MARCOS VEIGA DOS SANTOS

**CORRELAÇÃO ENTRE ÁCIDO ASCÓRBICO
PLASMÁTICO, CONTAGEM DE CÉLULAS
SOMÁTICAS NO LEITE E O PERFIL
METABÓLICO DE VACAS SECAS E EM
LACTAÇÃO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE.

DEPARTAMENTO:

NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

NUTRIÇÃO ANIMAL

ORIENTADOR:

PROF. DR. FELIX RIBEIRO DE LIMA

PIRASSUNUNGA

1998

MARCOS VEIGA DOS SANTOS

**CORRELAÇÃO ENTRE ÁCIDO ASCÓRBICO
PLASMÁTICO, CONTAGEM DE CÉLULAS
SOMÁTICAS NO LEITE E O PERFIL
METABÓLICO DE VACAS SECAS E EM
LACTAÇÃO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA A OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE.

DEPARTAMENTO:

NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

NUTRIÇÃO ANIMAL

ORIENTADOR:

PROF. DR. FELIX RIBEIRO DE LIMA

PIRASSUNUNGA

1998

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Santos, Marcos Veiga dos

Correlação entre ácido ascórbico plasmático,
contagem de células somáticas no leite e o
perfil metabólico de vacas secas e em lactação /
Marcos Veiga dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Nutrição e Produção Animal,
Pirassununga, 1998.

Área de Concentração: Nutrição Animal

Orientador: Prof. Dr. Felix Ribeiro de Lima.

Unitermos: 1.Gado leiteiro 2. Ácido ascórbico 3. Contagem de
células somáticas 4. Perfil metabólico

“É preciso ver o que não foi visto,
ver outra vez o que se viu já,
ver na Primavera o que se virá no Verão,
ver de dia o que se viu de noite,
com sol onde primeiramente a chuva caía,
ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que
mudou de lugar, a sombra que aqui não estava.
É preciso voltar aos passos que foram dados,
para os repetir, e para traçar caminhos novos
ao lado deles (...) Sempre.”

José Saramago

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **José Célio** e **Alice**, e meu irmão **Marcelo** pelo amor, carinho e exemplo de honestidade e determinação que procuro seguir.

À **Sandrinha** pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

Ao Professor Doutor **Luis Fernando Laranja da Fonseca** pela amizade, companheirismo e constante orientação nesta longa jornada do aprendizado.

Ao Professor Doutor **Felix Ribeiro de Lima** pela oportunidade de orientação e dedicação à ciência.

Ao Professor Titular **Carlos de Sousa Lucci** e ao Professor Doutor **Laercio Melotti** pela confiança e amizade.

Ao Professor Doutor **José Fernando Garcia** pelo exemplo de dedicação à ciência e capacidade de trabalho.

Aos amigos **Fabiano, Stéfano, Kleber, Francisco e Paulinho** pelo convívio, momentos de alegria e pelo constante incentivo de vencer cada obstáculo.

AGRADECIMENTOS

À **Capes** pelo financiamento da bolsa de estudo e à **FAPESP** pela concessão de auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Às fazendas que colaboraram com este experimento, em especial ao **Dr. José Claudio Carvalho, Dr. José Luiz e Gilberto Checoli**.

A todos os docentes, funcionários, pós-graduandos e estagiários do VNP – Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, pela oportunidade de convívio e trabalho, sem dedicação e auxílio dos quais seria impossível a realização deste trabalho.

A Profa. Titular **Silvia Berlanga de Moraes Barros** do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, alunos e funcionários pela orientação, carinho, confiança e apoio incondicional na realização das análises de ácido ascórbico plasmático.

A Profa **Silvia Regina Ricci Lucas**, Profa. Dra. **Clair Motos de Oliveira, Regina Miekeko Sakata Mirandola**, e de modo especial à **Maria Luiza (Maú)** e **Maria Helena** pela disposição e auxílio na realização das análises laboratoriais de glicose, AST, BHBA.

Ao VRA-Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, em especial a **Samira, Cabral, Marco Roberto Burg de Mello, Áurea** e os Professores Dr. **Ed Hoffman Madureira** e Dr. **José Antônio Visitin** pelo auxílio na realização das análises de insulina.

Ao amigo **Marcos Brian Heinemann** pela disposição e competente auxílio na realização das análises de AGNE, realizadas no Laboratório de Virologia Aplicada do VPS-FMVZ-USP.

Ao funcionários do VNP: **Gilmar, Everson, Gilson, Simi, Ari, Alessandra, Lúcia, Júnior, Selma, Rui e Bel** pela constante dedicação e sem a ajuda dos quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos alunos **André Pinto Lima (Spock)**, **Juliana Ruzante (Mabel)**, **Daniela Rodrigues (Mary)**, ao médico veterinário **Christian Campos Pereira (Magoo)** e outros que direta e indiretamente contribuíram de forma decisiva para que este trabalho fosse realizado, muito obrigado pela colaboração.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SEUS DERIVADOS DO METABOLISMO.....	8
FIGURA 2 – A: MODELO DE CROMATOGRAMA PARA ÁCIDO ASCÓRBICO PADRÃO NA CONCENTRAÇÃO 25 mg/l, TEMPO DE RETENÇÃO = 6,78; B: MODELO DE CROMATROGRAMA PARA ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRA DE PLASMA, NA CONCENTRAÇÃO DE 3,09 mg/l E TEMPO DE RETENÇÃO DE 6,81 MINUTOS.....	41
FIGURA 3 – ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/dl): EFEITO DO ESTÁGIO DE LACTAÇÃO (DIAS)	50
FIGURA 4 – GRÁFICO DE DISPERSÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l) E DIAS EM LACTAÇÃO.....	51
FIGURA 5 – ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/dl): EFEITO DO NÚMERO DE LACTAÇÕES.....	53
FIGURA 6 – ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/dl): EFEITO DA FAZENDA AMOSTRADA.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS VACAS AMOSTRADAS DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E COM O NÚMERO DE LACTAÇÕES.....	34
TABELA 2 - ESQUEMA DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM DELINEAMENTO EM BLOCOS CASUALISADOS GENERALIZADOS.....	36
TABELA 3 – COEFICIENTES DE CONTRASTES ORTOGONAIS PARA SEPARAÇÃO DE EFEITOS DE ESTÁGIOS DE LACTAÇÃO.....	37
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	49
TABELA 5 - EFEITO DO ESTÁGIO DE LACTAÇÃO (DIAS) SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l), GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ Eq/l), BHBA (mg/dl), AST (UI/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia), CCS (log CEL/ml X 1000) E ECC (ESCALA DE 1 A 5), VALORES DE P E ERRO PADRÃO DA MÉDIA.....	50
TABELA 6 - EFEITO DO NÚMERO DE LACTAÇÕES (MULTÍPARA OU PRIMÍPARA) SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l), GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ Eq/l), BHBA (mg/dl), AST (UI/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia), CCS (LOG CEL/ml X 1000) E ECC (ESCALA DE 1 A 5), VALORES DE P E ERRO PADRÃO DA MÉDIA,	52
TABELA 7 - EFEITO DA FAZENDA (A, B OU C) SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l), GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ Eq/l), BHBA (mg/dl), AST (UI/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia), CCS (log CEL/ml X 1000) E ECC (ESCALA DE 1 A 5), VALORES DE P E ERRO PADRÃO DA MÉDIA.....	54
TABELA 8 - EFEITO DO ESTÁGIO DE LACTAÇÃO SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ Eq/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia) E ECC; PROBABILIDADES DO EFEITO DO ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E PROBABILIDADES (P) DA SEPARAÇÃO DOS EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO ATRAVÉS DE CONTRASTES ORTOGONAIS.....	55

TABELA 9 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE (mg/dl): : EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	56
TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE INSULINA (μ UI/l): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	57
TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS NÃO- ESTERIFICADOS - AGNE (μ Eq/l):): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	58
TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE β HBA (mg/dl): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	59
TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE AST (UI/l): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	60
TABELA 14 - CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE ((LOG CEL/ml X 1000): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	61
TABELA 15 - PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES.....	62
TABELA 16 – PROBABILIDADES ESTATÍSTICAS DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS E SUAS INTERAÇÕES SOBRE O ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL EM ESCALA DE 1 A 5 (ECC).....	62
TABELA 17– EFEITO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS ESTUDADAS NA FUNÇÃO SELECTION DO PROCEDIMENTO PROC REG SOBRE OS COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO OBTIDOS..	64
TABELA 18 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR (r), PROBABILIDADE (P) E NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS (n) PARA AS ASSOCIAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE; CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE INSULINA; CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE AGNE (ÁCIDOS GRAXOS NÃO- ESTERIFICADOS); CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE β - HIDROXIBUTIRATO (β HBA); ATIVIDADE SÉRICA DE ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE (AST); PRODUÇÃO DE LEITE, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AGNE	Ácidos gráxos não-esterificados
AST	Aspartato aminotransferase
βHBA	Beta-hidroxibutirato
CCS	Contagem de células somáticas
CC	Corpos cetônicos
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ECC	Escore de condição corporal
EE	Extrato etéreo
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FB	Fibra bruta
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
GLM	General linear model
GDH	Glutamato desidrogenase
HPLC	High performance liquid chromatography
MM	Matéria mineral
MS	Matéria seca
NMC	National Mastitis Council
NRC	National Research Council
NDT	Nutrientes digestíveis totais
OCT	Ornitinacarbamil transferase
PARL-PR	Programa de análise de rebanhos leiteiros do estado do Paraná
PB	Proteína bruta
R ²	Coeficiente de determinação
RIA	Radioimmune assay

RESUMO

SANTOS, M. V. **Correlação entre ácido ascórbico plasmático, contagem de células somáticas no leite e o perfil metabólico de vacas secas e em lactação** [Correlation between plasma ascorbic acid, milk somatic cell count and metabolic profile in lactating and dry cows]. Pirassununga, 1998. 109p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Vacas em lactação apresentam capacidade de síntese endógena de ácido ascórbico para suprir os seus requerimentos, no entanto, sob condições estressantes como altas temperaturas e umidade, elevadas produções de leite, parasitoses e incidência de doenças, pode haver produção insuficiente de ácido ascórbico para as demandas metabólicas do animal. Foram objetivos do presente estudo avaliar o efeito do estágio de lactação e número de lactações sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico de 153 vacas em lactação e 40 vacas no período seco em 3 fazendas leiteiras, e sua correlação com: a contagem de células somáticas (CCS) no leite, níveis de glicose plasmática, níveis de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), níveis de insulina plasmática, níveis de beta-hidroxi-butirato (β HBA) plasmático, níveis de aspartato-aminotransferase (AST) plasmática, níveis de produção de leite e escore de condição corporal. Os animais foram escolhidos ao acaso e agrupados em 5 grupos de acordo com o estágio de lactação (estágio 1: 1-28 dias; estágio 2: 29-56 dias; estágio 3: 57-140 dias; estágio 4: 141-280 dias e estágio 5: vacas secas) e de acordo com o número de lactações (primíparas ou multíparas). Amostras de sangue foram coletadas para determinação de ácido ascórbico plasmático utilizando técnica de cromatografia líquida de alta pressão. A análise estatística foi realizada com o uso do programa computacional SAS. A concentração média (mg/L) de ácido ascórbico plasmático foi de 2,67; 2,60; 2,46; 2,63 e 2,60 para os estágios de 1 a 5 respectivamente, e de 2,52 e 2,63 para multíparas e primíparas. Foi identificada correlação negativa entre o ácido ascórbico plasmático e glicose e AGNE plasmáticos, e correlação positiva entre ácido ascórbico plasmático e produção de leite. Não foram registradas correlações entre ácido ascórbico plasmático e demais parâmetros. Baseado nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que o ácido ascórbico plasmático não sofreu efeito de estágio de lactação ou número de lactações, e ainda que identificada correlação entre ácido ascórbico plasmático e as variáveis glicose, AGNE e produção de leite não foi possível identificar o fator determinante da variabilidade do ácido ascórbico plasmático em vacas leiteiras.

Unitermos: Vacas Leiteiras, Ácido Ascórbico, Contagem de Células Somáticas, Perfil Metabólico.

ABSTRACT

SANTOS, M. V. **Correlation between plasma ascorbic acid, milk somatic cell count and metabolic profile in lactating and dry cows** [Correlação entre ácido ascórbico plasmático, contagem de células somáticas no leite e o perfil metabólico de vacas secas e em lactação]. Pirassununga, 1998. 109p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Dairy cows are totally dependent of endogenous synthesis of ascorbic acid to meet their requirements. Therefore, any condition that decrease the availability of ascorbic acid precursors like glucose and galactose, may result in insufficient synthesis of ascorbic acid. High producing dairy cows may be predisposed to subclinical ascorbic acid deficiency due to the elevated demand for glucose to lactose synthesis by mammary gland. The purpose of this study was to determine the effects of stage of lactation and number of lactations on plasma ascorbic acid concentration, and to establish the association between plasma ascorbic acid level and glucose, insulin, non-esterified fatty acids (NEFA), beta-hydroxybutyrate (BHBA), aspartate-amino transferase (AST), milk somatic cell count (SCC), milk yield and body condition score in dairy cows. One hundred and ninety three dairy cows (153 lactating and 40 dry cows) from 3 different herds were used in this study. Animals were randomly selected, and assigned to 5 groups according the stage of lactation (stage 1: 1-28 days; stage 2: 29-56 days; stage 3: 57-140 days; stage 4: 141-280 days and stage 5: dry cows) and the number of lactation (primiparous or multiparous). Blood samples were taken for ascorbic acid determination by HPLC technique. Statistical analysis was performed using the SAS program. Statistical significance was declared at the 5% level. Average plasma ascorbic acid concentration (mg/L) for Group 1 to 5 were 2.67; 2.60; 2.46; 2.63 and 2.60, respectively, and 2.63 and 2.52 for primiparous and multiparous cows. A negative correlation was observed between ascorbic acid and both glucose and NEFAs and a positive correlation between ascorbic acid and milk yield. No correlation was found between ascorbic acid and other parameters. Results of this study demonstrated that plasma ascorbic acid concentration did not change in response to stage of lactation and number of lactations and eventhough plasma ascorbic acid was correlated to glucose, NEFAs and milk yield, it was not possible to identify the factor that determine ascorbic acid variability in dairy cows.

Uniterms: Dairy Cows, Ascorbic Acid, Somatic Cell Count, Metabolic Profile

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 Vitamina C - Estrutura bioquímica.....	8
3.2 Biossíntese e metabolismo.....	9
3.3 Suplementação dietética de ácido ascórbico para vacas em lactação	11
3.4 Funções biológicas.....	14
3.5 Ácido Ascórbico e imunidade.....	17
3.6 Metabolismo de glicose nos ruminantes.....	21
3.6.1 Beta-hidroxibutirato.....	22
3.6.2 Ácidos graxos não-esterificados.....	24
3.6.3 Escore de condição corporal (ECC).....	25
3.6.4 Aspartato aminotransferase (AST).....	26
3.7 Insulina.....	27
3.8 Contagem de células somáticas (CCS).....	30
4 MATERIAL E MÉTODO.....	33
4.1 Animais.....	34
4.2 Instalações.....	34
4.3 Tratamentos e delineamento experimental.....	35
4.4 Análise estatística.....	35
4.5 PROCEDIMENTOS DE COLETAS E MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
4.5.1 Metodologia de coleta de plasma para determinação de ácido ascórbico.....	38
4.5.2 Metodologia para determinação de ácido ascórbico plasmático.....	39
4.5.2.1 Equipamentos utilizados na metodologia de HPLC.....	39
4.5.2.2 Procedimento de extração.....	40
4.5.2.3 Determinação da concentração de ácido ascórbico.....	40
4.5.3 Metodologia para coleta de sangue para determinação plasmática de glicose, β HBA e AGNE.....	42
4.5.4 Metodologia para determinação de glicose.....	42
4.5.5 Metodologia para determinação de β HBA.....	43

4.5.6 Metodologia para determinação de AGNE.....	43
4.5.7 Metodologia para coleta de sangue para determinação sérica de AST e insulina.....	44
4.5.8 Metodologia para determinação de AST.....	44
4.5.9 Metodologia para determinação de insulina.....	45
4.5.10 Metodologia para coleta de leite e determinação de CCS.....	46
4.5.11 Metodologia para avaliação do escore de condição corporal (ECC).....	46
4.5.12 Análise bromatológica das dietas.....	46
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Concentração plasmática de ácido ascórbico.....	49
5.2 Concentração plasmática de glicose.....	56
5.3 Concentração sérica de insulina.....	56
5.4 Concentração plasmática de ácidos graxos não-esterificados (AGNE).....	57
5.5 Concentração plasmática de β -hidroxibutirato (β HBA).....	58
5.6 Atividade sérica de aspartato-aminotransferase (AST).....	59
5.7 Contagem de células somáticas no leite (CCS).....	60
5.8 Produção de leite.....	61
5.9 Escore de condição corporal (ECC).....	62
5.10 Correlações entre concentração plasmática de ácido ascórbico e demais parâmetros.....	63
6 DISCUSSÃO.....	67
6.1 Ácido ascórbico.....	68
6.2 Glicose.....	71
6.3 Insulina.....	73
6.4 Ácidos Graxos não-esterificados (AGNE).....	74
6.5 β HBA.....	77
6.6 AST.....	79
6.7 Contagem de células somáticas.....	80
6.8 Produção de leite.....	81
6.9 Escore de condição corporal.....	82
7 CONCLUSÕES.....	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÊNDICES	

1 INTRODUÇÃO

Existe um crescente interesse no estudo das interações entre nutrição e a resistência às doenças nos animais domésticos de interesse econômico. Isto ocorre em virtude da evolução dos sistemas de criação atuais baseados em confinamentos com altas densidades populacionais. Sob tais condições, os animais estão sujeitos a maior número de fatores estressantes e ao aumento na incidência de doenças, o que causa diminuição no retorno econômico das explorações. Desta maneira, uma melhor compreensão de como os fatores nutricionais, em especial os micronutrientes, podem otimizar a resistência do animal às doenças é de fundamental importância (NOCKELS, 1988a; ROEDER, 1995).

As atuais recomendações para requerimentos de nutrientes das várias espécies de animais de produção são totalmente baseadas em critérios de crescimento e produção, mas não enfatizam a maximização da resposta imune do animal (REDDY e FREY, 1990; ROEDER, 1995). Alterações nas recomendações de nutrientes com o objetivo de otimizar a resposta imune e resistência às doenças podem ser economicamente viáveis se forem comprovadas reduções na morbidade e mortalidade sob condições de campo (REDDY e FREY, 1990).

As vitaminas antioxidantes - vitamina E, vitamina C e β -caroteno - têm sido apontadas como capazes de aumentar a resposta imune em várias espécies animais (ROEDER, 1995). A evidência para a função antioxidante destas vitaminas baseia-se na sua propriedade de diminuir a oxidação de membranas, enzimas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas, que é causada primariamente pela produção de radicais livres de origem do metabolismo das células (NOCKELS, 1988b; BENDICH, 1993; ROEDER, 1995).

