Efeito uso óleo essencial em ovelhas submetidas protocolos sincronização uso de dispositivos vaginais de progesterona

Aline Aparecida de Albuquerque Justo[1]; Bianca Gianola Belline Silva[2]; Regina Maria Nascimento Augusto Blaitt[3]; Lilian Mara Kirsch Dias[4]

[1]Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba-SP Brasil E-mail alineaalbuquerquee@gmail.com
[2]Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba-SP E-mail: bianca.belline@prof.uniso.br
[3]Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba-SP E-mail: reginamaria.uel@gmail.com
[4]Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba-SP E-mail: lilikirsch@gmail.com

Resumo. O uso de protocolos hormonais tem sido uma alternativa para aumentar os índices reprodutivos e com isto conseguir melhor retorno econômico na ovinocultura. Este protocolo tem como base o uso de dispositivos vaginais impregnados com progesterona. O dispositivo de menor custo amplamente utilizado tem como desvantagem o aumento da ocorrência de vaginite nas fêmeas, devido à sua estrutura em esponja de poliuretano. Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de óleo essencial associado ao dispositivo para diminuir a ocorrência de vaginite. Os animais foram divididos em 2 grupos: grupo controle (GC; n=05) e grupo óleo (GO; n=05). Em ambos os grupos o dispositivo vaginal de progesterona foi inserido nas fêmeas (D0) e permaneceu durante 9 dias, sendo então retirado (D9). Porém, para as fêmeas do GO foi acrescentado uma gota de óleo *Abies sibirica* no dispositivo vaginal antes de sua introdução. As variáveis observadas consistiram em avaliação qualitativa da secreção vaginal no D0 e D9, citologia vaginal e crescimento bacteriano. O uso do óleo essencial promoveu redução no crescimento bacteriano, auxiliando no controle e prevenção de vaginites, maximizando o potencial das biotecnologias reprodutivas nos rebanhos. Adicionalmente, este projeto contribui para futuros estudos sobre os benefícios da utilização de óleos essenciais em fêmeas de outras espécies também acometidas por vaginites.

Palavras chave: óleo essencial, ovinos, progesterona, reprodução, vaginites

Effect of using essential oil in sheep submitted to synchronization protocols using vaginal progesterone devices

Abstract. The use of hormonal protocols has been an alternative to increase reproductive rates and thus achieve better economic returns in sheep farming. This protocol is based on the use of vaginal devices impregnated with progesterone. The widely used lower cost device has the disadvantage of increasing the occurrence of vaginitis in females, due to its polyurethane sponge structure. This work aimed to evaluate the use of essential oil associated with the device to reduce the occurrence of vaginitis. The animals were divided into 2 groups: control group (GC; n=05) and oil group (GO; n=05). In both groups the vaginal progesterone device was inserted in the females (D0) and remained for 9 days, then removed (D9). However, for GO females, a drop of Abies sibirica oil was

added to the vaginal device before its introduction. The observed variables consisted of qualitative evaluation of vaginal secretion on D0 and D9, vaginal cytology and bacterial growth. The use of essential oil promoted a reduction in bacterial growth, helping to control and prevent vaginitis, maximizing the potential of reproductive biotechnologies in herds. Additionally, this project contributes to future studies on the benefits of using essential oils in females of other species also affected by vaginitis.

Keywords: essential oil, sheep, progesterone, reproduction, vaginitis

Introdução

O mercado de ovinos vem crescendo ao longo dos anos, principalmente para pequenos produtores que buscam melhor rentabilidade e logística. A constante demanda pelos produtos de origem animal, como carne, leite, couro e lã, associada ao manejo e características inerentes desses animais, como adaptabilidade, apontam tendência de expansão desse mercado (SANTOS *et al.,* 2008).

Objetivando maximizar a eficiência reprodutiva e consequentemente a produtividade, as biotecnologias da reprodução despertam o interesse dos produtores, sendo estratégias fundamentais para reduzir a infertilidade, que acarreta grandes prejuízos econômicos (SELEIVE; OSÓRIO,2014).

