlling ovarian activity in elephants. **Theriogenology**, v.109, p. 42 - 47, 2018.

UNGERFELD R, RAMOS MA, GONZÁLEZ-PENSADO SP. Ram effect: Adult rams induce a greater reproductive response in anestrus ewes than yearling rams. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 271-277, 2008.

UNGERFELD, R.; RAMOS, M. A.; MOLLER, R. Role of the vomeronasal organ on ram's courtship and mating behaviour, and on mate choice among oestrous ewes. **Applied Animal Behavioural Science**, v. 99, p. 248-252, 2006.

UNGERFELD, R.; SUÁREZ. G; CARBAJAL, B.; SILVA, L.; LACA, M.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. Medroxyprogesterone priming and response to the ram effect en Corriedale ewes during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 60, p. 35-45, 2003.

VÉLIZ, F. G., MORENO, S., DUARTE, G., VIELMA, J., CHEMINEAU, P., POIDRON, P. MALPAUX, B., DELGADILLO, J. A. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 197 – 207. 2002.

VÉLIZ, F. G., MORENO, S., DUARTE, G., VIELMA, J., CHEMINEAU, P., POIDRON, P. MALPAUX, B., DELGADILLO, J. A. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 197 – 207. May. 2002.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Viçosa: Imprensa Universitária. 1987, p.155.

WINANS, S. S and POWERS, J. B. Hamsters: histological and behavioral analyses. **Brainresearch.**, v. 126, p. 325 – 344, 1977.

YILDIZ, S.; SAATCI. M.; UZUN. M.; GÜVEN, B. Effects of ram introduction after the second Prostaglandin F2a injection on day 11 on the LH surge characteristics in fat-tailed ewes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 38, p. 54-57, 2003.

ZARAZAGA, L. A.; GATICA, M. C.; HERNÁNDEZ, H.; GALLEGU-CALVO, L.; DELGADILLO, J. A. The isolation of females from males to promote a later male effect is unnecessary if the bucks used are sexually active. **Theriogenology**, v. 95, p. 42-47, 2017.

ZARBIN. P. H. e ROGRIGUES, M. A. C. M. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 722-731, 2009.

ZHANG, Q. H.; SCHNEIDMILLER, R. G.; HOOVER, D. R.; YOUNG, K.; WELSHONS, D. O.; MARGARRYAN, A.; ALDRICH, J. R.; CHAUHAN, K. R. Male-produced pheromone of the green lacewing, *Chrysopa nigricornis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32. p. 2163 – 2176, 2006.

ZARBIN, P. H.; RODRIGUES, M. A.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos&58; tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil Insect pheromones&58; technology and challenges for a competitive agriculture in Brazil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZHU, J. J.; CHAUDHURY, M. F.; DURSO, L. M.; SAGEL, A.; SKODA, S. R.; JELVEZ-SERRA, N. S.; SANTANAB, E. G. Semiochemicals released from five bacteria identified from animal wounds infested by primary screwworms and their effects on fly behavioral activity. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0179090, 2017.