O período de tempo compreendido entre o final da gestação e o início da lactação representa um estágio de alta demanda metabólica para a vaca leiteira em virtude do crescimento fetal exponencial, da diminuição drástica do consumo de matéria seca e dos grandes requerimentos de energia na forma de glicose para manter a síntese de lactose do leite pelas células secretoras da glândula mamária (PATTON e POLEY, 1996). Segundo HERDT *et al.* (1981), as vacas de alta produção podem requerer para a síntese de lactose do leite até 80% do suprimento total de glicose do organismo.

Os ruminantes são totalmente dependentes da síntese endógena de ácido ascórbico para os seus requerimentos, uma vez que todo o ácido ascórbico de origem da dieta é destruído pelos microrganismos do rúmen (NOCKELS, 1988b). Desta forma, quaisquer situações em que ocorra diminuição da disponibilidade de precursores para a síntese de ácido ascórbico - glicose e galactose - podem resultar em produção insuficiente desta vitamina para a demanda do animal (MacLEOD *et al.*, 1996). Vacas em lactação, com elevadas produções de leite podem estar predispostas a deficiência subclínica de ácido ascórbico, em virtude dos elevados requerimentos de glicose e galactose para a síntese de leite na glândula mamária (MACLEOD *et al.*, 1996).

Segundo WASHKO *et al.* (1992), muitos dos dados disponíveis sobre concentrações de ácido ascórbico em estudos nos quais foram empregados testes colorimétricos ou espectrofotométricos apresentam, geralmente, baixa sensibilidade e especificidade, interferência de outras substâncias e cuidados inadequados quanto a estabilidade das amostras. O autor menciona que, dentre os métodos disponíveis atualmente para determinação de ácido ascórbico, a técnica de HPLC (High

Performance Liquid Chromatography) é a que apresenta os resultados mais confiáveis.

Vacas em lactação apresentam capacidade de síntese endógena de ácido ascórbico para os seus requerimentos. Entretanto, sob condições estressantes como: altas temperaturas e umidade, elevadas produções de leite, parasitoses e incidência de doenças, é possível haver produção insuficiente de ácido ascórbico para as demandas metabólicas do animal, podendo ocorrer “deficiência subclínica” de ácido ascórbico. Portanto, o estudo do efeito do estágio e número de lactações sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico e as suas relações com o perfil metabólico destes animais possibilitarão a identificação de possíveis períodos críticos nos quais os animais podem apresentar síntese endógena insuficiente para a maximização da resposta imune.

2 OBJETIVOS

Foram objetivos do presente experimento:

- 1) Avaliar o efeito do estágio e número de lactações sobre a concentração de ácido ascórbico plasmático em vacas leiteiras de rebanhos comerciais
- 2) Estabelecer a associação entre a concentração plasmática de ácido ascórbico e os seguintes parâmetros:
 - Concentração plasmática de glicose
 - Concentração sérica de insulina
 - Concentração plasmática de AGNE (ácidos graxos não-esterificados)
 - Concentração plasmática de Beta-hidroxibutirato (β HBA)
 - Atividade sérica de aspartato-aminotransferase (AST)
 - Contagem de células somáticas (CCS) no leite
 - Produção de leite
 - Escore de condição corporal

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Vitamina C - Estrutura bioquímica

O termo vitamina C é usado como descrição genérica para todos os compostos que apresentam atividades biológicas qualitativas do ácido ascórbico (BALL, 1994).

O ácido ascórbico, $C_6H_8O_6$, é uma cetolactona com peso molecular de 176,1 e $pK = 4,10$ (LEVINE, 1986). Podem ser encontradas na natureza duas formas da vitamina C, denominadas ácido L-ascórbico (forma reduzida) e ácido L-dehidroascórbico (forma oxidada), ambas as formas são biologicamente ativas, entretanto os isômeros D não possuem atividade biológica (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984). A estrutura química do ácido ascórbico e do ácido L-dehidroascórbico é apresentada na Figura 1.

FIGURA 1. Estrutura química do ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico.

O ácido ascórbico é solúvel em água (33 g/100 ml a 25 °C) e menos solúvel em etanol a 95% (3,3 g/100 ml), sendo, entretanto, insolúvel em solventes

orgânicos (BALL, 1994). A molécula de ácido ascórbico apresenta potente propriedade redutora devido ao grupo carbonil enediol (BALL, 1994).

Na natureza, a forma reduzida do ácido ascórbico pode ser reversivelmente oxidada para a forma dehidroxilada. O ácido dehidroascórbico é oxidado irreversivelmente, formando o composto inativo ácido dicetogulônico. O ácido ascórbico é bastante susceptível à destruição através da oxidação, que pode ser acelerada pela luz e calor. Desta forma, a vitamina C é considerada a vitamina mais instável e portanto mais facilmente destruída (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984).

3.2. Biossíntese e metabolismo

O ácido L-ascórbico é sintetizado pela maioria dos animais, exceto o cobaio, os primatas, os morcegos frugívoros, a maioria dos peixes e alguns pássaros da Ordem Passeriformes ou pode ser regenerado de sua forma oxidada por qualquer célula dos mamíferos (CHATTERJEE, 1970; BÁNHEGYI, *et al.* 1997). Nestas espécies, a incapacidade de síntese endógena de ácido ascórbico ocorre pela deficiência na enzima L-gulonolactona oxidase que cataliza a conversão da L-gulonolactona para 2-ceto-L-gulonato, o qual se transforma por isomerização espontânea em ácido L-ascórbico (HORNIG *et al.* 1984).

Nos bovinos, a síntese de ácido ascórbico ocorre no fígado através da via do ácido glicurônico, tendo como precursor a glicose (NOCKELS, 1988b). O grupo de enzimas relacionadas com a síntese do ácido ascórbico a partir do ácido glicurônico foi isolada da fração microssomal de células do fígado (CHATTERJEE, 1970). Os bezerros não sintetizam ácido ascórbico até aproximadamente 4 meses após o nascimento. Os maiores níveis plasmáticos são detectados no dia do nascimento,

antes da amamentação, diminuindo nas duas semanas seguintes, quando então se estabiliza devido ao início da síntese endógena (LUNDQUIST e PHILLIPS, 1942; BOUDA *et al.* 1980).

Nos animais dependentes de ácido ascórbico de origem dietética, a absorção ocorre de forma similar à dos monossacarídeos, através de transporte ativo sódio-dependente, no intestino delgado (RIVERS, 1987). O ácido ascórbico é amplamente distribuído pelos tecidos, tanto em animais capazes de sintetizá-lo, como nos animais dependentes de fontes alimentares de ácido ascórbico. Em animais experimentais, como no cobaio, as maiores concentrações de ácido ascórbico são encontradas nas glândulas pituitária e adrenais, fígado, baço, cérebro e pâncreas (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984). Nos animais que não dependem de ácido ascórbico de origem dietética, assume-se que a absorção ocorra por mecanismo de difusão, entretanto existe pouca informação disponível sobre o mecanismo de absorção de ácido ascórbico nestes animais (HORNIG *et al.* 1984).

Estudos *in vitro* para determinação da taxa de síntese de ácido ascórbico foram descritos para várias espécies animais (CHATTERJEE *et al.* 1975; LEVINE, 1986). Segundo LEVINE (1986), a taxa de síntese de ácido ascórbico na vaca foi de 15,7 a 18,3 mg/kg/dia. Devido ao fato destes estudos terem sido realizados com frações microssomais de fígado, os resultados obtidos sob condições experimentais controladas não podem ser aceitos como taxas fisiológicas normais de síntese de ácido ascórbico. Os autores sugerem que tais taxas podem refletir a síntese máxima de ácido ascórbico ou mesmo a taxa de síntese alterada pelo procedimento de isolamento da fração microssomal do fígado destas espécies, uma vez que o controle da ativação do processo de síntese de ácido ascórbico nos microssomas

hepáticos, fração que contém as enzimas necessárias para a síntese, não é ainda conhecido (LEVINE, 1986).

O ácido ascórbico é inicialmente convertido em ácido dehidroascórbico por várias enzimas ou processos não-enzimáticos, podendo então novamente ser reduzido a ácido ascórbico nas células. Após ser absorvido para a corrente sanguínea, o ácido ascórbico prontamente se equilibra com o “pool” corporal da vitamina (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984). Não foi descrita nenhuma proteína carreadora específica para o ácido ascórbico, sendo sugerido que este ácido é acumulado em organelas celulares (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984).

A excreção do ácido ascórbico e seus metabólitos, em humanos, é realizada através da urina. A quantidade de ácido ascórbico filtrada pelo glomérulo renal é função da taxa de filtração glomerular e da concentração plasmática de ácido ascórbico (RIVERS, 1987). O metabolismo do ácido ascórbico segue o caminho da oxidação, com a formação do dehidroascorbato, o qual é então hidrolizado para 2,3 dicetogulonato e os produtos finais da degradação são oxalato e CO₂ (BALL, 1994; RIVERS, 1987).

3.3. Suplementação dietética de ácido ascórbico para vacas em lactação

De acordo com o NRC (1989), não há recomendação para a utilização de fontes de vitamina C como nutriente essencial na dieta de vacas em lactação, pois os ruminantes apresentam capacidade de síntese de ácido ascórbico. Adicionalmente, um dos principais problemas associados com a suplementação dietética de ácido ascórbico para vacas em lactação é a alta instabilidade do ácido

ascórbico na sua forma cristalina, e a inativação do ácido ascórbico de origem dietética pelos microrganismos do rúmen (NOCKELS, 1988b).

São escassos os trabalhos de pesquisa sobre o metabolismo do ácido ascórbico no rúmen. A taxa de crescimento de bactérias do gênero *Selenomonas* pode ser estimulada em meio de cultura contendo ascorbato como agente redutor (GOTTINGEN, 1990). No entanto, parece que o possível mecanismo de metabolização do ácido ascórbico no rúmen ocorre através da oxidação, a qual apresenta como produtos finais dióxido de carbono e ácidos graxos voláteis (GOTTINGEN, 1990). Desta forma, vacas em lactação são totalmente dependentes da síntese endógena de ácido ascórbico.

Os valores plasmáticos de ácido ascórbico, descritos na literatura como normais, variam consideravelmente (ITZE, 1984). Segundo GOSSE (1938), as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico em vacas prenhes e não prenhes variaram entre 8,3-25 mg/l. O mesmo autor observou também que as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico aumentaram durante o terço final da gestação. ITZE (1984) relatou concentrações séricas de ácido ascórbico em vacas de 10 mg/l, enquanto que DVORAK (1966), estudando níveis séricos em vacas adultas, encontrou valores entre 4 e 15 mg/l.

ITZE (1984), buscando determinar os níveis de ácido ascórbico em ruminantes, relatou que as concentrações de ácido ascórbico no soro de vacas no período pós-parto apresentaram variação sazonal significativa diferente ($P < 0,05$), com valores mínimos de 3,5 mg/l e valores máximos de 10 mg/l. Segundo o autor, tal diferença ocorreu devido à dieta mais pobre em energia fornecida aos animais no período que coincidiu com as concentrações plasmáticas mais baixas de ácido ascórbico.

Estudo realizado em vacas em lactação determinou que níveis de ácido ascórbico em leucócitos foram mais constantes que os níveis plasmáticos. Os animais com elevadas produções de leite apresentaram menores concentrações plasmáticas de ácido ascórbico, assim como foram registradas menores concentrações plasmáticas durante o verão (HAAG e HOFMANM, 1987). Bezerros recém-nascidos aparentemente não sintetizam ácido ascórbico até aproximadamente 4 meses de idade e, portanto, são totalmente dependentes de vitamina C de origem do leite materno (LUNDQUIST e PHILLIPS, 1942; BOUDA *et al.*, 1980).

A suplementação dietética de ácido ascórbico para bezerros leiteiros (1,75 g/dia) não teve efeito nas concentrações plasmáticas de IgG, entretanto, animais suplementados tiveram menores escores clínicos para diarreia que animais não suplementados (CUMMINS e BRUNNER, 1989).

Os níveis de vitamina C podem estar diminuídos em ruminantes em situações em que a síntese de glicose estiver reduzida. A glicose sintetizada no fígado pode ser direcionada para o sangue e utilizada para os requerimentos energéticos de outros órgãos, restringindo assim, a disponibilidade de glicose como precursor da síntese de ácido áscórbico (NOCKELS, 1988b).

MACLEOD *et al.* (1996) avaliaram a utilização de ascorbil-2-polifosfato - um derivado éster do ácido ascórbico (SCHUEP e KECK, 1990) - quanto à estabilidade ruminal em relação ao ácido ascórbico na forma cristalina. Os autores relataram que o ascorbil-2-polifosfato apresentou maior estabilidade ruminal quando comparado com ácido ascórbico na forma cristalina, através da mensuração do tempo de desaparecimento ruminal das duas fontes de vitamina C. Ainda no mesmo estudo, MACLEOD *et al.* (1996) realizaram suplementação oral de 20 gramas por dia de

ascorbil-2-polifosfato em novilhas leiteiras durante um período de 31 dias. Os animais suplementados apresentaram concentrações plasmáticas de ácido ascórbico significativamente superiores ($P < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle. O estudo também determinou a concentração de ácido ascórbico no tecido muscular e obteve concentrações de ácido ascórbico maiores ($P=0,08$) nos animais suplementados que nos animais do grupo controle. No entanto, não houve aumento significativo na concentração de ácido ascórbico nos neutrófilos dos animais suplementados, o que, segundo os autores, pode ter ocorrido em virtude do prolongado tempo necessário para a separação dos neutrófilos do sangue total e do intenso transporte ativo de ácido ascórbico realizados por estas células.

3.4. Funções biológicas

Segundo LU (1997), antioxidantes são substâncias que previnem oxidação. Para sobreviver em ambientes anaeróbicos os organismos tiveram que se adaptar e desenvolver sistemas antioxidantes para a proteção contra os efeitos dos radicais livres produzidos pelo próprio metabolismo aeróbico ou de origem do ambiente. O metabolismo energético aeróbico dos seres vivos está associado com a produção de compostos derivados do oxigênio altamente reativos, os quais são capazes de causar danos às moléculas biologicamente importantes como o DNA (ácido desoxirribonucléico), proteínas, carboidratos e lipídeos (SIES e STHAL, 1995). Dentre estes compostos estão incluídos o radical hidroxil, radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, oxigênio molecular nascente (1O_2), assim como o hipoclorito, radical óxido nítrico e peroxinitrito.

Vêm sendo descritos variados processos bioquímicos, nos quais o ácido ascórbico está envolvido (HORNIG *et al.* 1984; GÖTTINGEN, 1984; BÁNHEGYI *et al.*

1997). A função desempenhada pelo ácido ascórbico está diretamente ligada às suas características reversíveis de oxido-redução; entretanto, o papel exato da vitamina C não é ainda completamente entendido, pois não foi identificada a sua forma em coenzima (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984).

O ácido ascórbico tem função de acelerar as reações de hidroxilação em inúmeras vias biossintéticas, atuando direta ou indiretamente como doadores de elétrons para enzimas que requerem grupos prostéticos de metais na forma reduzida para atingir sua atividade enzimática máxima (LEVINE, 1986; WINKLER *et al.* 1994).

A função da vitamina C melhor estabelecida é na síntese de colágeno, que é a principal proteína do tecido conjuntivo e a proteína presente em maior quantidade em relação ao peso corporal dos animais (BRODY, 1994). Um dos aminoácidos utilizados na síntese de colágeno, a hidroxiprolina, tem origem na hidroxilação de prolina em hidroxiprolina, sob ação do ácido ascórbico. Outra reação necessária é a hidroxilação de lisina para a subsequente formação de ligações cruzadas entre as fibras de colágeno. O ascorbato atua na manutenção do estado reduzido da enzima ferro dependente, prolina hidroxilase (Fe^{2+}), uma vez que esta enzima não apresenta atividade catalítica no estado oxidado - Fe^{3+} (BALL, 1994, BRODY, 1994). Alterações na síntese de colágeno da membrana basal levam a disfunções na integridade da mucosa, fragilidade capilar e aumento da incidência de doenças periodontais. Estas características podem ser encontradas em animais submetidos a restrições de ácido ascórbico e que não apresentam capacidade de síntese endógena deste composto (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984).

A vitamina C está relacionada em uma série de outras funções, que são sumarizadas a seguir:

- a) Oxidação metabólica de certos aminoácidos, como a tirosina (LEVINE, 1986);
- b) O ácido ascórbico possui papel importante no metabolismo de íons metálicos, como o Fe, devido a sua característica redutora e quelante, causando aumento da absorção deste mineral da dieta e sua mobilização a partir da ferritina e distribuição pelo corpo (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984);
- c) A síntese de carnitina a partir da lisina e metionina é dependente de ácido ascórbico para duas reações de hidroxilação, que são catalisadas por enzimas contendo íon ferro (LEVINE, 1986; HORNIG *et al.* 1984);
- d) Na síntese de catecolaminas, o ácido ascórbico é necessário para maximizar a hidroxilação da dopamina, pela dopamina beta-hidroxilase, para a formação de norepinefrina (LEVINE, 1986; BRODY, 1994);
- e) Interrelações entre vitaminas do complexo B e vitamina C são descritas, desta forma, animais com deficiências de tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina podem ter alterados os níveis teciduais e a excreção de ácido ascórbico pela urina (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984);
- f) O ácido ascórbico apresenta efeitos estimulatórios sobre a atividade fagocitária de leucócitos, sobre a função do sistema reticuloendotelial e síntese de anticorpos (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984). A suplementação de vitamina C tem efeitos benéficos em animais sob condições de estresse, diminuindo os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides sobre a função neutrofílica (ROTH e KAEBERLE, 1985; REDDY e FREY, 1990);
- g) O ácido ascórbico tem sido descrito como inibidor de nitrosaminas, as quais são potentes carcinogênicos. Em ruminantes, o ácido ascórbico atua na detoxificação de

altas doses de nitrato na dieta (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984);

h) A vitamina C está envolvida no controle da síntese de glicocorticóides na glândula adrenal. Durante períodos de estresse, a vitamina C diminui a síntese de glicocorticóides na adrenal, auxiliando a manutenção da imunocompetência (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984);

i) Devido a sua característica de potente agente redutor, o ácido ascórbico fornece equivalentes redutores para uma variedade de outras enzimas, as quais são importantes na síntese de hormônios peptídeos, como a oxitocina, vasopressina, colecistoquinina e alfa-melanotropina (LEVINE, 1986);

j) A vitamina C é pré-requisito para a hidroxilação da vitamina D₃ para a sua forma ativa 1,25 (OH)₂D₃ (HORNIG *et al.* 1984; JAFFE, 1984; SAUBERLICH, 1984).