Os protocolos hormonais possibilitam a sincronização de estro para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Tal técnica, muito utilizada na reprodução de bovinos, resulta em inúmeros benefícios, como melhoramento genético do rebanho e redução de custos com erros na detecção de cios (MENCHACA; RUBIANES, 2004; TORRES-JÚNIOR *et al*., 2009). Desse modo, visando impulsionar a cadeia produtiva preconiza-se a otimização do manejo reprodutivo, buscando maior eficiência com o uso de protocolos hormonais assertivos (SELAIVE; OSÓRIO, 2014).

Os programas de reprodução animal utilizam protocolos hormonais que tem como base o uso de dispositivos intravaginais com progesterona ou outros progestágenos (ROBINSON *et al*., 1965; WHEATON *et al*., 1993; ABECIA *et al.,* 2012).

Os dispositivos com progesterona para sincronização do estro podem ser esponjas de poliuretano impregnadas com flurogestona acetato (FGA; GASTON-PARRY *et al.,* 1988) ou dispositivos de silicone impregnado com progesterona natural (CIDR®; WHEATON *et al*., 1993).
Estudos demonstraram que não há diferença na eficiência destes dispositivos (OZYURTLU *et al.,* 2010; ROMANO, 2004; UNGERFELD e RUBIANES, 2002 apud DIAS 2015) e, embora as esponjas apresentem menor custo (WHEATON *et al*., 1993), como desvantagem estão mais associadas à ocorrência de vaginites e aderências quando comparadas aos dispositivos feitos em silicone (CARLSON *et al*., 1989). Estes últimos podem ser reutilizados sem comprometimento de sua eficiência (VILARINO *et al*., 2010; VILARINO *et al*., 2011 e 2013 DIAS *et al*., 2015). No entanto, em razão dos custos, as esponjas intravaginais continuam sendo utilizadas nos protocolos hormonais em ovelhas (WILDEUS, 1999 apud KAJAYSRI). Os óleos essenciais são descritos como uma mistura

complexa de compostos aromáticos voláteis, principalmente por terpenos biossintetizados pela via do mevalonato, contendo compostos fenólicos chiquimato, sendo absorvidos pelo sistema olfativo por inalação ou via tópica através da via oral, via transmucosa via reto ou vagina (JOHNSON, 2020).

Os óleos essenciais possuem voláteis lipofílicos que conseguem atravessar livremente as membranas celulares, tem baixo peso molecular e sua estrutura permite que produzam um amplo espectro de atividade por múltiplas vias como mecanismos e alvos farmacológicos (JOHNSON, 2020). Essa alta lipofilicidade possibilita ação dos óleos essenciais sobre a parede e a membrana celular das bactérias, promovendo aumento da permeabilidade e o extravasamento do conteúdo intracelular (SOLÓRZANO-SANTOS, MIRANDA-NOVALES, 2012 apud MIRANDA 2016). Consequentemente, as bactérias perdem íons, reduzindo o potencial da membrana, ocorre colapso da bomba de prótons, perda de trifosfato, resultando na morte bacteriana (BAKKAL, *et al*., 2008; RAUT, KARUPPAYIL,2014 apud MONTEIRO 2015). Em células eucarióticas, fungos, os compostos dos óleos essenciais causam despolarização da membrana da mitocôndria atuando em canais de cálcio e em outros canais iônicos, levando a redução do pH, ou seja, acidificação do meio, resultando em colapso da bomba de prótons e a perda de ATP, similar ao que ocorre com as bactérias (BAKKAL, *et al*., 2008; RAUT, KARUPPAYIL,2014 apud MONTEIRO 2015).

No entanto, até o presente momento não se conhece estudos que comprovem a utilização de óleo essencial em associação aos dispositivos de progesterona, objetivando minimizar as vaginites nos animais de produção, dessa maneira, este trabalho justifica-se, essa nova proposta direciona-se a otimização do manejo reprodutivo, buscando aumentar a rentabilidade dos produtores de ovinos, por controlar a vaginite e minimizar o impacto de patologias reprodutivas relacionadas à diminuição da fertilidade das fêmeas.