3.5 Ácido ascórbico e imunidade

O sistema imune é responsável pela proteção do organismo contra infecções causadas por patógenos como bactérias, vírus e protozoários. Este sistema apresenta capacidade de reconhecer e distinguir entre estruturas próprias e estruturas estranhas ao organismo e de destruir ou remover aquelas consideradas estranhas. Concomitantemente, o sistema imune apresenta elevada capacidade de interação tanto dentro do próprio sistema como com outros sistema do corpo (LU, 1997).

A execução das funções do sistema imune se dá através dos chamados sistema imune humoral e sistema imune celular. Os componentes celulares destes dois sistemas sintetizam uma variada gama de substâncias que atuam modulando o

sistema imune. Por outro lado, a imunidade também envolve outros processos metabólicos tais como proliferação celular, diferenciação, síntese e secreção de mediadores, reconhecimento de receptores, ligação e especificidade de funções de cada célula do sistema imune (BENDICH, 1990).

A vitamina C tem efeitos sobre a função imune, entretanto, resultados experimentais de suplementação de vitamina C em humanos e outros animais dependentes de ácido ascórbico da dieta apresentam resultados controversos (BEISEL, 1982). No entanto, a vitamina C parece desempenhar importante papel na função das células fagocitárias, principalmente no processo de quimiotaxia destas células (BEISEL, 1982). Muitas das funções protetoras das células do sistema imune dependem da manutenção da estrutura da membrana plasmática destas células (BENDICH, 1993). Devido ao fato destas membranas apresentarem alta concentração de ácidos graxos polinsaturados, existe grande potencial de peroxidação de lipídeos da membrana por radicais livres oriundos do metabolismo das células (BENDICH, 1993).

A vitamina C é encontrada em altas concentrações nos leucócitos (MOSER, 1987) sendo importante para a função neutrofílica (CHEW, 1995). O ácido ascórbico, também, possui efeito protetor através da sua habilidade de reduzir os níveis circulantes de glicocorticóides (CHEW, 1995). O efeito imunossupressivo dos corticóides na função neutrofílica em vacas é diminuída com a suplementação de vitamina C (ROTH e KAEBERLE, 1985).

A vitamina C ou ácido L-ascórbico é considerado o mais importante antioxidante em fluidos extracelulares. Estudo *in vitro* demonstrou que o ascorbato é o antioxidante de fase aquosa mais ativo no plasma humano, sugerindo assim que o ascorbato é o antioxidante fisiológico de maior importância na proteção

contra doenças e processos degenerativos causados por estresse oxidativo (FREI *et al.*, 1989). A vitamina C tem demonstrado ser um antioxidante efetivo, atuando diretamente pela reação com radicais peroxil em fase aquosa, ou indiretamente pela redução do alfa tocoferoxil (forma oxidada) para alfa-tocoferol (forma reduzida) (BENDICH *et al.*, 1986; CHAN, 1993).

A vitamina C suplementada ao nível de 330 mg/kg de ração reduziu a mortalidade e pericardite em frangos infectados por *Escherichia coli* (CHEW, 1995). Com a elevação da temperatura ambiente houve necessidade de aumento da quantidade suplementada de vitamina C para que fosse demonstrado o mesmo efeito protetor (CHEW, 1995).

O ácido ascórbico interage com o alfa-tocoferol na interface membrana-citosol tendo efeito de regeneração da vitamina E na forma oxidada para a vitamina E na forma reduzida (CHAN, 1993). Esta interação é importante na proteção das células em situações em que os níveis de cada antioxidante em separado não correspondem ao nível ótimo para a proteção da célula contra a peroxidação lipídica (CHEW, 1995).

A manutenção de níveis ótimos de vitamina C é particularmente importante para os leucócitos, que acumulam esta vitamina contra um gradiente de concentração (MOSER, 1987). Células mononucleares e granulócitos apresentam, nesta ordem, as mais elevadas concentrações de ácido ascórbico no organismo (MOSER, 1987). Estes elevados níveis de vitamina C nos neutrófilos são pré-requisitos para a sua função e apresentam-se reduzidos quando ocorre a ativação destas células (HEMILÄ *et al.*, 1984). Os neutrófilos ativados utilizam a vitamina C extracelular com o objetivo de minimizar danos causados nos tecidos pela expulsão

de superóxido e hipoclorito, resultantes do metabolismo oxidativo do neutrófilo durante a resposta à inflamação (HEMILÄ *et al.*, 1984).

O ácido ascórbico é acumulado em vários tecidos como as glândulas adrenais, glândula pituitária, cristalino e leucócitos. Para atingir altas concentrações nestes tecidos, o ácido ascórbico é transportado contra gradiente de concentração. Em leucócitos humanos, o ácido ascórbico acumula-se no citosol em concentração 80 vezes maiores que no plasma, segundo MOSER (1987). Resultados de experimentos *in vitro* com granulócitos humanos indicam que existe transporte ativo do ácido ascórbico contra gradiente de concentração e desta forma, os granulócitos são capazes de manter o ácido ascórbico em concentrações 10-15 vezes maiores que no plasma (MOSER e WEBER, 1984). A captação de ácido ascórbico do meio externo pelos granulócitos é inibida competitivamente pela glicose. Os inibidores do transporte de glicose através da membrana também inibem o transporte de ácido ascórbico, indicando que este é transportado através da membrana pelo mesmo transportador da glicose; de forma ativa, saturável e dependente de energia (MOSER e WEBER, 1984).

A administração de dexametasona em vacas causou aumento na migração aleatória de neutrófilos e supressão do metabolismo oxidativo, da iodinação e da citotoxicidade celular dependente de anticorpo nestes neutrófilos. A administração de ácido ascórbico tendeu a reverter os efeitos adversos da dexametasona na migração aleatória de neutrófilos, no metabolismo oxidativo e na citotoxicidade celular dependente de anticorpos, sendo que estes efeitos foram observados de forma dose-dependente (ROTH e KAEBERLE, 1985). Neste mesmo estudo, o ácido ascórbico tendeu a aumentar a ingestão de *Staphylococcus aureus* por neutrófilos em bovinos suplementados. Os resultados apresentados indicam que o ácido

ascórbico, quando injetado subcutaneamente em altas dosagens, é capaz de reverter ou prevenir alguns efeitos imunossupressivos da dexametasona na função neutrofílica em bovinos (ROTH e KAEBERLE, 1985).

3.6. Metabolismo de glicose nos ruminantes

A contribuição da glicose absorvida no intestino delgado no total de glicose circulante em ruminantes é muito baixa. A digestão do amido no duodeno de bovinos pode ser limitada pela forma física do grão. Estudos em animais recebendo dietas com altos níveis de milho mostraram que houve apenas pequeno fluxo líquido positivo de glicose na veia porta ou até mesmo um fluxo negativo de glicose (HUNTINGTON, 1983; HUNTINGTON e PRIOR, 1983; HUNTINGTON *et al.*, 1983; LOMAX *et al.*, 1983; HUNTINGTON, 1994; REYNOLDS e HUNTINGTON, 1988). Em revisão de vários trabalhos de pesquisa, WEEKES (1991) conclui que a contribuição da glicose exógena (da dieta) é muito baixa, ainda que alimentando os animais com elevadas quantidades de concentrados. Em outro trabalho de revisão, NOCEK e TAMMINGA (1991); BRITTON e KREHBIEL (1993) concluíram que existe uma limitada absorção de glicose de origem intestinal, sendo que todo o suprimento de glicose deve ser suprido pela gliconeogênese hepática.

O propionato de origem da fermentação microbiana no rúmen é considerado o principal precursor da glicose em ruminantes. O suprimento de glicose parece não ser diretamente controlado em relação à demanda do animal e sim está linearmente relacionado com o consumo de energia, independentemente da composição da dieta com a disponibilidade de outros precursores para a neoglicogênese (WEEKES, 1991)

O principal determinante da taxa de síntese de leite pela glândula mamária é a retirada de glicose da corrente sanguínea por suas células epiteliais (KRONFELD, 1976). Em trabalho anterior, KRONFELD *et al.* (1968) estimaram que são necessárias 72 gramas de glicose para que a glândula mamária sintetize de 1 kg de leite. A glicose é o principal precursor da lactose (MEPHAN, 1988), a qual por mecanismo osmótico é a principal determinante da produção de leite. O consumo de glicose pela glândula mamária pode representar acima de 80% da quantidade total de glicose plasmática em ruminantes (MEPHAN, 1988).

Nesses animais, cerca de 90% da glicose circulante é originária da gliconeogênese hepática, a qual é realizada a partir de substratos glicogênicos como o ácido propiônico, aminoácidos, lactato e glicerol (YOUNG, 1977; VERNON, 1988; NOCEK e TAMMINGA, 1991) e menos de 10% da glicose utilizada no metabolismo é absorvida do intestino (OTCHERE *et al.*, 1974).

3.6.1 Beta-hidroxibutirato

O β HBA – β -hidroxibutirato - tem sido um dos corpos cetônicos (CC) mais frequentemente medidos no plasma para monitorar o balanço energético e identificar vacas que apresentem o quadro de cetose subclínica (ANDERSON, 1993; MOORE, 1997b). Segundo HERDT (1981), a avaliação de β HBA plasmático em vacas leiteiras é uma variável bastante precisa para detectar cetose.

A acetonemia clínica em vacas lactantes está bem caracterizada quanto aos sintomas clínicos que incluem: hipofagia, queda na produção leiteira, rápida perda de peso, letargia e/ou hiperexcitabilidade; associados a alterações metabólicas tais como: hipercetonemia, hipoglicemia, hipoinsulinemia, baixo glicogênio hepático,

elevadas concentrações de triglicérides no fígado e altas concentrações plasmáticas de AGNE - ácidos graxos não-esterificados - (EMERY *et al.*, 1964). Por outro lado, a acetonemia subclínica – quadro que não há sintomas evidentes da doença – é comum em vacas leiteiras de alta produção, apresentando tão somente leve hipercetonemia, queda moderada na produção de leite e baixas concentrações plasmáticas de glicose (VEENHUIZEN *et al.*, 1991)

Segundo GRUMMER (1993), vacas no início da lactação apresentam concentrações de β HBA plasmático acima de 10 mg/dl, indicando que estes animais encontram-se em balanço energético negativo. Entretanto, o nível limiar de β HBA para separar animais normais e cetóticos é ainda tema de controvérsia. Baseando-se nos trabalhos de NIELSEN *et al.* (1994); DUFFIELD *et al.* (1995) e LAGO (1997) considerou-se no presente estudo que os animais com concentrações plasmáticas de β HBA superiores a 10 mg/dl apresentavam acetonemia.

GRUMMER (1993) aponta a ocorrência de acetonemia em vacas leiteiras, assim como esteatose hepática, durante períodos nos quais há elevação dos níveis circulantes de AGNE. Considerando estes fatores, a susceptibilidade de vacas leiteiras a este distúrbio é maior nos períodos de máxima secreção de leite, nos quais ocorre elevada demanda por glicose e consequentemente a glicemia e insulínia estão diminuídas.

BROCKMAN (1979) registra a presença de níveis mais baixos de β HBA como resultantes de concentrações mais altas de insulina e mais baixos de AGNE. O autor conclui pela ação da insulina em 3 sítios distintos: inibição da lipólise, inibição da cetogênese hepática e aumento da utilização de corpos cetônicos pelos tecidos periféricos.

De acordo com GRUMMER (1993), uma pequena acetonemia de origem da produção de corpos cetônicos (CC) no trato gastrointestinal pode ser considerada normal em ruminantes. Segundo o mesmo autor, níveis de 6,25 mg/dl de β HBA (β -hidroxibutirato) para vacas bem alimentadas podem ser considerados normais, mas em casos de transtornos metabólicos estes valores podem estar aumentados em 5 a 10 vezes.

3.6.2 Ácidos graxos não-esterificados (AGNE)

Os AGNE são a forma de ácidos graxos que são liberados a partir das reservas de tecido adiposo para a corrente sanguínea. Os níveis plasmáticos de AGNE podem ser utilizados como indicadores do metabolismo energético de vacas leiteiras no período pós-parto. Neste período, estes animais apresentam alta demanda energética devido a produção de leite sem, no entanto, ocorrer aumento no consumo de matéria seca (MS), o que leva a intensa mobilização de reservas corporais, principalmente de tecido adiposo, resultando em níveis elevados de AGNE circulantes (KOMARAGIRI e ERDMAN, 1995). Esta intensa mobilização de tecido adiposo leva, então, a infiltração gordurosa no tecido hepático (VASQUEZ-ANON *et al.*, 1994; STUDER *et al.*, 1993).

Estudo realizado no Reino Unido, utilizando técnica de biópsia de fígado, demonstrou que a forma subclínica da infiltração gordurosa no fígado é muito mais frequente que a forma clínica. Os autores relataram que um terço das vacas leiteiras com produções de leite superiores a 5500 kg/lactação são afetadas por esta desordem e que a incidência nos diferentes rebanhos estudados variou de 10 a 50% dos animais (ROBERTS e REID, 1993).

DYK (1995) recomenda a utilização da concentração plasmática de AGNE como indicador da eficácia do programa de nutrição de vacas secas. O autor recomenda que para animais entre 2 e 4 semanas pré-parto as concentrações plasmáticas de AGNE não deveriam ser superiores a 0,325 mEq/L e no período de 14 dias a 4 dias antes do parto estes valores não deveriam ultrapassar 400 mEq/L. Valores acima destes limites recomendados indicam que as vacas encontram-se em balanço energético negativo.

3.6.3 *Escore de condição corporal (ECC)*

O escore de condição corporal (ECC) é uma forma subjetiva de avaliar as reservas energéticas da vaca e tem como princípio a observação visual e palpação de áreas específicas para estimar a quantidade de reservas na forma de tecido adiposo (DOMECK, *et al.*, 1995). As vacas são classificadas, geralmente, numa escala de 5 pontos, sendo que 1 indica uma vaca muito magra e 5, uma vaca muito gorda (EDMONSON *et al.*, 1989). Em estudo sobre a relação entre ECC e quantidade de gordura subcutânea em vacas, DOMECK *et al.* (1995) utilizando a técnica de ultrassonografia, concluíram que o ECC reflete adequadamente as quantidades de reservas de gordura neste tecido.

Vacas que se encontram obesas no periparto mobilizam mais tecido adiposo e apresentam altos níveis de AGNE (PEDRON *et al.*, 1993). De acordo com BERTICS *et al.* (1992); STUDER *et al.* (1993); GRUMMER (1993); VASQUEZ-ANON *et al.* (1994); existe uma relação inversa entre o consumo de matéria seca e os níveis de AGNE nos animais no período pós-parto.

3.6.4 Aspartato aminotransferase (AST)

A aspartato aminotransferase (AST) presente no soro pode ter origem no tecido muscular ou no fígado, não sendo considerada fígado-específica (PEARSON *et al.* 1995). Esta enzima catalisa a transferência de grupos amino de aminoácidos para cetoácidos.

De acordo com extenso trabalho de ROUSSEL *et al.* (1982), a atividade sérica de AST não apresentou variações entre vacas de 1 a 3 anos de idade, sendo que após 3 anos houve pequeno aumento na atividade sérica de AST. SOUZA (1997) estabelecendo valores de referência para atividade sérica de AST, determinou que em bovinos criados no estado de São Paulo, a média para o nível sérico de AST foi de 36,5 UI/l, destacando que o nível de AST aumentou significativamente com o aumento da idade dos animais.

Segundo ROBERTS e REID (1993), alterações na atividade sérica de AST podem estar associadas a alterações na função hepática devido a infiltração gordurosa do fígado em vacas leiteiras. Ainda que a AST não seja fígado-específica, os autores mencionam que esta enzima pode estar associada a síndrome do fígado gordo, visto que enzimas específicas do fígado – ornitincarbamil transferase (OCT) e glutamato desidrogenase (GDH) – parecem não ser indicadores confiáveis da presença de infiltração gordurosa no fígado em vacas leiteiras (MOORE, 1997a).

A atividade de AST (aspartato-aminotransferase) tem sido, também, utilizada como indicador do aumento da atividade gliconeogênica. De acordo com REID *et al.* (1986), os níveis plasmáticos de AST em conjunto com AGNE e níveis de glicose podem ser utilizados para estimar a extensão da infiltração de gordura no tecido hepático. MOORE (1997a), relata, entretanto, que o diagnóstico definitivo da

síndrome do fígado gordo em vacas leiteiras só pode ser feito através do exame de biópsia hepática, ainda que tal procedimento seja demorado e caro.

3.7 Insulina

A insulina é produzida pelas células beta do pâncreas e sua liberação para a corrente sanguínea é estimulada pelo aumento da glicemia, de aminoácidos circulantes e de ácidos graxos. A insulina é um hormônio protéico composto de duas cadeias que são interligadas por duas pontes dissulfeto. A cadeia A consiste de 21 resíduos de aminoácidos e a cadeia B de 30. O peso molecular de um monômero de insulina é de aproximadamente 6.000 Daltons (BENTLEY *et al.* 1992). Algumas células não requerem a insulina para o transporte de glicose para dentro do citoplasma, tais como hemácias e a maioria das áreas do cérebro (TURNWALD e TROY, 1983).

A insulina apresenta ampla gama de efeitos em animais monogástricos, atuando sobre uma variedade de tecidos, dentre os quais, o músculo esquelético, tecido adiposo, fígado, glândula mamária e apresenta atividade sobre outros processos incluindo o transporte de glicose nas membranas, ativação de atividade enzimática e/ou estimulando a síntese de enzimas. Em ruminantes a insulina apresenta efeitos similares, no entanto, os seus efeitos sobre os tecidos adiposo e muscular são geralmente menores que aqueles observados em animais de laboratório – rato e camundongo. Por outro lado, a glândula mamária dos ruminantes em lactação apresenta-se insensível à insulina, ainda que este órgão apresente receptores para este hormônio (VERNON e SASAKI, 1991)

Esta resposta diminuída à insulina em tecidos de ruminantes tem sido atribuída ao padrão de alimentação e atividade ruminal nestes animais; ambos

atuando de forma a minimizar a entrada de nutrientes na corrente sanguínea, em especial quanto à glicose, resultando em menor estímulo à síntese e liberação de insulina, a qual atua com o objetivo de armazenar nutrientes em excesso – na forma de glicogênio e gordura (VERNON e SASAKI, 1991).

O mecanismo de ação da insulina pode ocorrer de duas formas: através da ligação da insulina ao receptor de membrana e ativação de um segundo mensageiro (fosfatidil inositol), o qual atua fosforilando enzimas ligadas ao metabolismo energético e assim estimulando ou não a atividade enzimática; ou através da internalização do complexo receptor-insulina que possibilitaria a insulina agir em organelas intracelulares tais como o núcleo, onde este hormônio estimularia a transcrição de uma variedade de genes (GOLDFINE, 1987).