Material e métodos

Este estudo experimental com animais foi realizado no sítio Sagrado Coração de Jesus, localizado na cidade de São Roque no estado de São Paulo, com início em setembro de 2022. Utilizou-se 10 fêmeas ovinas mestiças Santa Inês e Dorper, com escore de condição corporal variando entre 3 e 4 e comprovada fertilidade (multíparas). A alimentação (silagem de milho) foi fornecida na parte da manhã e tarde, o sal mineral (Ovinofós – Tortuga) e a água fornecida à vontade. Os animais permaneciam soltos em pasto com forragem do tipo braquiária. Os animais foram divididos em 2 grupos: grupo controle (GC, n= 05), grupo óleo (GO; n= 05). No grupo controle as fêmeas receberam o dispositivo vaginal de progesterona (Progespon®, Zoetis, Brasil) no dia zero (D0) e foram realizadas coletas de swab vaginal. Após nove dias de permanência, o dispositivo foi retirado (D9) associado à nova realização de swab vaginal. Já as fêmeas do GO tiveram o mesmo protocolo do grupo anterior com a única diferença que acrescentou uma gota de óleo (óleo essencial *Abies sibirica Do terra*®, (Do terra, Brasil) no dispositivo antes de sua colocação no D0.

Durante a coleta de swab vaginal procedeu-se observação da qualidade do muco vaginal, tanto no dia da implantação, quanto no dia da retirada do implante, avaliando-se a qualidade de muco, odor e presença de conteúdo purulento e sanguinolento (MARTINEZ-ROS *et al*., 2018 apud ROSS 2018). Classificou-se o muco de acordo com os seguintes parâmetros, Grau 0- Presença de secreção mucosa translúcida e sem odor; Grau 1- Presença de secreção mucopurulenta e sem odor fétido; Grau 2- Presença de secreção mucopurulenta e com odor fétido e Grau 3- Presença de secreção sanguinolenta com odor fétido.

Avaliação microbiológica

As etapas de isolamento e caracterização das cepas bacterianas provenientes dos isolados clínicos, são necessárias para determinar a presença e prevalência de bactérias nas vaginites de ovinos.

Para o preparo dos meios de cultura utilizados no processo de isolamento e identificação, deve-se seguir a orientação dos fabricantes e os procedimentos em microbiologia clínica a determinações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - BRASIL, 2013). Todos os meios de cultura e soluções destinados a microbiologia e materiais foram esterilizados em autoclave 30 minutos à 121ºC sob 1 atm. de pressão. As placas contendo meios de cultura ágar sangue e ágar Mac Conkey foram armazenadas em geladeira até o momento do uso. Caldo TSB (*Tryptic soy broth*) preparo do caldo dissolvendo em 24 g do meio TSB em 800 ml de água ultrapura. O caldo foi esterilizado e armazenado em geladeira até o momento do uso.

Os materiais biológicos foram coletados da vulva das ovelhas, por meio da citologia vaginal, usando swabs estéreis que foram colocados num meio de transporte do tipo *Stuart* ou *Cary Blair* ™.

Os swabs com as amostras biológicas foram levados ao laboratório e inseridos em tubos de ensaio com TSB para enriquecimento à 37°C durante 24h. No dia seguinte, realizou se a semeadura em meios de cultura ágar sangue e meio seletivo ágar Mac Conkey, (sendo as placas de petri incubadas overnight à 37°C), para isolamento das bactérias encontradas na amostra. Além da observação de crescimento e morfologia das colônias, avaliou-se a fermentação da lactose pelo crescimento no ágar Mac Conkey e provas bioquímicas para identificação e caracterização das espécies bacterianas. As metodologias para a identificação da bactéria baseou-se no Guia de Microbiologia da Anvisa (BRASIL, 2013).

Coloração de Gram

Depois da incubação, uma unidade formadora de colônia (UFC) isolada foi retirada usando uma alça estéril e adicionada em lâmina com uma gota de solução salina, para realização da coloração de Gram. Adicionou-se cerca de 1 ml de solução de cristal violeta 0,005% sobre a lâmina esperando 1

min. Retirou-se o excesso do corante e a lâmina foi lavada com água destilada. Na sequência, adicionou-se cerca de 1 ml de lugol e aguardou-se mais 1 min. Escorrido o excesso, a lâmina foi descorada com solução de álcool-acetona (1:1) e lavada com água destilada. Sendo a lâmina corada com solução de safranina 0,1% por 30 segundos e novamente lavada com água destilada. Após secagem da lâmina, foi feita a leitura ao microscópio para observação dos resultados com objetiva de imersão (BRASIL, 2013).