Estudos *in vitro* demonstraram que a insulina atua em adipócitos causando aumento na utilização de glicose e acetato (VERNON e TAYLOR, 1988), lipogênese, síntese protéica e ativação da enzima acetil-CoA carboxilase (VERNON e FINLEY, 1988). Nos músculos esqueléticos, a insulina aumenta a captação de glicose (VERNON e SASAKI, 1991). Em comparação com ratos, parece não haver quaisquer diferenças no número ou afinidade de receptores de insulina nos músculos esqueléticos de ovelhas. Sendo assim, diferenças entre estas espécies podem ser devido a diferenças na capacidade de utilização de glicose pelo tecido muscular (SASAKI, 1989).

Trabalhando com animais de laboratório, VERNON (1989) demonstrou que a lactação causa alteração na responsividade dos tecido adiposo e muscular à insulina. Estas adaptações podem ser mecanismos pelos quais os nutrientes são desviados para a glândula mamária. Os fatores responsáveis pela alteração da

responsividade do tecido adiposo à insulina em ruminantes em lactação não foram completamente elucidados, mas parece existir interferência da somatotropina.

O metabolismo pós-parto em ratas lactantes parece ser altamente regulado pelas concentrações de insulina e glucagon (KELLY *et al.*, 1991). Durante o início da lactação em vacas leiteiras, a relação insulina:glucagon é deprimida e, ainda que ocorra aumento dos níveis de insulina após 4 semanas de lactação (KENNEDY *et al.*, 1987), estes níveis são menores que os de animais não lactantes (SARTIN *et al.* 1988).

A concentração de insulina aumenta ininterruptamente de 50 a 300 dias de lactação e parece estar inversamente correlacionada com a produção de leite (HERBEIN *et al.* 1985).

O efeito do tipo de alimentação sobre a ação da insulina em ruminantes tem sido estudado. Ovelhas alimentadas com gramíneas ou silagem de milho não apresentaram diferenças na sensibilidade ou resposta da insulina à utilização de glicose, indicando que a dieta apresenta efeitos limitados sobre a ação da insulina em ruminantes (JANES *et al.* 1985). Contrariando os resultados acima, KELLY *et al.* (1991) apontam que os níveis de insulina são altamente sensíveis ao plano de nutrição. Tanto a glicose como o propionato estimulam a secreção de insulina pelo pâncreas (CHANDLER, 1997). Em ruminantes, a diminuição dos níveis de insulina circulantes estimula a síntese de glicose no fígado (HERBEIN, *et al.*, 1985), ainda que o número de receptores para insulina nos hepatócitos não se altere durante a lactação.

A relação insulina:glucagon é diminuída durante a lactação, possibilitando o aumento da concentração de glicose plasmática circulante disponível para os altos requerimentos de glicose pelas células da glândula mamária (KELLY, *et al.*, 1991).

3.8 Contagem de células somáticas (CCS)

A contagem de células somáticas do leite é o parâmetro mais universalmente utilizado como indicador de ocorrência de mastite (NMC, 1996; SMITH e HOGAN, 1998). De acordo com PHILPOT e NICKERSON (1991), mastite é uma reação inflamatória da glândula mamária. Esta resposta inflamatória consiste na reação dos tecidos secretores de leite devido a uma injúria traumática ou pela presença de microrganismos que conseguiram ultrapassar a barreira do esfíncter do teto e ganharam o interior da glândula mamária.

A contagem de células somáticas em amostras de leite compostas pode ser usada como um indicador da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária (RENEAU, 1988). O aumento das células somáticas no leite é um indicativo de uma resposta inflamatória da glândula mamária. Esta inflamação interfere na síntese de leite pela glândula mamária e está associada à diminuição da gordura, lactose e da proteína do leite (BARTLET *et al.*, 1990; MITCHELL *et al.* 1986).

A contagem de células somáticas (CCS) do leite consiste de vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos e pequena porcentagem de células epiteliais. Na glândula mamária sadia, o total da CCS é normalmente menor que 200.000 cel/ml de leite (SORDILLO *et al.* 1997). Durante a ocorrência de uma infecção intramamária, no entanto, a CCS total pode aumentar acima de 1.000.000 cel/ml dentro de poucas horas (PAAPE *et al.* 1981; PERSSON *et al.* 1992).

Segundo o NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1996), contagens de células somáticas acima de 200.000 células/ml são indicativos da presença de processo inflamatório da glândula mamária.

Algumas bactérias liberam subprodutos do seu metabolismo – enterotoxinas ou componentes das paredes celulares – durante a colonização e crescimento na glândula mamária. Estes fatores bacterianos podem direta ou indiretamente servir como fatores quimiotáticos para os leucócitos. A migração de leucócitos da corrente sanguínea para dentro da glândula mamária pode eliminar o estímulo inflamatório (bactéria), o que conseqüentemente leva a diminuição da CCS para níveis normais. Entretanto, se esta resposta inflamatória continua por tempo prolongado, podem ocorrer danos ao epitélio secretor, resultando em diminuição da produção de leite (HARMON e HEALD, 1982; SORDILLO *et al.* 1992).

Os macrófagos são o tipo celular predominante na glândula mamária sadia, tanto durante a lactação como período seco (LEE *et al.*, 1980; SORDILLO *et al.*, 1989; SORDILLO *et al.*, 1987; JENSEN e EBERHART, 1981), enquanto que os neutrófilos são o tipo celular predominante encontrados em tecidos e nas secreções mamárias durante as fases iniciais do processo inflamatório e podem constituir acima de 90% do total da CCS (PAAPE *et al.*, 1981; SORDILLO *et al.*, 1987; SORDILLO *et al.*, 1989). Uma vez no sítio da infecção, os neutrófilos fagocitam e eliminam as bactérias presentes. Estas células executam esta função bactericida através da produção de radicais livres altamente reativos como a hidroxila, o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (SORDILLO *et al.*, 1997). Desta maneira para que os neutrófilos apresentem sua função bactericida otimizada, faz-se necessário a existência de sistemas antioxidantes que confirmam

proteção às membranas e macromoléculas destas células contra a ação deletéria dos radicais livres.

4 MATERIAL E MÉTODO

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Animais

Foram utilizadas 193 vacas (40 vacas secas e 153 em lactação) da raça Holandesa, de origem de 3 fazendas produtoras de leite tipo A e B, localizadas nos municípios de Caçapava-SP (Fazenda A), Tietê-SP (Fazenda B) e Piracicaba (Fazenda C). As vacas amostradas foram distribuídas em diversos estágios de lactação, de acordo com a Tab. 1.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS VACAS AMOSTRADAS DE ACORDO COM O ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E COM O NÚMERO DE LACTAÇÕES

Número de lactações	Estágio de Lactação (dias)				
	Estágio 1 1-28	Estágio 2 29-56	Estágio 3 57-140	Estágio 4 141-280	Estágio 5 Período Seco
Primíparas	10	12	11	16	11
Multiparas	26	26	26	26	29
Total	36	38	37	42	40

4.2 Instalações

Os animais em lactação foram alojados em sistema de confinamento total e no período seco, permaneceram em piquetes com a alimentação oferecida no cocho, de acordo com a seguinte distribuição:

1. Fazenda A (Caçapava-SP)

Vacas em lactação: sistema de confinamento em piquetes.

2. Fazenda B (Tietê-SP)

Vacas em lactação: sistema de confinamento do tipo estabulação livre (Free-stall).

3. Fazenda C (Piracicaba-SP)

Vacas em lactação: sistema de confinamento do tipo estabulação livre (Free-stall).

4.3 Tratamentos e delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento experimental tipo blocos ao acaso generalizados (PIMENTEL GOMES, 1985), onde os blocos foram formados pelas fazendas, avaliando-se as diferenças entre os estágios de lactação e número de lactações (primíparas e múltiparas). As variáveis analisadas foram:

- Concentração plasmática ácido ascórbico
- Concentração plasmática de glicose
- Concentração sérica de insulina
- Concentração plasmática de AGNE (ácidos graxos não-esterificados)
- Concentração plasmática de Beta-hidroxibutirato (β HBA)
- Atividade sérica de aspartato-aminotransferase (AST)
- Contagem de células somáticas (CCS) no leite
- Produção de leite
- Escore de condição corporal

4.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), verificando-se anteriormente a

normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste F. Os dados que não atenderam estas premissas foram então submetidos a transformação logarítmica $[\text{Log}(X+1)]$ ou pela raiz quadrada $[\text{RQ}(x+1/2)]$. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (PROC GLM). Adotou-se o nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

TABELA 2 - ESQUEMA DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM DELINEAMENTO EM BLOCOS CASUALISADOS GENERALIZADOS

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Estágio de lactação (E)	4
Estágio 5 X Estágios 1, 2, 3 e 4	(1)
Estágios 1 e 2 X Estágios 3 e 4	(1)
Estágio 1 X Estágio 2	(1)
Estágio 3 X Estágio 4	(1)
Blocos generalizados (B)	5
Número de lactações (L)	(1)
Fazenda (F)	(2)
L X F	(2)
E X B	20
E X L	(4)
E X F	(8)
E X L X F	(8)
Resíduo	163
Total	192

O teste dos efeitos de estágio de lactação sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico foi realizado com o uso de contrastes ortogonais comparando-se:

- Vacas secas (Estágio 5) X Vacas em lactação (Estágios 1, 2, 3 e 4)
- Estágios 1 e 2 X Estágios 3 e 4
- Estágio 1 X Estágio 2
- Estágio 3 X Estágio 4

Os coeficientes utilizados para o teste de efeito de estágio de lactação sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico (contrastes ortogonais) são apresentados na Tab. 3:

TABELA 3 - COEFICIENTES DE CONTRASTES ORTOGONAIS PARA SEPARAÇÃO DE EFEITOS DE ESTÁGIOS DE LACTAÇÃO, PIRASSUNUNGA - 1998

<i>Contrastes</i>	Estágio de Lactação (dias)				
	Estágio 1 (1-28)	Estágio 2 29-56	Estágio 3 57-140	Estágio 4 141-280	Estágio 5 Período Seco
Secas * Lactação	1	1	1	1	-4
Estágios 1 e 2 X Estágios 3 e 4	1	1	-1	-1	0
Estágio 1 X Estágio 2	1	-1	0	0	0
Estágio 3 X Estágio 4	0	0	1	-1	0

A comparação das médias entre fazendas foi realizada com uso do teste de Tukey.

A associação linear entre a variável concentração plasmática de ácido ascórbico e as demais (concentração plasmática de glicose; concentração sérica de insulina; concentração plasmática de AGNE, concentração plasmática de β -hidroxibutirato, atividade sérica de aspartato-aminotransferase, produção de leite, CCS e escore de condição corporal) foi feita através da análise de correlação. Adicionalmente, foi realizada a análise de regressão múltipla incluindo todas as

variáveis do modelo estatístico, buscando identificar qual o parâmetro que melhor explica a variabilidade observada na concentração plasmática de ácido ascórbico, através do valor do coeficiente de determinação (R^2). Para tal análise foi utilizada a função SELECTION do procedimento PROC REG do Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985) para seleção, dentro do modelo completo, das variáveis que apresentaram maiores coeficientes de determinação (R^2), e que desta forma, estariam contribuindo para explicar a variabilidade dos dados obtidos de concentração plasmática de ácido ascórbico.

4.5 PROCEDIMENTOS DE COLETAS E MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Metodologia de coleta de plasma para determinação de ácido ascórbico

Coleta de sangue: foram coletados de 10 ml de sangue por punção venosa da veia caudal com agulha e tubos estéreis do tipo Vacutainer (Becton Dickinson, New Jersey, NJ, USA), utilizando-se heparina como anticoagulante. Após a coleta do sangue foi conservado em gelo fundente até a centrifugação (1800 G por 15 minutos) para a separação do plasma. Após a centrifugação, foi coletado 1,0 ml de plasma, utilizando-se pipeta automática, e transferindo-se para tubos especiais para criogenia. As amostras de plasma foram então estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até a determinação do ácido ascórbico.

4.5.2 Metodologia para determinação de ácido ascórbico plasmático

As concentrações plasmáticas de ácido ascórbico foram determinadas utilizando-se a técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromotography), segundo procedimento descrito por WAYNER e BURTON (1989). Os procedimentos de determinação do ácido ascórbico foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da FCF-USP.

A técnica de cromatografia líquida de alta pressão consiste no emprego de alta pressão aplicada a uma amostra biológica e um solvente, os quais passam através de uma coluna de separação. Esta coluna é feita de aço inoxidável sendo adequada para suportar elevadas pressões. O fluxo de passagem do solvente é mantido constante e a detecção da substância é feita por um detector.

4.5.2.1 Equipamentos utilizados na metodologia de HPLC

Foi utilizado um espectrofotometto modelo Lambda-Max 481RC (Waters Milford, MA, USA), conectado a um sistema de bombas Waters 600E (Millipore Co., Milford, MA, USA), o qual era equipado com um injetor para cromatografia líquida Rheodyne 7161 (Cotati, CA, USA). A separação do ácido ascórbico foi feita por uma coluna Ultracarb C18, 5 μ m, 250 X 4,6 mm (Phenomenex – Torrance, CA, USA). Os resultados foram processados por um integrador Waters 746 Data Module (Millipore Co., Milford, MA, USA).

A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido metafosfórico a 0.9%, com taxa de fluxo de 0,7 ml/minuto. O volume injetado da amostra de plasma foi de 20 µl e o detector UV (ultravioleta) foi ajustado à 340 nm.

4.5.2.2 Procedimento de extração

Uma alíquota de 300 µl de amostra de plasma foi misturado a 900 µl de solução de ácido metafosfórico 10% em microtubos para a precipitação das proteínas do plasma. Em seguida foi feita a agitação em vortex por 1 minuto e centrifugação por 2 minutos a 2000 G. Ao volume de 200 µl do sobrenadante foi adicionado 600 µl de solução de ácido metafosfórico 0,9% e agitado em vortex por 20 segundos. O sobrenadante foi então filtrado, utilizando microfiltros (5 µm), e centrifugado a 2000 G por 2 minutos.

4.5.2.3. Determinação da concentração de ácido ascórbico

As concentrações de ácido ascórbico foram calculadas baseadas nas concentração da solução padrão. A determinação do pico de ácido ascórbico das amostras foi realizada por comparação com os tempos de retenção e pela área dos picos da solução padrão. O tempo de retenção do ácido ascórbico utilizando a coluna , C18, 5 µm, 250 X 4,6 mm, foi de aproximadamente 7 minutos, conforme pode ser visualizado na Fig. 2.

FIGURA 2 – A: MODELO DE CROMATOGRAMA PARA ÁCIDO ASCÓRBICO PADRÃO NA CONCENTRAÇÃO 25 mg/l, TEMPO DE RETENÇÃO = 6,78 MINUTOS; B: MODELO DE CROMATOGRAMA PARA ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRA DE PLASMA, NA CONCENTRAÇÃO DE 3,09 mg/l E TEMPO DE RETENÇÃO DE 6,81 MINUTOS.

4.5.3 Metodologia para coleta de sangue para determinação plasmática de glicose, β HBA e AGNE

Foi coletada uma alíquota de 1 ml de plasma para cada análise a ser realizada (glicose, β HBA e AGNE), sendo cada alíquota transferida para microtubos do tipo Eppendorff e congelada a - 22 °C até a análise.

4.5.4 Metodologia para determinação de glicose

De acordo com TURNWALD e TROY (1983), devem ser tomados cuidados especiais quanto a contenção e manuseio do animal antes da coleta de sangue para análise de glicose, uma vez que se houver liberação de epinefrina na corrente sanguínea do animal (reação de luta ou fuga), ocorrerá rápida glicogenólise e consequentemente rápida elevação da glicemia podendo levar a falsos resultados.

Para a precisa determinação da glicemia é de extrema importância a imediata separação do plasma das células sanguíneas ou a remoção do soro dentro de no máximo 30 minutos após a coleta, evitando-se ao máximo que ocorra a glicólise pelas células sanguíneas (ROUSSEL *et al.*, 1997).

A concentração plasmática de glicose foi determinada utilizando o kit Glucose Merck System (Diagnostica Merck, Darmstadt, Germany), lote 14125. Tal método baseia-se na oxidação da glicose pela glicose oxidase, segundo descrição de BARHAM e TRINDER (1972). As análises foram executadas utilizando analisador bioquímico automático modelo Technicon RA 100 (Technicon Instruments Co., Tarrytown, NY, USA), o qual expressa os resultados em mg/dl. O controle de qualidade das reações realizadas para a análise da concentração plasmática de

glicose foi feito com a utilização de soros controles comerciais (Precinorm U n° 18672101 e Precipath U n° 48526262, Boehringer Mannheim, , GmbH, Germany).

4.5.5 Metodologia para determinação de β HBA

As concentrações plasmáticas de β HBA foram determinadas utilizando o kit n° 310-A UV (Sigma Diagnostics, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA), lote 125H6077, vencimento junho/97, que se baseia no método enzimático descrito por WILLIANSO *et al.* (1962). As análises foram executadas utilizando analisador bioquímico automático modelo Technicon RA 100 (Technicon Instruments Co., Tarrytown, NY,USA), o qual expressa os resultados em mg/dl.

4.5.6 Metodologia para determinação plasmática de AGNE

As concentrações plasmáticas de AGNE (ácidos graxos não-esterificados) foram determinadas utilizando-se o kit Wako Nefa C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), lote 14H6-3, que se baseia no método quantitativo *in vitro*, enzimático e colorimétrico, adaptado para ser usado em placas de microtítulo e posterior leitura em aparelho do tipo "ELISA Reader", o qual apresenta os resultados em mg/dl.

4.5.7 Metodologia para coleta de sangue para determinação sérica de AST e insulina

Após a coleta do sangue por punção venosa utilizando tubos estéreis do tipo Vacuntainer SST com gel separador (Becton Dickinson, New Jersey, NJ, USA), a amostra de sangue ficou em repouso por 30 minutos e em seguida foi centrifugada por 15 minutos a 900 G. Foi então retirada uma alíquota de 1,5 ml de soro, a qual foi estocada em microtubos e congelada a - 20°C até a análise da atividade de AST (aspartato-aminotransferase) e concentração de insulina.

4.5.8 Metodologia para determinação de AST

A determinação da atividade enzimática de AST (aspartato-aminotransferase) foi realizada utilizando o kit MR1 (Boehinger Mannheim, GmbH, Germany), lote 67253801, vencimento maio/98, que se baseia na metodologia cinética otimizada preconizada pela INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY (IFCC, 1975). As análises foram executadas utilizando analisador bioquímico automático modelo Technicon RA 100 (Technicon Instruments Co., Tarrytown, NY, USA), o qual expressa os resultados em unidades internacionais (UI/l).