Teste da catalase

Foi retirada uma UFC de cada amostra plaqueada e adicionada à lâmina contendo peróxido de hidrogênio a 3% v/v. Através do desprendimento de bolhas de oxigênio confirma-se a reação positiva (BRASIL, 2013).

Testes bioquímicos

Neste estudo utilizou-se o Enterokit B, da Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., composto pelos meios de cultura EPM, MILi e Citrato de Simmons. O meio EPM contém os testes de fermentação e produção de gás em glicose, produção de H_2S, hidrólise da uréia e desaminação do triptofano. O meio MILi contém os testes de motilidade, indol e descarboxilação de lisina. O meio Citrato de Simmons oferece o teste de utilização do citrato como única fonte de carbono. Os três meios totalizam 8 testes que somados ao da fermentação da lactose no ágar Mac Conkey, permitem identificar com a grande maioria das enterobactérias isoladas de amostras clínicas.

Resultados e discussão

As amostras biológicas coletadas em D0 e D9, foram processadas e passaram por criterioso isolamento para obtenção de cultura pura, na sequência as cepas isoladas passaram por diferentes etapas de identificação, desde a coloração de Gram, verificação das condições de crescimento e observação de características metabólicas. Os exames macroscópicos e microscópicos da cultura permitiram analisar tamanho, morfologia e coloração da colônia em meios simples, seletivos e diferenciais. A combinação desses resultados com os testes bioquímicos específicos, possibilitou a identificação dos isolados com segurança. Os resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas nas amostras coletadas, seguem exibidos na Tabela 2.

Grupo Controle – D0										
Amostra	**Gram**	**Lactose**	**Oxidase**	**Citrato**	**Prod. Gás**	**Indol**	**Lisina**	**Motilidade**	**H_2S**	**Uréia**
Ovelha: 01 *Escherichia coli*	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Ovelha: 02 *Escherichia coli*	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Ovelha: 03 *Escherichia coli*										
Ovelha: 04 *Escherichia coli*	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Ovelha: 05 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Grupo óleo – D0										
Ovelha: 06 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Ovelha: 07 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Ovelha: 08 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Ovelha: 09 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Ovelha: 10 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Grupo Controle – D (9)										
Ovelha: 01 *Escherichia coli*	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Ovelha: 02 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ovelha: 03 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ovelha: 04 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ovelha: 05 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Grupo óleo – D (9)										
Ovelha: 06 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Ovelha: 07 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ovelha: 08 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ovelha: 09 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Ovelha: 10 *Escherichia coli*	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-

Tabela 2 - Resultado enterokits

A avaliação dos resultados obtidos após identificação dos isolados bacterianos deste estudo, evidenciou crescimento de *Escherichia coli* em todas as amostras do grupo controle e grupo óleo, exceto na amostra 03, que não apresentou crescimento bacteriano no D0. Para identificar as bactérias presentes nas amostras, observou-se o crescimento e morfologia das colônias, resultados da coloração de Gram e das provas bioquímicas realizadas. O crescimento característico em ágar Mac Conkey auxiliou na identificação de *E. coli*, pois é um meio de cultura seletivo e diferencial, contendo sais biliares e cristal violeta, que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas, além de indicar a fermentação da lactose pelo aparecimento de colônias rosadas ou avermelhadas, conforme imagens a seguir. (BRASIL, 2013).

Figura 1 – Crescimento característico de *Escherichia coli* em ágar Mac Conkey.

A bactéria *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa, bastonete Gram-negativo, fermentador de glicose e lactose, é oxidase-negativa, catalase positiva, possui atividade de descarboxilase e produz indol a partir da desaminação de triptofano (HOLT *et al*., 1994). Tais características foram evidenciadas nos resultados dos testes bioquímicos, conforme tabela 2, para as amostras coletadas do grupo controle e grupo óleo D (0) e D (9).

Avaliando-se os resultados macroscópicos do crescimento bacteriano nas placas de petri, foi possível observar maior crescimento de bactérias após a implantação dos dispositivos, principalmente nas amostras 01,03 e 05 em ágar Mac Conkey. Isso pode estar de acordo com a hipótese já discutida em literatura de que o uso de dispositivos vaginais favorece o crescimento bacteriano e a ocorrência de vaginites (CARLSON *et al*., 1989). Pode ocorrer alterações na flora vaginal associadas às esponjas, também podem afetar negativamente a atração sexual das ovelhas em estro (GATTI; UNGERFELD, 2012).

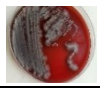
Grupo Controle			
Antes da implantação – D 0		**Após retirada – D 9**	
Ágar sangue	**Ágar Mac Conkey**	**Ágar sangue**	**Ágar Mac Conkey**
Ovelha **01** – Allana	Ovelha **01** – Allana	Ovelha **01** – Allana	Ovelha **01** – Allana
Ovelha **02 –** Anastásia	Ovelha **02** – Anastásia	Ovelha **02** – Anastásia 	Ovelha **02** – Anastásia
Ovelha **03** – Lana	Ovelha **03** – Lana	Ovelha **03** – Lana	Ovelha **03** – Lana
Ovelha **04** – Luna	Ovelha **04** – Luna	Ovelha **04** – Luna	Ovelha **04** – Luna
Ovelha **05** – Sol	Ovelha **05** – Sol	Ovelha **05** – Sol	Ovelha **05** – Sol

Tabela – 3 Resultado da coleta antes da retirada dos dispositivos D0 e após retirada dos dispositivos D9 em placa de Ágar sangue e ágar Mac Conkey, GC.

Através da tabela 4 é possível visualizar o crescimento bacteriano do grupo óleo, antes e após colocação dos dispositivos, em placas de ágar sangue e Mac Conkey, conforme imagens é possível visualizar o crescimento bacteriano em todas as placas de ágar sangue e ágar Mac Conkey.

Grupo Óleo			
Antes da implantação – D 0		**Após retirada – D 9**	
Ágar sangue	**Ágar Mac Conkey**	**Ágar sangue**	**Ágar Mac Conkey**
Ovelha **06** – Aurora	Ovelha **06** – Aurora	Ovelha **06** – Aurora	Ovelha **06** – Aurora
Ovelha **07** –Brenda	Ovelha **07** –Brenda	Ovelha **07** –Brenda	Ovelha **07** –Brenda
Ovelha **08** – Cloé	Ovelha **08** – Cloé	Ovelha **08** – Cloé	Ovelha **08** – Cloé
Ovelha **09** – Mikaela	Ovelha **09** – Mikaela	Ovelha **09** – Mikaela	Ovelha **09** – Mikaela
Ovelha **10** – Serena	Ovelha **10** – Serena	Ovelha **10** – Serena	Ovelha **10** – Serena

Tabela 4 - Resultado da coleta antes da implantação dos dispositivos D0 e após retirada dos dispositivos D9 em placas de Ágar sangue e Ágar Mac Conkey**,** GO.

Em placas de ágar sangue não ocorreu diminuição do crescimento após implantação dos dispositivos com o óleo, mantendo-se como antes da implantação, sendo importante destacar aqui que, por não ser seletivo o ágar sangue favorece também o crescimento de contaminantes na amostra. Em placas de ágar Mac Conkey foi perceptível a diminuição das bactérias, desta maneira sugerindo que o uso do óleo *Abies sibirica* promoveu evidente diminuição do crescimento bacteriano após retirada dos dispositos.

E sugere-se uma influência positiva no uso do óleo, pois após a retirada todas as fêmeas do G0 continuaram com o muco translúcido, enquanto que 2 fêmeas do GC apresentaram muco mucopurulento.

Conclusão

Sendo esse estudo de grande valia para os pequenos produtores de ovinos que buscam diminuir ocorrências de vaginite em suas fêmeas reprodutoras, e assim aumentando sua produção e por se tratar de um método de baixo custo beneficiando ainda mais, podendo este vir a ser utilizado em outras espécies acometidas por vaginite.

De acordo com as condições propostas neste estudo, sugere-se que o uso do óleo essencial *Abies sibirica* no momento da colocação do dispositivo vaginal diminui a ocorrência de vaginites em ovelhas.