O método baseia-se na ação catalítica do AST sobre alfacetoglutarato e o L-aspartado, originando o L-glutamato e oxalacetato; esta última substância é convertida em L-malato pela ação da malato desidrogenase, sendo que nesta etapa da reação ocorre, simultaneamente, a oxidação de NADH a NAD⁺ ocasionando diminuição na absorção de luz, em comprimento de onda de 340 nm (BERGMEYER,

1974). O controle de qualidade das reações realizadas para a análise da atividade sérica de AST foi feito com a utilização de soros controles comerciais (Precinorm U nº 18672101 e Precipath U nº 48526262, Boehringer Mannheim, , GmbH, Germany).

4.5.9 Metodologia para determinação de insulina

A concentração sérica de insulina foi determinada, em duplicata, através da técnica de radioimunoensaio (RIA) utilizando o kit comercial Insulina CAC, em fase sólida (Coat-a-Count®, Diagnostics Co., Los Angeles, CA , USA), lote TNI 1238, vencimento 31/07/98.

O RIA em fase sólida consiste na competição entre a insulina marcada com I^{125} e a insulina da amostra por um sítio de ligação num anticorpo específico para insulina, por um período determinado de tempo. O anticorpo é imobilizado na parede do tubo de polipropileno, desta forma, efetuando-se a decantação, ocorre bloqueio da competição entre a insulina marcada e a da amostra. A mensuração da emissão de radiação do tubo após a decantação em um aparelho tipo "gama counter" (Cobra Auto-Gamma Counting Systems – modelo 5002/5003, Packard Instrument Company) produz resultados que podem ser convertidos utilizando-se uma curva de calibração para medir a concentração de insulina presente na amostra.

Amostras padronizadas de insulina, analisadas para controle de qualidade do ensaio, foram realizadas 3 vezes a cada ensaio: no início, meio e fim (DPC nº COM6, Coat-a-Count®, Diagnostics Co., Los Angeles, CA , USA). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram menores que 5 %.

4.5.10 Metodologia para coleta de leite e CCS

Foram coletadas amostras compostas de leite, de todos os quartos e de todas as ordenhas em frasco de plástico e conservadas em dicromato de potássio. As amostras de leite foram enviadas por transporte aéreo para o Programa de Análises de Rebanhos Leiteiros do Paraná - PARLPR para a realização da Contagem eletrônica de Células Somáticas no Leite, utilizando o equipamento Bentley Somacount 500 (Bentley Instruments Inc. Chasca, MN, USA). Os resultados são expressos em número de células/ml de leite e depois transformadas em escala logarítmica.

4.5.11 Metodologia para avaliação do escore de condição corporal (ECC)

No momento da coleta de sangue para as demais análises, o animal foi avaliado quanto ao ECC. Foi utilizada a metodologia descrita por WEAVER (1986), que classifica os animais quanto ao ECC em escala de 1 a 5 (1=muito magra; 5=muito gorda). Com o objetivo de minimizar o efeito subjetivo deste parâmetro, todas as avaliações foram realizadas pela mesma pessoa.

4.5.12 Análise bromatológica das dietas

Foram realizadas análises bromatológicas mensais da dieta de cada lote de animais em cada fazenda participante do experimento, durante o período de coleta de amostras de sangue. Todas as fazendas utilizavam dietas a base de silagem de

milho como volumoso e mistura de concentrados em sistema de alimentação do tipo ração completa. Foram coletadas amostras da dieta imediatamente após o fornecimento em diversos pontos no cocho e analisadas para:

1. Matéria seca (MS)
2. Proteína bruta (PB)
3. Fibra detergente neutro (FDN)
4. Fibra detergente ácido (FDA)
5. Extrato etéreo (EE)
6. Matéria mineral (MM)
7. Cálcio (Ca)
8. Fósforo (P)

6. RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Concentração plasmática de ácido ascórbico

As médias das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico em função do estágio de lactação e número de lactação são apresentados nas Tab. 5, 6 e nas Fig. 3 e 5. Não houve efeito do estágio de lactação ($P=0,8538$), do número de lactações ($P=0,3005$) e das interações estágio de lactação*número de lactações ($P=0,9148$), estágio de lactação*fazenda ($P=0,3421$), número de lactações*fazenda ($P=0,3794$) e estágio de lactação*número de lactações*fazenda ($P=0,8823$). No entanto, foi observado efeito significativo da fazenda sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico ($P=0,0001$), conforme indicado na Tab. 7 e Fig 6. Os efeitos do número de lactação, estágio de lactação e interações estão sumarizados na Tab. 4.

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	<i>P</i>
Estágio de lactação (E)	0,8538
Número de lactações (L)	0,3005
Fazenda (F)	0,0010
E X L	0,9148
E X F	0,3421
L X F	0,3794
E X L X F	0,8823

TABELA 5 - EFEITO DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO (DIAS) SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l), GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ EQ/L), β HBA (mg/dl), AST (UI/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia), CCS (log cel/ml X 1000), ECC (ESCALA DE 1 A 5), VALORES DE P E ERRO PADRÃO DA MÉDIA

Variável*	Estágio de Lactação (dias)					Média	P	Erro Padrão da Média
	1-28	29-56	57-140	141-280	Secas			
A.A.	2,67	2,60	2,46	2,63	2,60	2,59	0,8538	0,0693
AGNE	0,308	0,250	0,225	0,192	0,246	0,243	0,0063	0,0095
AST	27,78	28,89	30,46	30,13	26,8	28,78	0,1709	0,536
β HBA	5,562	5,389	5,194	5,439	4,517	5,209	0,0671	0,1423
CCS	5,26	4,83	5,03	5,21	-	5,07	0,1544	0,1266
ECC	3,35	3,32	3,49	3,88	4,09	3,64	0,0001	0,054
Glicose	55,06	57,57	54,58	59,16	66,21	58,67	0,0001	0,8667
Insulina	10,37	16,23	15,79	27,78	13,33	16,93	0,0001	0,2487
Leite	26,88	29,04	25,00	18,6	-	24,94	0,0001	0,7687

* A.A.: ácido ascórbico, AGNE: ácidos graxos não-esterificados, AST: aspartato aminotransferase, β HBA: betahidroxibutirato, Leite: produção de leite, CCS: contagem de células somáticas, ECC: escore de condição corporal.

FIGURA 3 – ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/dl): EFEITO DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO (DIAS)

FIGURA 4 – GRÁFICO DE DISPERSÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l) E DIAS EM LACTAÇÃO.

TABELA 6 - EFEITO DE NÚMERO DE LACTAÇÕES (MULTÍPARA OU PRIMÍPARA) SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l), GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ Eq/l), β HBA (mg/dl), AST (UI/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia), CCS (log cel/ml X 1000), ECC (ESCALA DE 1 A 5), VALORES DE P E ERRO PADRÃO DA MÉDIA

Variável*	Número de Lactações ¹			P	Erro Padrão da Média
	Primipar	Multipar	Média		
A.A.	2,52	2,63	2,59	0,300	0,0693
AGNE	0,222	0,252	0,243	0,1375	0,0095
AST	29,57	28,44	28,78	0,5191	0,536
β HBA	5,109	5,254	5,209	0,7143	0,1423
CCS	4,77	5,21	5,07	0,4459	0,1266
ECC	3,60	3,66	3,64	0,1375	0,054
Glicose	58,72	58,66	58,67	0,023	0,8667
Insulina	14,73	17,91	16,93	0,2487	0,2487
Leite	20,58	26,94	24,94	0,0001	0,7687

* A.A.: ácido ascórbico, AGNE: ácidos graxos não-esterificados, AST: aspartato aminotransferase, β HBA: betahidroxibutirato, Leite: produção de leite, CCS: contagem de células somáticas, ECC: escore de condição corporal.

¹ Primipar: primíparas, Multipar: múltiparas.

FIGURA 5 – ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/dl): EFEITO DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

TABELA 7 - EFEITO DE FAZENDA (A, B OU C) SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO (mg/l), GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ Eq/l), β HBA (mg/dl), AST (UI/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia), CCS (log cel/ml X 1000), ECC (ESCALA DE 1 A 5), VALORES DE P E ERRO PADRÃO DA MÉDIA

Variável*	Fazenda ¹			Média	P	Erro Padrão da Média
	A	B	C			
A.A.	2,69 ^a	2,88 ^a	2,16 ^b	2,59	0,001	0,0693
AGNE	0,211	0,227	0,290	0,243	0,1424	0,0095
AST	27,25	29,03	30,15	28,78	0,1880	0,5360
β HBA	4,676 ^b	5,687 ^a	5,298 ^{ab}	5,209	0,0132	0,1423
CCS	5,83 ^a	4,29 ^b	5,24 ^a	5,07	0,0002	0,1266
ECC	3,91 ^a	3,39 ^b	3,64 ^{ab}	3,64	0,0003	0,0540
Glicose	54,40 ^b	51,79 ^b	71,05 ^a	58,67	0,0001	0,8667
Insulina	14,42	19,73	16,82	16,93	0,0629	1,026
Leite	26,81 ^a	28,09 ^a	21,58 ^b	24,94	0,0004	0,7687

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente para teste Tukey (P < 0,05).

* A.A.: ácido ascórbico, AGNE: ácidos graxos não-esterificados, AST: aspartato aminotransferase, β HBA: betahidroxibutirato, Leite: produção de leite, CCS: contagem de células somáticas, ECC: escore de condição corporal.

FIGURA 6 – ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/dl): EFEITO DE FAZENDA AMOSTRADA

TABELA 8 - EFEITO DO ESTÁGIO DE LACTAÇÃO SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE (mg/dl), INSULINA (μ UI/l), AGNE (μ Eq/l), PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia) E ECC; PROBABILIDADES DO EFEITO DO ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E PROBABILIDADES (P) DA SEPARAÇÃO DOS EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO ATRAVÉS DE CONTRASTES ORTOGONAIS

Variável	Estágio de Lactação (dias)					<i>P</i>	Contrastes Ortogonais				(P)
	1-28	29-56	57-140	141-280	Secas		Sec*Lac	1e2*3e4	1*2	3*4	
AGNE	0,308	0,250	0,225	0,192	0,246	0,0063	0,2452	0,004	0,0379	0,184	
ECC	3,35	3,32	3,49	3,88	4,09	0,0001	0,0001	0,0001	0,792	0,0424	
Glicose	55,10	57,60	54,58	59,16	66,21	0,0001	0,001	0,71	0,2988	0,009	
Insulina	10,37	16,23	15,79	27,78	13,33	0,0001	0,0192	0,0001	0,0029	0,0016	
Leite	26,88	29,04	25,00	18,60	-	0,0001	-	0,0035	0,0233	0,0102	

Sec*Lac: Secas*Lactação; 1e2*3e4: Estágio 1 e 2* Estágio 3 e 4; 1*2: Estágio 1*Estágio 2; 3*4: Estágio 3*Estágio 4

5.2 Concentração plasmática de glicose

As médias das concentrações plasmáticas de glicose distribuídas em função do estágio de lactação e número de lactações são apresentados nas Tab. 5 e 6. As concentrações plasmáticas de glicose sofreram variação de acordo com o estágio de lactação ($P=0,0001$), assim como do número de lactações ($P=0,0226$). Foi identificado efeito altamente significativo da fazenda sobre a concentração plasmática de glicose ($P=0,0001$) – Tab. 7. Os efeitos das interações estão sumarizados na Tab. 9. A separação dos efeitos do estágio de lactação sobre a concentração plasmática de glicose foi realizada através da análise dos contrastes ortogonais, conforme apresentado na Tab. 8.

TABELA 9 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE (mg/dl): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	<i>P</i>
Estágio de lactação (E)	0,0001
Número de lactações (L)	0,0226
Fazenda (F)	0,0001
E X L	0,0185
E X F	0,3356
L X F	0,5543
E X L X F	0,3663

5.3 Concentração sérica de insulina

Os dados referentes a concentração sérica de insulina sofreram transformação em logaritmo natural para a realização da análise de variância. As

médias das concentrações séricas de insulina em função do estágio de lactação, número de lactações e fazenda estão sumarizados nas Tab. 5, 6 e 7.

Foi observado efeito significativo do estágio de lactação ($P=0,0001$), entretanto não foram identificadas diferenças entre vacas primíparas e multíparas ($P=0,2487$). Os efeitos do estágio de lactação, número de lactação, fazenda e interações estão apresentados na Tab. 10.

A separação dos efeitos do estágio de lactação sobre a concentração sérica de insulina foi realizada através de contrastes ortogonais, que são apresentados na Tab. 8.

TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE INSULINA ($\mu\text{UI/l}$): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	<i>P</i>
Estágio de lactação (E)	0,0001
Número de lactações (L)	0,2487
Fazenda (F)	0,0629
E X L	0,9234
E X F	0,0396
L X F	0,8879
E X L X F	0,0015

5.4 Concentração plasmática de ácidos graxos não-esterificados (AGNE)

As médias das concentrações plasmáticas de AGNE distribuídas em função do estágio de lactação e número de lactações estão resumidas nas Tab. 5 e 6. O estágio de lactação apresentou efeito estatisticamente significativo ($P=0,0063$),

sendo que não foi observada diferença significativa em relação ao número de lactações ($P=0,1375$). Foi realizada a separação dos efeitos dos estágios de lactação através de contrastes ortogonais, sumarizados na Tab. 8. Os efeitos da fazenda e das interações são apresentados na Tab. 11.

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS NÃO-ESTERIFICADOS - AGNE ($\mu\text{Eq/l}$): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	<i>P</i>
Estágio de lactação (E)	0,0063
Número de lactações (L)	0,1375
Fazenda (F)	0,1424
E X L	0,4501
E X F	0,0707
L X F	0,0375
E X L X F	0,2110

5.5 Concentração plasmática de β -hidroxibutirato (βHBA)

As médias das concentrações plasmáticas de βHBA em função do estágio de lactação e número de lactações são apresentadas nas Tab. 5 e 6. A distribuição das concentrações plasmáticas de βHBA em função das fazendas amostradas podem ser visualizadas nas Tab. 7. Foi observada uma tendência de efeito do estágio de lactação sobre a concentração plasmática de βHBA ($P=0,0671$). No entanto, não houve efeito do número de lactações ($P=0,7143$) sobre este parâmetro. Observou-se efeito significativo da fazenda sobre a concentração plasmática de βHBA e nenhuma das interações foi estatisticamente significativa, como sumarizado na Tab. 12.

TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE β HBA (mg/dl): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	<i>P</i>
Estágio de lactação (E)	0,0671
Número de lactações (L)	0,7143
Fazenda (F)	0,0132
E X L	0,5727
E X F	0,1618
L X F	0,6972
E X L X F	0,5386

5.6 Atividade sérica de aspartato-aminotransferase (AST)

A distribuição da atividade sérica de AST em função do estágio de lactação e número de lactações pode ser sumarizada nas Tab. 5 e 6. O efeito da fazenda sobre a atividade sérica de AST está apresentada na Tab. 7. Não foi observado nenhum efeito de tratamento, fazenda ou interações sobre este parâmetro (Tab. 13).

TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE AST (UI/l): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	<i>P</i>
Estágio de lactação (E)	0,1709
Número de lactações (L)	0,5191
Fazenda (F)	0,1880
E X L	0,4496
E X F	0,9827
L X F	0,7806
E X L X F	0,6698

5.7 Contagem de células somáticas no leite (CCS)

Os resultados da contagem de células somáticas no leite foram transformados em escala logarítmica para a realização da análise estatística. Os dados da CCS em função do estágio de lactação e número de lactações são apresentados nas Tab. 5 e 6. Não foi observado efeito do estágio de lactação ($P=0,1544$) ou do número de lactações ($P=0,4459$) sobre a CCS. No entanto, foi observado efeito altamente significativo ($P=0,0002$) da fazenda sobre a CCS (Tab. 7). Os efeitos das interações são apresentados na Tab. 14.

TABELA 14 - CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE (log cel/ml X 1000): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	<i>P</i>
Estágio de lactação (E)	0,1544
Número de lactações (L)	0,4459
Fazenda (F)	0,0002
E X L	0,7195
E X F	0,1125
L X F	0,9755
E X L X F	0,3342

5.8 Produção de leite

A produção de leite sofreu efeito marcante do estágio de lactação ($P=0,0001$) assim como do número de lactações ($P=0,0001$). Foi encontrado efeito significativo da fazenda ($P=0,0004$) e da interação estágio de lactação*número de lactações ($P=0,0023$). Não foi observado efeito significativo das outras interações sobre a produção de leite, conforme demonstrado na Tab. 15.

As médias de produção de leite em relação ao estágio e número de lactações foram sumarizadas nas Tab. 5 e 6. A distribuição da produção de leite por fazenda é apresentada na Tab. 7. A separação dos efeitos dos tratamentos sobre a produção de leite através dos contrastes ortogonais é sumarizada na Tab. 8.

TABELA 15 - PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	P
Estágio de lactação (E)	0,0001
Número de lactações (L)	0,0001
Fazenda (F)	0,0004
E X L	0,0023
E X F	0,2157
L X F	0,3958
E X L X F	0,8297

5.9 Escore de condição corporal (ECC)

O ECC foi afetado pelo estágio de lactação ($P=0,0001$) e pela fazenda ($P=0,0003$). Não foi identificado efeito do número de lactações ($P=0,3447$) e das outras interações, conforme demonstrado na Tab. 16.

A distribuição das médias do ECC em função do estágio de lactação e número de lactações é apresentada nas Tab. 5 e 6.

TABELA 16 - ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL EM ESCALA DE 1 A 5 (ECC): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, DE FAZENDA E INTERAÇÕES

Efeitos	P
Estágio de lactação (E)	0,0001
Número de lactações (L)	0,3447
Fazenda (F)	0,0003
E X L	0,3359
E X F	0,2408
L X F	0,8964
E X L X F	0,7451

5.10 Correlações entre concentração plasmática de ácido ascórbico e demais parâmetros

Foram realizadas análises de correlação entre a concentração plasmática de ácido ascórbico e os demais parâmetros avaliados neste trabalho, a saber: concentração plasmática de glicose; concentração sérica de insulina; concentração plasmática de AGNE (ácidos graxos não-esterificados); concentração plasmática de β -hidroxibutirato (β HBA); atividade sérica de aspartato-aminotransferase (AST); produção de leite, CCS e escore de condição corporal (Tab. 18). Para aquelas correlações estatisticamente significativas ($P < 0,05$), foi realizada a análise de regressão. Foram identificadas as seguintes correlações significativas e suas respectivas equações de regressão:

- Ácido Ascórbico*Glicose: $r = -0,2640$; $P = 0,0005$; $n = 168$
 - Equação 1: Ácido ascórbico = $3,798 - 0,0204(\text{Glicose})$ $R^2=0,0697$; $P=0,0005$
- Ácido Ascórbico*Produção de Leite: $r = 0,2176$; $P = 0,0211$; $n = 112$
 - Equação 2: Ácido ascórbico = $1,880 + 0,0248(\text{Leite})$ $R^2=0,0474$; $P=0,0211$
- Ácido Ascórbico*AGNE: $r = -0,2016$; $P = 0,0086$; $n = 169$
 - Equação 3: Ácido ascórbico = $2,944 - 1,4277(\text{AGNE})$ $R^2=0,0407$; $P=0,0086$

Deve ser enfatizado que as equações acima (1, 2 e 3) foram obtidas utilizando-se a função PROC REG do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), no qual não foram consideradas outras variáveis no modelo.

Utilizando-se a análise de regressão múltipla, foram identificados – com base no coeficiente de determinação (R^2) – a seguinte classificação, a medida que foram sendo adicionadas variáveis independentes ao modelo, conforme demonstrado na Tab. 17

TABELA 17– EFEITO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS ESTUDADAS NA FUNÇÃO SELECTION DO PROCEDIMENTO PROC REG SOBRE OS COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO OBTIDOS

Número de variáveis incluídas no modelo *	R^2 máximo alcançado
1 (AGNE)	0,065
2 (AGNE e L)	0,1281
3 (Leite, L e AGNE)	0,1537
4 (E, Leite, L, AGNE)	0,1786
5 (E, Leite, L, AGNE e Insulina)	0,1846
6 (E, Leite, L, F, AGNE e Glicose)	0,1895
7 (E, Leite, L, F, LCCS, AGNE e Glicose)	0,1958
8 (E, Leite, L, F, LCCS, AGNE, Glicose e Insulina)	0,2000
9 (E, Leite, L, F, LCCS, AGNE, Glicose, AST e Insulina)	0,2006
10 (E, Leite, L, F, LCCS, AGNE, ECC, Glicose, AST e Insulina)	0,2007
11 (E, Leite, L, F, LCCS, AGNE, ECC, Glicose, β HBA, AST, Insulina)	0,2009

* AGNE: ácidos graxos não-esterificados, AST: aspartato aminotransferase, β HBA: betahidroxibutirato, Leite: produção de leite, LCCS: log da contagem de células somáticas, ECC: escore de condição corporal, E: estágio de lactação; L: número de lactações e F: fazenda amostrada.

Desta forma, pôde-se verificar que mesmo incluindo no modelo estatístico mais variáveis, ainda assim não foi possível estimar com grande precisão como se comportou a concentração plasmática de ácido ascórbico. A variável isolada que melhor explicou a variabilidade da concentração de ácido ascórbico foi a concentração plasmática de AGNE ($R^2 = 0,065$), indicando que isoladamente as concentrações plasmáticas de AGNE explicaram apenas 6,5% da variabilidade total da concentração de ácido ascórbico. Quando foram adicionadas duas variáveis ao modelo (AGNE e número de lactações) o R^2 foi de 0,1281. Mesmo quando foram adicionadas ao modelo todas as variáveis estudadas, o R^2 obtido foi de 0,2009, o que é considerado baixo para explicar a variabilidade da concentração plasmática de ácido ascórbico. Portanto, dentre as variáveis estudadas no presente experimento, não foi identificada nenhuma associação entre a concentração plasmática de ácido ascórbico e os demais parâmetros estudados que pudesse ser utilizada como indicativo para variação do ácido ascórbico no plasma.

TABELA 18 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR (r), PROBABILIDADE (P) E NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS (n) PARA AS ASSOCIAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS: CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE; CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE INSULINA; CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE AGNE (ÁCIDOS GRAXOS NÃO-ESTERIFICADOS); CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE β -HIDROXIBUTIRATO (β HBA); ATIVIDADE SÉRICA DE ASPARTATO-AMINOTRANSFERASE (AST); PRODUÇÃO DE LEITE, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Variável	AA	AGNE	AST	β HBA	Leite	LCCS	ECC	LInsulina	Glicose
AA	-	r=-0,20163 P=0,0086 n=169	r=-0,04080 P=0,6006 n=167	r=-0,08192 P=0,2853 n=172	r=0,21767 P=0,0211 n=112	r=-0,05287 P=0,5502 n=130	r=-0,06744 P=0,3794 n=172	r=-0,00677 P=0,9302 n=170	r=-0,26404 P=0,0005 n=168
AGNE	r=-0,20163 P=0,0086 n=169	-	r=0,09460 P=0,2065 n=180	r=0,17128 P=0,0108 n=182	r=0,02289 P=0,8065 n=117	r=0,05576 P=0,5254 n=132	r=-0,02983 P=0,6901 n=181	r=-0,20152 P=0,0064 n=182	r=0,17290 P=0,0214 n=177
AST	r=-0,04080 P=0,6006 n=167	r=0,09460 P=0,2065 n=180	-	r=0,02092 P=0,7804 n=180	r=-0,10012 P=0,2914 n=113	r=-0,20339 P=0,0204 n=129	r=-0,19948 P=0,0087 n=179	r=0,10376 P=0,1657 n=180	r=-0,01397 P=0,8540 n=176
β HBA	r=-0,08192 P=0,2853 n=172	r=0,02092 P=0,7804 n=180	r=0,02092 P=0,7804 n=180	-	r=-0,02201 P=0,8122 n=119	r=-0,15358 P=0,0764 n=134	r=-0,05301 P=0,4749 n=184	r=0,00635 P=0,9321 n=183	r=-0,13923 P=0,0609 n=182
Leite	r=0,21767 P=0,0211 n=112	r=0,02289 P=0,8065 n=117	r=-0,10012 P=0,2914 n=113	r=-0,02201 P=0,8122 n=119	-	r=-0,10447 P=0,2865 n=106	r=-0,32718 P=0,0003 n=116	r=-0,27364 P=0,0031 n=115	r=-0,47793 P=0,0001 n=115
LCCS	r=-0,05287 P=0,5502 n=130	r=0,05576 P=0,5254 n=132	r=-0,20339 P=0,0204 n=129	r=-0,15358 P=0,0764 n=134	r=-0,10447 P=0,2865 n=106	-	r=-0,21230 P=0,0138 n=134	r=-0,02561 P=0,7715 n=131	r=0,12395 P=0,1568 n=132
ECC	r=-0,06744 P=0,3794 n=172	r=-0,02983 P=0,6901 n=181	r=-0,19948 P=0,0087 n=179	r=-0,05301 P=0,4749 n=184	r=-0,32718 P=0,0003 n=116	r=-0,21230 P=0,0138 n=134	-	r=-0,12463 P=0,0946 n=181	r=0,18658 P=0,0124 n=179
LInsulina	r=-0,00677 P=0,9302 n=170	r=-0,20152 P=0,0064 n=182	r=0,10376 P=0,1657 n=180	r=0,00635 P=0,9321 n=183	r=-0,27364 P=0,0031 n=115	r=-0,02561 P=0,7715 n=131	r=-0,12463 P=0,0946 n=181	-	r=0,24101 P=0,0012 n=178
Glicose	r=-0,26404 P=0,0005 n=168	r=0,17290 P=0,0214 n=177	r=-0,01397 P=0,8540 n=176	r=-0,13923 P=0,0609 n=182	r=-0,47793 P=0,0001 n=115	r=0,12395 P=0,1568 n=132	r=0,18658 P=0,0124 n=179	r=0,24101 P=0,0012 n=178	-

* A.A.: ácido ascórbico, AGNE: ácidos graxos não-esterificados, AST: aspartato aminotransferase, β HBA: betahidroxibutirato, Leite: produção de leite, LCCS: log da contagem de células somáticas, ECC: escore de condição corporal, Linsulina: log da concentração sérica de insulina.

7. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Ácido ascórbico

Analisando os resultados da concentração plasmática de ácido ascórbico em função do estágio de lactação, observa-se que não houve variação da concentração plasmática desta vitamina durante a lactação e período seco. Estes dados não são coerentes com a hipótese formulada por MacLEOD *et al.* (1996), que consideram ser possível que vacas leiteiras no início da lactação possam apresentar deficiência subclínica de ácido ascórbico.

Em extensa revisão, NOCKELS (1988b) relata que ruminantes em lactação com elevadas produções de leite e com alimentação baseada em forragens podem apresentar síntese diminuída de ácido ascórbico, uma vez que nestes animais há elevada demanda por precursores da síntese de ácido ascórbico – glicose e galactose – para a síntese de lactose do leite.

Sob as condições de alimentação, alojamento e manejo em fazendas comerciais, os dados do presente trabalho indicam que os animais apresentaram equilíbrio entre a síntese de ácido ascórbico e seus requerimentos, independentemente do estágio de lactação, já que os ruminantes são totalmente dependentes da síntese endógena de ácido ascórbico para seus requerimentos.

Comparando-se os resultados da concentração plasmática de ácido ascórbico do presente estudo com aqueles publicados na literatura indexada, pode-se verificar que os valores da concentração plasmática de ácido ascórbico obtidos no presente estudo são, via de regra, inferiores aos encontrados em outras condições. DUBESKY e OWENS (1993) descreveram níveis plasmáticos de ácido ascórbico, em vacas leiteiras produzindo 22,7 kg de leite/dia, superiores em até 61% em relação a média

obtida neste trabalho (2,6 versus 4,2 mg/l). Em outro estudo com animais adultos em lactação, HIDIROGLOU *et al.* (1995) obtiveram concentrações plasmáticas de ácido ascórbico variando entre 2,7 a 4,5 mg/l, enquanto VERMA *et al.* (1993), analisando vacas mestiças, relataram níveis plasmáticos de ácido ascórbico variando entre 2,93 a 4,09 mg/l.

HAAG e HOFMANN (1987) relataram que a concentração de ácido ascórbico nos leucócitos é um parâmetro menos variável que a do plasma. Este fato reforça a afirmação de que não há mudanças na concentração plasmática de ácido ascórbico em vacas leiteiras durante o período seco e ao longo da lactação, pois quaisquer alterações no conteúdo total ('pool') de ácido ascórbico destes animais seria primeiramente detectado no plasma e posteriormente em outros órgãos.

Foi observado neste estudo efeito significativo de fazenda amostrada sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico, com as médias das fazendas A, B e C iguais a 2,69; 2,88 e 2,16 respectivamente. A literatura apresenta dados contraditórios com relação a este fato. ITZE (1984) relatou que houve diferença na concentração plasmática de ácido ascórbico em animais que recebiam dietas ricas ou pobres em energia (10 versus 3,5 mg/l, respectivamente). No entanto, NOCKELS (1988b) e GOTTINGEN (1990) relataram que todo o ácido ascórbico de origem da dieta é destruído pela ação oxidativa dos microrganismos do rúmen; portanto, a dieta não teria efeito direto sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico, como ocorre nos animais monogástricos. Por outro lado, a densidade energética da dieta pode afetar a disponibilidade de precursores de glicose para a síntese de ácido ascórbico – em especial ácido propiônico – podendo potencialmente limitar a neoglicogênese no fígado a partir deste precursor.

Sendo assim, a diferença observada na concentração plasmática de ácido ascórbico entre as diferentes fazendas amostradas pode ter sido resultado de diferenças na densidade energética das dietas entre estas fazendas. DUBESKI e OWENS (1993) descreveram que vacas leiteiras alimentadas com dietas com elevadas proporções de concentrado e silagem de milho tiveram níveis plasmáticos de ácido ascórbico superiores em relação aos animais alimentados a base de forragens (4,2 versus 4,9 mg/l, respectivamente).

De acordo com HIDIROGLOU *et al.* (1995), ao nascimento, a concentração plasmática de ácido ascórbico nos bezerros variou de 6,1 a 10,8 mg/l e diminuiu após o período de 5 dias para 2,7 a 4,5 mg/l. A concentração plasmática de ácido ascórbico no colostro foi de 16 mg/l, diminuindo pela metade no leite das vacas após 2 dias de lactação (8 mg/l). No momento do parto, as vacas apresentaram concentração plasmática de ácido ascórbico menor que dos bezerros, no entanto, aos 28 dias de lactação tais diferenças desapareceram.

VERMA *et al.* (1993) avaliaram o efeito do estágio de desenvolvimento do animal (bezerros, novilhas e vacas adultas) e o status reprodutivo (prenhe ou não-prenhe) sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico em animais mestiços. O nível plasmático de ácido ascórbico em bezerros foi menor (1,16 a 1,28 mg/l) que nas novilhas (3,49 a 5,4 mg/l). Os animais adultos apresentaram concentrações plasmáticas de ácido ascórbico variando entre 2,93 a 4,09 mg/l. No mesmo estudo, os animais prenhes apresentaram os níveis de ácido ascórbico menores (2,61 a 3,92 mg/l) que os animais não-prenhes (2,87 a 5,61 mg/l). Ressalta-se o fato dos resultados da concentração de ácido ascórbico obtidos no citado estudo apresentam o inconveniente de terem sido obtidos utilizando-se técnica colorimétrica, o que de

acordo com WASHKO *et al.* (1992), apresenta geralmente baixa sensibilidade e especificidade, interferência de outras substâncias e de cuidados inadequados quanto a estabilidade das amostras.

6.2 Glicose

As concentrações plasmáticas de glicose no presente trabalho sofreram efeito do estágio de lactação ($P = 0,0001$), do número de lactações ($P = 0,0226$) e da fazenda amostrada ($P = 0,0001$), conforme Tab. 9.

As maiores concentrações de glicose ($P=0,001$) foram observadas no período seco (66,21 mg/dl), confirmando relatos de MEPHAN (1988) de que a síntese do leite se traduz em elevados requerimentos de glicose para a síntese da lactose do leite na glândula mamária. No início da lactação (Estágio 1) computou-se média de 55,10 mg/dl, enquanto um valor médio de 59,16 foi registrado para as vacas de 141 a 280 dias de lactação (estágio 4). Estes dados sugerem que ocorre elevada demanda de glicose no início da lactação para a síntese de lactose do leite, o que associado à diminuída capacidade de ingestão de MS, característica de vacas leiteiras neste período (MEPHAN, 1988; KOMARAGIRI e ERDMAN, 1995), poderia determinar menor disponibilidade de glicose para a síntese de ácido ascórbico. MOORE (1997b) relata que os valores normais de concentração plasmática de glicose para vacas no início da lactação variam entre 55-79 mg/dl, para o fim de lactação entre 65-82 mg/dl e para vacas no período seco entre 71-87 mg/dl.

Trabalhando na determinação de valores de referência para bovinos, ROUSSEL *et al.* (1982) registraram que a concentração plasmática de glicose diminuía com o aumento da idade. Em outro trabalho, SHAFFER *et al.* (1981)

determinaram que a glicemia média em 169 vacas Holandesas era igual a 53,27 mg/dl, sendo que as concentrações de glicose apresentavam tendência a diminuir com o desenvolvimento etário.

Em recente trabalho de pesquisa para determinar o perfil bioquímico de bovinos de diversas raças no Brasil, SOUZA (1997) relatou que estes animais apresentaram glicemia média de 70 mg/dl; registrando que a taxa de glicemia decresceu significativamente com o passar da idade, estabilizando-se no animal adulto.

A separação dos efeitos do estágio de lactação sobre a concentração plasmática de glicose através de contrastes ortogonais (Tab. 8) evidenciou que os animais durante o período seco apresentaram níveis de glicose superiores ($P=0,001$) em relação aos animais em lactação.

As diferenças de concentração plasmática de glicose observadas entre as fazendas amostradas não era esperado, em virtude destas fazendas apresentarem manejo nutricional e sanitário semelhantes. Observando a Tab. 7, verifica-se que vacas da Fazenda C apresentaram os maiores níveis plasmático de glicose, sendo superior em 30,6 a 37,3% em relação às fazendas A e B, respectivamente. Esta grande diferença observada pode ter ocorrido em virtude das condições de contenção dos animais para a coleta de sangue na fazenda C. Antes da coleta de sangue, os animais ficaram presos em curral e posteriormente foram transferidos para um tronco de contenção que permitia a movimentação do animal. É provável que estes animais tenham desencadeado a reação de luta ou fuga, característica da resposta ao estresse, que provoca a liberação de adrenalina na corrente sanguínea estimulando o aumento da glicemia.

A concentração plasmática de glicose apresentou correlação negativa significativa ($r = - 0,2640$; $P = 0,0005$, $n = 168$) com a concentração plasmática de ácido ascórbico. Estes resultados contrariam as informações publicadas por CHATTERJE (1970) e NOCKELS (1988b), que observaram correlação positiva entre concentração plasmática de glicose e concentração plasmática de ácido ascórbico. Aqueles autores justificaram seus achados com base no fato de que é a concentração plasmática de glicose que determina a síntese de ácido ascórbico no fígado em vacas leiteiras.

Entretanto, a associação entre estas duas variáveis no presente estudo apresentou baixo coeficiente de correlação ($r = - 0,2640$).

6.3 Insulina

A insulina apresenta ampla gama de atividades sobre o metabolismo de carboidratos, tanto em monogástricos como em ruminantes (VERNON e SASAKI, 1991).

A concentração sérica de insulina sofreu efeito significativo do estágio de lactação ($P = 0,0001$), aumentando ao longo lactação. Esta distribuição da concentração de insulina durante a lactação evidencia claramente as alterações que ocorrem no metabolismo energético do animal, considerando as variações na demanda de energia para produção de leite e manutenção.

As vacas leiteiras apresentam no início da lactação balanço energético negativo em função do elevado requerimento de energia para a síntese de leite e pela drástica redução no consumo de matéria seca característica desta fase.

KOMARAGIRI e ERDMAN (1995) apontam que ocorrem alterações homeorréticas no metabolismo do animal objetivando fornecer energia para a síntese do leite, principalmente através da mobilização das reservas de gordura do tecido adiposo. Estes dados são confirmados pelos resultados deste trabalho, uma vez que os animais em início de lactação (Estágios 1 e 2) apresentaram concentrações séricas de insulina inferiores em relação aos observados no final da lactação (estágios 3 e 4), indicando que nesta fase ocorre menor disponibilidade de glicose na corrente sanguínea, conforme Tab. 5.

VICINI *et al.* (1991), trabalhando com resposta de vacas leiteiras à administração exógena de somatotropina bovina, relataram que as baixas concentrações de insulina encontradas no início da lactação são provavelmente reflexo da baixa disponibilidade de glicose periférica – causada pelo elevado requerimento de glicose da glândula mamária, em função da produção de leite. De maneira análoga, ORSKOV (1986) relata que quando a concentração de propionato – o principal precursor da glicose em ruminantes – excede a capacidade do fígado em metabolizá-lo ocorre estímulo para síntese de insulina. O resultado em vacas em lactação é a inversão da lipólise para a lipogênese no tecido adiposo.

6.4 Ácidos Graxos não-esterificados (AGNE)

Segundo HANSEN (1991), o termo balanço energético é definido como sendo a diferença entre o consumo de energia, determinado pela ingestão de alimentos e densidade energética da dieta, e a utilização dessa energia para a manutenção, lactação, trabalho e/ou crescimento. Assim sendo, o termo representa a

diferença entre consumo e gasto de energia, o que determinará ganho ou perda líquida das reservas corporais da fêmea.