Referências bibliográficas

Abecia, J.A.; Forcada, F.; González-Bulnes, A.et al. (2012*).* Hormonal control in small ruminants*.* *Animal Reproduction Science, v. 130, n. 3-4, p. 173-179.*

Agência nacional de vigilância sanitária (Brasil). (2013). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde: *Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica e Laudo Final*. *Brasília-DF. 95p.V.9.* https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-4-procedimentos-laboratoriais-da-requisicao-do-exame-a-analise-microbiologica-e-laudo-final.

Agência nacional de vigilância sanitária (Brasil). (2013). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde: *Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Brasília-DF: [s. n.]. 95 p. v. 9*. http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/modulo005.pdf.

Anuapec. **Anuário da Pecuária Brasileira**. (2010). *p.360.* https://biblioteca.incaper.es.gov.br/busca?b=ad&id=5690&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22INSTITUTO%20FNP%22&qFacets=autoria:%22INSTITUTO%20FNP%22&sort=ano-publicacao&paginacao=t&paginaAtual=1

Aro, D. T.; Poliezer; K. A.; Pena; S. B. O. (2007). agronegócio na Ovinocultura de Corte no Brasil. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. *Ano V – Número 09 periódicos semestrais.* http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/NhVBZAHe53RuKZR_2013-5-27-15-40-49.pdf.

Alves, L. G. C.; Osório. J. C.S.; Fernandes, A. R. M.; Almeida, H. R.; Cunha, C. M. (2014). Produção de Carne Ovina com Foco no Consumidor. Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer. *Goiânia, v 10, n.18; p. 2415 2014.* https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/producao%20de%20carne.pdf.

Azevedo, F. M. V. M. C.; Antonialli, L. M. (2008). Produção e comercialização de carne de ovinos na região metropolitana de Belo Horizonte - MG. In: SOBER Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Rio Branco: Anais*: SOBER, 20-23 julho, 1-21 p.*

Basedovsky Ho, Del Rey A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: 7. facts and hypotheses. *Endocrinology, v. 17, n.1, p.64-102.*

Carlson, M.K.; Pohl, A.H.; Marcek, J.M.; Muser, R.H.; Wheaton, J.E. (1989). Evaluation of progesterone controlled internal drug release dispensers for estrous synchronization in sheep. *Animal Reproduction Science, v.18, p.205-218.*

Dias, L.M.K., Paes De Barros, M.B.; Viau, P.; Sales, J.N.S.; Valentim, R.; Santos, F.F.; Cunha, M.C.; Marino, C.T.; Oliveira, C.A. (2015). Effect of a new device for sustained progesterone release on the progesterone concentration, ovarian follicular diameter, time of ovulation and pregnancy rate of ewes. *Animal Reproduction Science, v. 155, p. 56-63.*

Fatet, A.; Pellicer.R.M.T.; Leboueuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science, v. 124, n. 3-4, p. 211-219.*

Hirschh, D. C; Zee, Y.C. (2014). Microbiologia Veterinária. *Guanabara Koogan, Rio de janeiro.*

Johson, S. A.; Rodriguez, D.; Allred, K. A. (2020). Systematic Review of Essential Oils and the Endocannabinoid System: A Connection Worthy of Further Exploration. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi. v. 13 p.* https://doi.org/10.1155/2020/8035301 .

Kajaysrik, J.; Thammakarn, C.; Estrus Synchronization Using Intravaginal Medroxyprogesterone Acetate (MAP), MAP plus F2α, Controlled Internal Drug Release (CIDR) or CIDR Plus Prostaglandin F2α in in Saanen Dairy Goats in Thailand. *Kasetsart J (Nat. Sci.) 46: 71 – 79.* https://www.thaiscience.info/Journals/Article/TKJN/10898160.pdf

Menchaca, A.; Rubianes, E. (2004) New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development, v. 16, n. 4, p. 403 – 413*.

Miranda, C. A. S. F.; Cardoso, M.G.; Batista, L. R.; Rodrigues, L. M. A.; Figueiredo, A.C.S. (2016). Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. Revista ciência agronômica. Centro de ciências agrárias universidade federal do Ceará. *Fortaleza-Ceará, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan-mar.* https://www.scielo.br/j/rca/a/tgtFRN7Dxp8Hqt6JTgfjrsk/?format=pdf.

Monteiro, A.R.P. (2015). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. *Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde. Porto* https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5327/1/PPG_23518.pdf.

Moura, A. C.B. (2009). Desempenho reprodutivo de ovelhas santa inês criadas no Nordeste Parense. *Universidade Federal do Ceará, centro de Ciências Agrárias Depto de Zootecnia*. *Fortaleza.* https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1234/1/2009-dis-acbmoura.pdf.

Nascimento, P. F.C; Nascimento, A.C; Rodrigues, C.S; Antoniolli, A. R.; Santos, P.O; Júnioir, A. M.B.; Trindade, R.C. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia, 17(1): 108-113, Jan/Marc.*https://www.scielo.br/j/rbfar/a/pjSFydVRNTHtVw48qPPmZQN/?format=pdf&lang=pt.

Ozyurtluo, N; Kucukaslan, I. (2008). Cetin,Y.Characterization of oestrous induction response, oestrous duration, fecundity and fertility in awassi ewes during the non-breeding season utilizing both CIDR and intravaginalnsponge treatments. *Reproduction in Domestic Animals, v. 45, p 464-467.*

Robinson, T.J. (1965). Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for control of oestrus cycle in sheep. *Nature, v. 206, p. 39–41.*

Ross, Paula Martinez; Lozano, Marta; Hernandez, Fernando; Tirado, Alejandra; Abellan, Alejandro Rios; Mendoza, Maria Carmen López; Bulnes, Antonio Gonzalez. (2018). Intravaginal Device-Type and Treatment-Length for Ovine Estrus Synchronization Modify Vaginal Mucus and Microbiota and Affect Fertility. *Animals 2018, 8, 226; doi:10.3390/ani8120226 -29 novembro.* https://www.mdpi.com/2076-2615/8/12/226 .

Santos, F.C.C; Barcelos, R.A.D. (2012). Eficiência de protocolos de sincronização de estro em ovelhas. Rev Bras. Reprod. Anim. *Belo Horizonte, v. 36. n 3, p 202-205, jul/set*. https://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v36n3/p202-205%20(RB399).pdf.

Selaive; Osório. (2014). Produção de Ovinos no Brasil, *p. 4-6.*

Sorribas, C. S. (2006). Atlas de reprodução canina. *São Paulo: interboock*.

Souza, M.I.L.(2013). Indução e sincronização de estro em ovelhas: desafios e potencial. Rev. Bras. Reprod. Anim. *Belo Horizonte, v.37, n2, p.220-225, abr/jun.* http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag220-225%20(RB452).pdf.

Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szekereday L. (2005). et al, progesterone-dependent imunomodulaton chem immunol allergy.

Tondello Martins. (2010). Leonardo et al. Avaliação microbiológica e funcional de um dispositivo vaginal alternativo (OB ®) para sincronização de cio em ovelhas. *Ciência Rural Santa Maria, v.40, n.2, p.389-395, fev*.

Ungerfeld. (2012). M.G. Intravaginal sponges to synchronize estrus decrease sexual attractiveness in ewes. Elsevier Inc, *v. 78, p. 1796-1799.*

Viana, J. G. A. (2010). Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. Revista Ovinos.*p.4, março.*

Vilariño, M.; Rubianes, E.; Menchaca, A. (2013). Ovarian response and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing device for fixed-time artificial insemination in sheep. Theriogenology, *v.79, p. 206-210.*

Vilariño, M.; Rubianes, E.; Menchaca, A. (2011). Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the short-term protocol for timed artificial insemination in goats. Theriogenology, *v. 75, p. 1195-1200.*

Vilariño, M.; Rubianes, E.; Van Lier, E.; Menchaca, A. (2010) Serum concentrations, follicular development and time of ovulation using a new progesterone releasing device (DICO®) in sheep. Small Ruminant Research, *v. 91, p. 219-224.*

Wheaton, J. E.; Carlson, K. M.; Windels, H. F.; Johnston, L. J. (1993). CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. Animal Reproduction Science, *v. 33, p. 127-141*.