BELL (1995) concluiu ser a primeira semana de lactação o período no qual ocorre o maior déficit de nutrientes de origem da dieta com destino à glândula mamária para a síntese de lactose, proteína e triglicerídeos. Para atender esta demanda de nutrientes, vacas com elevadas produções de leite atingem com frequência um balanço energético negativo de até 12 Mcal/dia e um balanço negativo de proteína metabolizável de até 560 g/dia.

Fisiologicamente, o balanço energético negativo, ou baixa ingestão de energia, está relacionado ao declínio nas concentrações séricas de insulina (RICHARDS *et al.*, 1989; SCHRICK *et al.*, 1990; CANFIELD e BUTTLER, 1991), e à diminuição das concentrações circulantes de IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) – (SPICER *et al.*, 1990).

BELL (1995) caracteriza o padrão metabólico no final da gestação de ruminantes bem alimentados por aumento na gliconeogênese hepática e redução na utilização de glicose pelos tecidos periféricos. O autor registra também a ocorrência de queda na utilização periférica de acetato e moderado aumento na mobilização de AGNE do tecido adiposo, com aumento da utilização periférica de AGNE e β HBA.

Todas estas adaptações metabólicas são coerentes com a necessidade de proporcionar glicose e aminoácidos para o metabolismo fetal e adaptar os tecidos periféricos da mãe para o consumo de AGNE e β HBA no metabolismo energético. Logo, todas estas adaptações ocorrem às custas da mobilização das reservas corporais de gordura e proteína na vaca gestante. Esta mobilização das reservas

lipídicas se traduz em aumento da concentração plasmática de AGNE (HARRISON *et al.*, 1990; CANFIELD e BUTTLER, 1991; GRUMMER *et al.*, 1994) assim como também ocorre incremento na gliconeogênese a partir dos compostos nitrogenados (SCHRICK *et al.*, 1990).

Os resultados da concentração plasmática de AGNE obtidos no presente estudo comprovam que ocorre intensa mobilização de reservas corporais de gordura no início da lactação com o objetivo de suprir os requerimentos de energia para a síntese de leite. Foi observado efeito significativo de estágio de lactação sobre a concentração plasmática de AGNE ($P = 0,0063$). As vacas em estágio 1 (1 a 28 dias de lactação) apresentaram as mais elevadas concentrações plasmáticas de AGNE em relação aos demais estágios estudados. Analisando o efeito do estágio de lactação sobre a concentração plasmática de AGNE através de contrastes ortogonais, pode-se observar que animais em início e pico de lactação apresentaram níveis médios de AGNE superiores (Tab. 8 – $P = 0,004$) em relação aos animais no meio e final de lactação (0,279 versus 0,208 $\mu\text{Eq/l}$). Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos em trabalhos realizados no Brasil (LARANJA-DA-FONSECA, 1997; LAGO, 1997) e em outros países (HARRISON *et al.*, 1990; CANFIELD E BUTTLER, 1991; GRUMMER *et al.* 1994; BELL, 1995).

Foi identificada no presente estudo correlação negativa significativa ($r = -0,2016$; $P = 0,0086$; $n = 169$) entre a concentração plasmática de AGNE e ácido ascórbico. Ainda que o coeficiente de correlação linear calculado possa ser considerado baixo, esta correlação sugere existir efeito de balanço energético negativo, medido através da concentração plasmática de AGNE, sendo que quanto maior o balanço energético negativo, menor a concentração plasmática de ácido ascórbico, ainda que este seja um coeficiente de correlação linear considerado

baixo. Esta correlação pode ser melhor entendida com base na hipótese formulada por NOCKELS (1988b) e MacLEOD *et al.* (1996) que afirmaram ser o início da lactação o período de maior probabilidade de ocorrência de deficiência subclínica de ácido ascórbico em animais com altas produções de leite.

No entanto, conforme já discutido anteriormente, quando foi analisado o efeito de estágio de lactação sobre a concentração plasmática de ácido ascórbico não foram observadas diferenças ao longo da lactação (Tab. 5).

DYK (1995), estudando a concentração plasmática de AGNE como indicador da eficácia do programa de nutrição de vacas no período seco, recomendou que estes animais não deveriam apresentar concentrações plasmáticas de AGNE superiores a 0,400 mEq/l, caso contrário os animais não estariam recebendo adequado suprimento de energia para a manutenção e gestação. Com base nesta recomendação, os animais em período seco (estágio 5) estudados no presente experimento apresentaram níveis de AGNE inferiores àquele limite (0,246 mEq/l), indicando adequada nutrição dos animais naquele período.

6.5 β HBA

Vários pesquisadores demonstraram ocorrer diminuição no consumo de MS antes do parto, entretanto, a magnitude desta queda e a sua duração são variáveis (COPPOCK *et al.* 1974; JOHNSON e OTTERBY, 1981; KUNZ *et al.* 1985 e GRUMMER, 1995).

Desta forma, GRUMMER (1995) recomenda a maximização da ingestão de MS e de energia no período pós-parto objetivando reduzir a mobilização de tecido adiposo e prevenir a depleção do glicogênio hepático. O mesmo autor discorre

sobre as mudanças mais significativas no perfil de metabólitos sanguíneos e perfil endócrino, associados com o parto e a lactogênese, eventos estes que precedem o período de severidade máxima do balanço energético negativo das vacas.

No presente estudo, não foi observado efeito de estágio de lactação sobre a concentração plasmática de β HBA (Tab. 5 e 12). Estes resultados são diferentes daqueles registrados por KRONFELD (1982). Segundo este autor, durante o período de balanço energético negativo ocorre intensa mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, o que acarreta o acúmulo de β HBA, ácido acetoacético e seus subprodutos de descarboxilação tais como acetona e isopropanol nos fluidos corporais. Este fenômeno resulta da menor disponibilidade de glicose para o fígado e tecidos extra hepáticos ao longo deste período, durante o qual ocorre mobilização de reservas corporais.

A concentração plasmática de β HBA variou entre fazendas ($P = 0,0132$), como pode ser constatado na Tab. 13. Baseando-se nos estudos de SKAAR *et al.* (1989); BERTICS *et al.* (1992); STUDER *et al.* (1993) e VAZQUEZ-AÑON *et al.* (1994), a alimentação de vacas leiteiras no período de transição final do período seco e início do período de lactação - afeta profundamente a magnitude do balanço energético, e consequentemente da concentração plasmática de β HBA. As diferenças encontradas na concentração plasmática de β HBA entre as fazendas amostradas neste trabalho podem, desta forma, ser creditadas em parte a diferenças nas dietas dos animais, particularmente a densidade energética.

No presente estudo não foi observada correlação entre a concentração plasmática de β HBA e a de ácido ascórbico ($r = - 0,0819$; $p = 0,2583$; $n = 172$). Em virtude do fato de que ocorre necessariamente aumento dos níveis circulantes de

AGNE antes do aumento da concentração de corpos cetônicos na circulação (GRUMMER, 1993), poderia-se esperar que correlação semelhante, entre a concentração plasmática de ácido ascórbico e a de AGNE, fosse também identificada entre ácido ascórbico e β HBA, pois, de acordo com LARANJA-DA-FONSECA (1997) ocorre forte associação positiva entre a concentração plasmática de β HBA e AGNE.

6.6 AST

A análise da atividade sérica de AST realizada no presente estudo teve como objetivo avaliar a função hepática dos animais ao longo da lactação (REID *et al.*, 1986; ROBERTS e REID, 1993) e identificar se a função hepática afeta a concentração plasmática de ácido ascórbico.

No presente trabalho não foi observado efeito do estágio de lactação ($P = 0,1709$), número de lactações ($P = 0,5191$) ou de fazenda amostrada ($P = 0,1880$) e nem das interações (Tab. 13). Tais resultados sugerem que os animais experimentais não apresentavam alterações nas funções hepáticas ou de tecido muscular, visto que a AST não é uma enzima hépato-específica.

Considerando os animais em início de lactação, não foi observada elevação na atividade sérica de AST, contrariando os resultados observados por ROBERTS e REID (1993). Estes autores relataram que valendo-se de técnica de biópsia de fígado em grande número de vacas leiteiras no Reino Unido, foi possível que aproximadamente um terço dos animais com produções superiores a 5.500 kg leite/lactação eram afetados por infiltração gordurosa no fígado no início da lactação. A incidência desta desordem metabólica em diferentes rebanhos estudados variou de 10 a 50% dos animais amostrados.

6.7 Contagem de células somáticas

A CCS tem sido utilizada como indicador da ocorrência de mastite a quase um século. PRESCOTT e BREED (1910) inicialmente publicaram a descrição do método de determinação direta da CCS no leite em microscópio, sendo que este método se mantém até os dias de hoje como método de referência, uma vez que a maioria da CCS analisadas atualmente é realizada por métodos eletrônicos (BOOTH, 1997).

De acordo com BOOTH (1995), a International Dairy Federation, realizando pesquisa sobre a utilização de CCS, enviou questionários a 24 países, dos quais 22 utilizavam a CCS para avaliar a saúde da glândula mamária.

No presente trabalho, a CCS foi utilizada como indicador da saúde da glândula mamária dos animais amostrados e também para estabelecer se havia correlação entre a CCS e a concentração plasmática de ácido ascórbico. A análise dos resultados, após a transformação em log natural, possibilitou verificar que não houve efeito do estágio de lactação ($P = 0,1544$) e do número de lactações ($P = 0,4459$) sobre a CCS. Entretanto, foi observado efeito significativo de fazenda amostrada sobre a CCS ($P = 0,0002$). Estas diferenças indicam diferenças na saúde da glândula mamária, em especial das fazendas A e C, as quais apresentaram as maiores CCS. Tal fato pode ser explicado com base nas diferenças de manejo entre as fazendas, no que se refere à implantação de um programa de controle de mastite. Tal programa, segundo o National Mastitis Council (1996), consiste em adequado manejo de ordenha, manutenção do equipamento de ordenha,

desinfecção dos tetos após a ordenha, tratamento de vacas secas, imediato tratamento dos casos clínicos de mastite e descarte e/ou segregação dos animais cronicamente infectados.

Não foi observada correlação entre a CCS e a concentração plasmática de ácido ascórbico ($r = - 0,05287$; $P = 0,5502$; $n = 130$). Não existe na literatura indexada relato sobre a correlação entre a CCS do leite e a concentração plasmática de ácido ascórbico. Com base em trabalhos envolvendo suplementação de vitamina E e selênio – os quais apresentam função antioxidante nas células – para vacas em lactação, SMITH *et al.* (1984) verificaram redução na frequência e duração dos casos de mastite clínica. Considerando-se que o ácido ascórbico atua de forma sinérgica com a vitamina E (CHAN, 1993; CHEW, 1995), pode-se supor que o ácido ascórbico desempenhe papel importante na saúde da glândula mamária.

6.8 Produção de leite

No presente estudo, a produção de leite foi significativamente afetada pelo estágio de lactação ($P=0,0001$) e pelo número de lactações ($P=0,0001$), resultados estes coerentes com a curva normal de lactação da vaca leiteira (GARNSWORTHY, 1988), verificou-se ainda efeito de fazenda ($P=0,0004$), o que pode ser atribuído a fatores genéticos, nutricionais e de manejo aos quais os diferentes rebanhos estavam submetidos.

Analisando a associação entre a concentração plasmática de ácido ascórbico e a produção de leite, foi identificada correlação positiva significativa ($r=0,2176$; $P=0,0211$; $n=112$). São escassos os dados na literatura indexada sobre esta

associação. Em estudo com vacas leiteiras produzindo acima 22,7 kg de leite/dia, DUBESKI e OWENS (1993) obtiveram níveis plasmáticos de ácido ascórbico de 4,2 mg/l. Animais em confinamento, com dietas ricas em concentrados e à base de silagem de milho apresentaram níveis de 4,9 mg/l.

6.9 Escore de condição corporal

O escore de condição corporal (ECC) tem como função avaliar a quantidade de reservas corporais acumuladas na forma de tecido adiposo. A gordura armazenada neste tecido encontra-se na forma de triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa. A maior parte da gordura corporal da vaca holandesa (50-70%) é armazenada nos tecidos subcutâneo e muscular (LARANJA-DA-FONSECA, 1997).

De acordo com revisão feita por WEAVER (1991), as vacas leiteiras devem ser adequadamente manejadas para que tenham ao parto ECC entre 3,25 e 3,5, sendo que os animais não devem perder mais de 0,5 ponto de ECC após o parto. Vacas que apresentam ECC elevado no momento do parto caracterizam-se por maior predisposição a problemas digestivos, distúrbios metabólicos, reprodutivos e infecciosos (MORROW *et al.*, 1979). Tais problemas podem estar associados a menor ingestão de matéria seca (MS) em vacas excessivamente gordas no início da lactação, fato que contribui para acentuar o balanço energético negativo de vacas leiteiras no período pós-parto (WEAVER, 1991; GARNSWORTHY, 1988).

Os resultados obtidos de ECC no presente estudo indicaram que houve efeito do estágio de lactação ($P=0,0001$) sobre o ECC dos animais. O grupo de animais

em início de lactação apresentaram ECC inferiores aos consignados para animais em meio e final de lactação. Com o avançar da lactação houve aumento gradual de escore, o que pode ser explicado pela concomitante diminuição na produção de leite e aumento na capacidade de consumo de MS (GARNSWORTHY, 1988). A análise das diferenças entre médias por contrastes ortogonais (Tab. 8), revelou que os animais em período seco apresentaram ECC significativamente maior do que as vacas em lactação, assim como foi significativamente maior o ECC das vacas em fim da lactação, quando comparadas aos das em início de lactação.

Os resultados de ECC obtidos indicam que ocorreu intensa mobilização de reservas corporais no período pós-parto para atender aos requerimentos de energia para a manutenção e lactação, os quais não podem ser supridos apenas com os nutrientes da dieta em função da baixa ingestão de MS das vacas neste período (MOALEN *et al.*, 1997; TREACHER *et al.*, 1986).

Não foi encontrada correlação significativa entre ECC e concentração plasmática de ácido ascórbico ($r = -0,0674$; $P = 0,3794$). Ainda, esta correlação não foi influenciada por estágio de lactação ($P = 0,4832$), número de lactações ($P = 0,1111$) ou por fazenda amostrada ($P = 0,3685$).

7. CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente experimento, foi possível extrair as seguintes conclusões:

1. A concentração plasmática de ácido ascórbico não sofreu efeito de estágio ou número de lactações
2. Ainda que as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico tenham apresentado associação negativa com as concentrações plasmáticas de glicose e AGNE, e positiva com a produção de leite, não foi possível identificar o fator determinante da variabilidade do ácido ascórbico
3. Não foi possível demonstrar associação entre a concentração plasmática de ácido ascórbico e concentração sérica de insulina, concentração plasmática de β -hidroxibutirato, atividade sérica de aspartato-aminotransferase, Contagem de células somáticas e escore de condição corporal

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. Ketone body as milk factors for metabolism disturbances and mastitis. **Milch Praxis**, v.31, p.200-201, 1993.
- BALL, G.F.M. **Water-soluble vitamin assay in human nutrition**. London: Chapman & Hall, 1994. p.79-106.
- BÁNHEGYI, G.; BRAUN, L.; CSALA, M.; PUSKÁS, F.; MANDL, J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. **Free Radical Biology & Medicine**, v.23, p.793-803, 1997.
- BARHAM, D.; TRINDER, P. **Analyst**, v.97, p.142, 1972.
- BARTLET, D.C.; MILLER, G.Y.; ANDERSON, C.R.; KIRK, J.H. Milk production and SCC in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2794, 1990.
- BEISEL, W.R. Single nutrients and immunity. **American Journal of Clinical Nutrition, Suplement**, v.35, n.2, p.423-427, 1982.
- BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2804-2819, 1995.
- BENDICH, A. Antioxidants vitamins and their function in immune responses. *In*: BENDICH, A.; PHILLIPS, M.; TENGERTY, R.P. **Antioxidants and immune functions**, New York : Plenum Press, 1990, p.33.
- BENDICH, A. Interaction between antioxidant vitamins C and E and their effect on immune responses. *In*: NIQUEL, J.; QUINTANILHA, A.D.; WEBER, H. (eds.) **CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine**. Boca Raton : CRC Press, 1989, v.3, p.153-160.
- BENDICH, A. Physiological role of antioxidants in the immune system. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.9, p.2789-2794, 1993.
- BENDICH, A.; MACHLIN, L.J.; SCANDURRA, O. The antioxidant role of vitamin C. **Advances in Free Radicals Biology e Medicine**, v.2, p.419-444, 1986.
- BENTLEY, G.A.; BRANGE, J.; DEREWENDA, Z.; DODSON, E.J.; DODSON, G.G.; MARKUSSEN, J.; WILKINSON, A.J.; WOLLMER, A.; XIAO, B. Role of B13 in insulin assembly. **Journal of Molecular Biology**, v.228, p.1163-1176, 1992.
- BERGMEYER, H.U. **Methoden der enzymatischen analyse**. Weinheim, Verlag Chemie, 1974, p.769.
- BERTICS, S. J.; BRUMER, R. R.; CARDONIGA-VALINO, C.; STODDARD, E. E. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1914, 1992.
- BOOTH. J.M. Mastitis control. **International Dairy Federation Bulletin**, v.305, p.29-50, 1995.

- BOOTH, J.M. Conteo celular como indicador de sanidade de la ubre. *In: Seminario Regional de Calidad de Leche, Atlántida, Uruguay, 1997. Anais.* p.125-131.
- BOUDA, J.; JAGOS, P.; DVORAK, R.; ONDROVA, J. Vitamin E and C in the blood plasma of cows and their calves fed from buckets. **Acta Veterinaria Brno**, v.49, p.53-58, 1980.
- BRITTON, R.; KREHBIEL, C. Nutrient metabolism by gut tissues. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2125-2131, 1993.
- BROCKMAN, R.P. Roles of insulin and glucagon in the development of ruminant ketosis: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.20, p.121, 1979.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. San Diego : Academic Press, 1994. p.450-459.
- CANFIELD, R.W.; BUTTLER, W.R. Energy balance, first ovulation and the effects of naloxone on LH secretion in early post-partum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.740, 1991.
- CHAN, A.C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.71, p.725- 731, 1993.
- CHANDLER, P. Insulin is a factor for transition cows, more information is needed. **Feedstuffs**. v.69, p. 12 e 35, 1997.
- CHATTERJEE, I. B. Biosynthesis of L-ascorbate in animals. *In: McCORMICK, D. B.; WRIGHT, L. D. Methods in Enzymology*. v.18A, p.28-34, 1970.
- CHATTERJEE, I. B.; MAJUMDER, A. K.; NANDI, B. K.; SUBRAMANIAN, N. Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.258, p.24-46, 1975.
- CHEW, B.P. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. **The Journal do Nutrition**, v.125, p.1804S-1808S, 1995.
- COPPOCK, C.E.; NOLLER, C.H.; WOLFE, S.A. Effect of forage-concentrate ratio in complete feeds fed *ad libitum* on energy intake in relation to requirements by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.57, p.1371, 1974.
- CUMMINS, K.A.; BRUNNER, C.J. Dietary ascorbic acid and immune system reponse in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.129-134, 1989.
- DOMECK, J.J.; SKIDMORE, A.L.; LOID, J.W.; KANEENE, J.B. Validation of body condition scores with ultrasound measurements of sbcutaneous fat of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2308, 1995.
- DUBESKI, P.L.; OWENS, F.N. Plasma levels of water soluble vitamins in various classes of cattle. **Animal Science Research Report – Oklahoma State University**. n. P933, p.249-255, 1993.
- DUFFIELD, T.F.; RICHARD, M.J.; BEITZ, D.C.; YOUNG, J.W. Survey of sbclinical ketosis in Ontario dairy cattle. **Dairy Research Report**, n.365, p.24-27, 1995.
- DVORAK, 1966. *apud*: ITZE, L. 1984, p 121-130.

- DYK, P.B. **The association of prepartum non-esterified fatty acids and body condition with peripartum health problems on 95 Michigan dairy farms.** East Lansing, 1995. Dissertação (Mestrado) - Michigan State University.
- EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holsteins dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.68, 1989.
- EMMERY, R.S.; BURG, N.; BROWN, L.D.; BLANK, G.N. Detection, occurrence and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, v.47, p.1074, 1964.
- FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.86, p.6377-6381, 1989.
- GARNSWORTHY, P. C. **Nutrition and lactation in the dairy cow.** London: Butterworths, 1988. 429 p.
- GOLDFINE, I.D. The insulin receptor: molecular biology and transmembrane signaling. **Endocrinology Review**, v.8, p.235-255, 1987.
- GOSSE, P.T. Effects of vitamin C intake on depletion time of calves. **Journal of Dairy Science**, v.20, p 666-675, 1938.
- GÖTTINGEN, H.J. A. Review in ascorbic acid in cattle nutrition. *In*: Symposium on Ascorbic Acid in Domestic Animals, Karlsruhe Ittingen, 1990. **Anais**. Paginação irregular.
- GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2820, 1995.
- GRUMMER, R.R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.12, p.3882-3896, 1993.
- GRUMMER, R.R.; WINKLER, J.C.; BERTICS, S.J.; STUDER, V.A.; VAUGHN, A. Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of pre-partum Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.3618-3626, 1994.
- HAAG, W.; HOFMANN, W.A.D. Vitamin C content in blood plasma and leukocytes of cattle. **Tierärztliche Umschau**, v.42, n.12, p.956-963, 1987.
- HANSEN, P.J. The relationship between energy status and re-assumption of estrus cycles in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. n.3, p.200-209, 1991.
- HARMON, R.J.; HEALD, C.W. Migration of polymorphonuclear leukocytes into bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.992, 1982.
- HARRISON, R.O.; FORD, S.P.; YOUNG, J.W.; CONLEY, A.J.; FREEMAN, A.E. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2749-2758, 1990.

- HEMILÄ, H.; ROBERTS, P.; WIKSTRÖM, M. Activated polymorphonuclear leucocytes consume vitamin C. **FEBS Letters**, v.178, n.1, p.25-30, 1984.
- HERBEIN, J.H.; AIELLO, R.J.; ECKLER, L.I.; PEARSON, R.E.; AKERS, R.M. Glucagon, insulin, growth hormone and glucose concentration in blood plasma. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.320, 1985.
- HERDT, T.H.; STEVENS, J.B.; OLSON, W.G.; LARSON, Blood concentrations of β -hidroxibutirato in clinically normal Holstein-Friesian herds and in a high prevalence of ketosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, p.503-506, 1981.
- HIDIROGLOU, M.; IVAN, M.; BATRA, T.R. Concentration of vitamin C in plasma and milk of dairy cattle. **Annales de Zootechnie**, v.44, n.4, p.399-402, 1995.
- HORNIG, D.; GLATTHAR, B.; MOSER, U. General aspects of ascorbic acid function and metabolism. *In*: Proceedings of Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals. Copenhagen, 1984. **Anais**. The Royal Danish Agricultural Society, 1984. p.3-24.
- HUNTINGTON, G.B. Net absorption of glucose and nitrogenous compounds by lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1919, 1994.
- HUNTINGTON, G.B. Net nutrient absorption in beef steers fed silage or high concentrate diet containing four levels of limestone. **The Journal of Nutrition**, v.113, p.1157-1164, 1983.
- HUNTINGTON, G.B.; PRIOR, R.L. Disgestion and absorption of nutrients by beef heifers fed high-concentrate diets. **The Journal of Nutrition**, v.113, p.2280-2288, 1983.
- HUNTINGTON, G.B.; REYNOLDS, P.J.; TYRRELL, H.F. Net absorption and ruminal concentrations of metabolites in nonpregnant dry Holstein cow before and after intraruminal acetic acid infusion. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.1901, 1983.
- INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY, Committee on Standards, Part 2. **IFCC Method fo Aspartate Aminotransferase**. Amsterdam : Elsevier Science, 1975.
- ITZE, L. Ascorbic Acid in ruminants. *In*: Proceedings of Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals, Copenhagen, 1984. **Anais**. The Royal Danish Agricultural Society, 1984, p.121-130.
- JAFFE, G. M. Vitamin C. *In*: MACHLIN, L. J. (ed.) **Handbook of vitamins**. New York : Marcel Dekker, 1984.
- JANES, A.N.; WEEKES, T.E.C; ARMOSTRONG, D.C. Insulin action and glucose metabolism in sheep fed dried-grass or ground maize-based diets. **British Journal of Nutrition**, v.54, p.459-471, 1985.
- JENSEN, D.L.; EBERHART, R.J. Total and diferential cell counts in secretions of nonlactating bovine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, p.743, 1981.

- JOHNSON, D.G.; OTTERBY, D.E. Influence of dry period diet on early postpartum health, feed intake, milk production, and reproductive efficiency of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.290, 1981.
- KELLY, J.M.; SUMMERS, M.; PACK, H.S.; MILLIGAN, L.P.; McBRIDE, B.W. Celular energy metabolism and regulation. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.678-694, 1991.
- KENNEDY, A.D.; TEKPETY, F.R.; INGALLS, J.R.; PALMER, W.M. Effects of stage of lactation and diet on serum insulin level and mononuclear leukocyte insulin receptor characteristics in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v.67, p.721, 1987.
- KLEBANOFF, S.J. Peroxidases *In*: EVERSE, J.; EVERSE, K.; GRISHAM, M. (eds.) **Chemistry and Biology**. Boca Raton : CRC Press, p. 1-36.
- KOMARAGIRI, M.; ERDMAN, R.A. Predition of body tissue mobilization in the dairy cow. *In*: Proceedings of the Maryland Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 1995. **Anais**. p. 105.
- KRONFELD, D.S. Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneuos ketosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.65, p.2204-2212, 1982.
- KRONFELD, D.S. The potential importance of the proportions of glucogenic, lipogenic and aminogenic nutrients in regard to the health and productivity of dairy cows. **Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.7,p.5, 1976.
- KRONFELD, D.S.; MAYER, G.P.; ROBERTSON, J.M.; RAGGI, F. Depression of milk secretion during insulin administration. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.553, 1963.
- KRONFELD, D.S.; RAGGI, F.; RAMBERG, C. F.Mammary flow and ketone metabolism in normal, fasted and ketotic cows. **American Journal of Physiology**. v.215, p.218, 1968.
- KUNZ, P.L.; BLUM, J.W.; HART, I.C.; BICKEL, H.; LANDIS, J.Effects of different energy intakes before and after calving on feed intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. **Animal Production**, v.40, p.219, 1985.
- LAGO, E.P. **Avaliação da incidência de transtornos do metabolismo energético de vacas leiteiras**. Piracicaba, 1997. 85 p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ, Universidade de São Paulo.
- LARANJA DA FONSECA, L.F. **Suplementação de propilenoglicol para vacas leiteiras periparturientes: efeitos sobre metabolismo, condição corporal, produção e reprodução**. São Paulo, 1997, 110p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de Sao Paulo.

- LEE, C.S.; WOODING, F.B.P.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell population using electron microscopy of dry cow secretions, colostrum, and milk from normal cows. **Journal of Dairy Research**, v.47, p.39, 1980.
- LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. **The New England Journal of Medicine**, v.314, n.14, p.892-902, 1986.
- LOMAX, M. A.; BAIRD, D. G. Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. **British Journal of Nutrition**, v.49, p.481, 1983.
- LU, M. **Influence of Heat stress and calving on antioxidant activity in bovine blood**. Lexington, 1997. 97 p. Dissertação (Mestrado) – College of Agriculture, University of Kentucky.
- LUNDQUIST, N.S.; PHILLIPS, P.H. Age related studies on ascorbic acid metabolism in animals. **Journal of Dairy Science**, v.25, p.586-595, 1942.
- MACLEOD, D.; OZIMECK, L.; KENNELLY, J.J. Supplemental vitamin C may enhance immune system in dairy cows. *In: Advances in Dairy Technology - Proceedings of the 1996 Western Canadian Dairy Seminar*, v.8, p.227-230, 1996.
- MARQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B. Reaction of compound III of myeloperoxidase with ascorbic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.6074-6078, 1990b.
- MARQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B. VAN WART, H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.5666-5670, 1990a.
- MEPHAN, T.B. Nutrient uptake by lactating mammary gland. *In: GARNSWORTHY, P. C. Nutrition and lactation in the dairy cow*. London : Butterworths, 1988. p. 15-31.
- MITCHELL, G.E.; ROGER, S.A.; HOULIHAN, D.B.; TUCKER, V.C. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.44, p.49, 1986.
- MOALLEN, V.; KAIM, M.; FOLMAN, Y.; SKLAN, D. Effects of calcium soap of fatty acids and administration of somatotropin in early lactation on productive and reproductive performance of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.2127-2136, 1997.
- MOORE, F. Interpreting serum chemistry profiles in dairy cows. **Veterinary Medicine**, v.92, p.903-912, 1997a.
- MOORE, F. Serum chemistry profiles in dairy cows – A herd management tool ?. **Veterinary Medicine**, v.92, p.986-999, 1997b.
- MOSER, U. Uptake of ascorbic acid by leukocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.498, p.200-214, 1987.

- MOSER, U.; WEBER, F. Uptake of ascorbic acid by human granulocytes. **International Journal of Vitamin Nutrition Research**, v.54, p.47-53, 1984.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL, **Current Concepts of Bovine Mastitis**. 4 ed. Madison, 1996. 64 p.
- NIELSEN, M.; AARTS, M.G.A.; JONKERS, A.G.M.; WENSING, T.; SCHUKKEN, Y.H. Evaluation of two side tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p. 299, 1994.
- NOCEK, J.E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 3598-3629, 1991.
- NOCKELS, C.F. The role of vitamins in modulating disease resistance. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.4, n.3, p.531-542, 1988a.
- NOCKELS, C.F. Immunoenhancing vitamins for cattle. **Agri-Practice**. v.9, n.2, p.10-17, 1988b.
- NOCKELS, C.F. **Immunoenhancing effects of vitamins**. In: Proceedings of National Feed Ingredients Association. Nutrition Institute, Kansas City, 1990. **Anais**. Paginação irregular.
- NRC **Nutrient Requirements for Dairy Cattle**. National Academy of Science, 6 ed, Washigton :National Academy Press, 1989. p.42-48.
- ORSKOV, E.R. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1624, 1986.
- OTCHERE, E.O.; MCGILLIARD, A.D.; YOUNG, J.W. Quantification of α -linked glucose polymeres passing to the small intestine in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.57, p. 1189, 1974.
- PAAPE, M.J.; WERGIN, W.P.; GUILDRY, A.J. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. **Advances in Experimental Medical Biology**, v.137, p. 555, 1981.
- PATTON, R.; POLEY, G. Understanding of energy status of prepartum cow improves. **Feedstuffs**. v.68, n.24, p.12-14 e 22, 1996.
- PEARSON, E.G.; DIRKSEN, G.; MEYER, J.; SEITZ, A.; ROWE, K. Evaluation of liver functions tests in neonatal calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.207, n.11, p.1466-1468, 1995.
- PEDRON, P.; CHELI, F.; SENATORE, E.; BAROLI, D.; RIZZI, R. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2528, 1993.
- PERSSON, K.; SANDGREN, C.H.; RODRIGUES-MASTINEZ, H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues using indium-III-labeled neutrophils and biopsies. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.2235, 1992.

- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis Counter attack – A strategy to combat mastitis**. Naperville : Babson Bros, 1991. 150p.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**, Piracicaba, 1985. 467p.
- PRESTOTT, S.C.; BREED, R.S. The determination of number of body cells in milk by indirect method. **Journal of Infectious Diseases**, v.7, p.632, 1910.
- REDDY, P.G.; FREY, R.A. Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. *In*: BLECHA, F.; CHARLEY, B. (eds) **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.35, p.255-281, 1990.
- REID, I.M.; COLLINS, R.A.; BAIRD, G.D.; ROBERTS, C.J.; SYMONDS, H.W. Effect of body condition at calving on tissue metabolism, development of fatty liver and blood chemistry of dairy cows. **Animal Production**, v.43, p.7, 1986.
- RENEAU, J.K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.1708, 1988.
- REYNOLDS, C.K.; HUNTINGTON, D.S. Partition of portal-drained visceral net flux in beef steers. 1. Blood flow and net flux of oxygen, glucose and nitrogenous compounds across the stomach and post-stomach tissues. **British Journal of Nutrition**, v.60, p.539, 1988.
- RICHARDS, M.W.; ETTERMAN, R.P.; SCHOENEMANN, H.M. Nutritional anestrus in beef cows: concentrations of glucose and nonesterified fatty acid in plasma and insulin in serum. **Journal of Animal Science**, v.67, p.2354-2362, 1989.
- RIVERS, J.M. Safety of high-level vitamin C ingestion. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.498, p.445-453, 1987.
- ROBERTS, C.J.; REID, I.M. Fat cow syndrome and subclinical fatty liver. *In*: HOWARD, J.L. **Current Veterinary Therapy 3 – Food Animal Practice**. Philadelphia : Saunders, 1993. p. 315-318.
- ROEDER, R.A. Beyond deficiency: new views of vitamins in ruminant nutrition and health: an overview. **The Journal of Nutrition**, v.125, p.1790S-1791S, 1995.
- ROTH, J.A.; KAEBERLE, M.L. In vivo effect of ascorbic acid on neutrophil function in healthy and dexametasone-treated cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.12, p.2434-2436, 1985.
- ROUSSEL, A.J.; WHITNEY, M.S.; COLE, D.J. Interpreting a bovine serum chemistry profile: part 1. **Veterinary Medicine**. v.92, p. 553-558, 1997.
- ROUSSEL, J.D.; ARANAS, T.J.; SEYBT, S.H. Metabolic profile testing in Holstein cattle in Louisiana: reference values. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.1658-1660, 1982.
- SARTIN, J.L.; KEMPPAINEN, R.J.; CUMMINS, K.A.; KESTON, A.S. Plasma concentration of metabolic hormones in high and low producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.650, 1988.

- SAS Institute Inc., **SAS user's guide:statistics**. Ver. 5 ed. Cary: SAS Institute. 1985.
- SASAKI, S. Insulin resistance in ovine skeletal muscle: insulin binding and insulin action. **Asian Australian Journal of Animal Science**, v.2, p.218-219, 1989.
- SAUBERLICH, H.E.; Ascorbic acid. *In*: OLSON, R.E.; BROQUIST, H.P.; CHICHESTER, C.O.; DRBY, W.J.; KOLBYE, A.C.Jr.; STALBEY, R.M. (eds.) **Nutrition Reviews, present knowledge in nutrition**, 5 ed. Washington : The Nutrition Foundation, 1984. p.260.
- SCHRICK, F.N.; SPITZER, J.C.; JENKINS, J.C.; HENRICKS, D.M., ALTHEN, T.G. Effect of dietary energy restriction on metabolic and endocrine response during the estrus cycle of suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v.68, p.3313-3321, 1990.
- SCHÜEP, W.; KECK, E. **The analysis of ascorbic acid derivatives**. *In*: Symposium on Ascorbic Acid in Domestic Animals, Karlsruhe Ittingen, 1990. **Anais**. Paginação irregular.
- SHAFFER, L., ROUSSEL, J.D.; KOONCE, K.L. Effects of age, temperature-season, and breed on blood characteristics of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.1, p.62-70, 1981.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamin E and C. β -caroteno, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1325S-1321S, 1995.
- SKAAR, T.C.; GRUMMER, R.R.; DENTINE, M.R.; STAUFFACHER, R.H. Seasonal effects of prepartum and postpartum fat and niacin feeding on lactation performance and lipid metabolism. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2028-2038, 1989.
- SMITH, K.L.; HARRISON, J.H.; HANCOCK, D.D.; TODHUNTER, D.A.; CONRAD, H.R. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1293-1300, 1984.
- SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. **Milk quality: a worldwide perspective**. *In*: Proceedings of 37th National Mastitis Council Annual Meeting, Saint Louis, 1998. **Anais**. Madison : National Mastitis Council, 1998. p.3-9.
- SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C.; AKERS, R.M.; OLIVER, S.P. Secretion composition during bovine mammary involution and relationship with mastitis. **International Journal of Biochemistry**, v.19, p.1165, 1987.
- SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C. Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.1112, 1988.
- SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C.; AKERS, R.M. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.228, 1989.

- SORDILLO, L.M.; AFSETH, G.; DAVIES, G.; BABUIK, L.A. Effects of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on bovine peripheral blood and mammary gland neutrophil function *in vitro*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.56, p. 16, 1992.
- SORDILLO, L.N.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.80, p. 1851-1865, 1997.
- SOUZA, P.M. **Perfil bioquímico serico de bovinos das raças Gir, Holandesa e Girolanda, criados no estado de São Paulo – Influencia de fatores de variabilidade etários e sexuais**. São Paulo, 1997. 168p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- STUDER, V.A.; GRUMMER, R.R.; BERTICS, S.J.; REYNOLDS, C.K. Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2931-2939, 1993.
- TIETZ, M.W., **Fundamental of Clinical Chemistry**. 2 ed., Philadelphia : Saunders, 1982. 240p.
- TREACHER, R.J.; REID, I.M.; ROBERTS, C.J. Effects of body condition at calving on the health and performance of dairy cows. **Animal Production**, v.43, p.1-16, 1986.
- TURNWALD, G.H.; TROY, G.C. Hypoglycemia. Part 1. Carbohydrate metabolism and laboratory evaluation. **Compendium of Continuing Education**, v.5, n.4, p.932-937, 1983.
- VAZQUEZ-ANON, M.; BERTICS, S.; LUCK, M.; GRUMMER, R. R. Periparturient liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1521, 1994.
- VEENHUIZEN, J.J.; DRACKLEY, J.K.; RICHARD, M.J.; SANDERSON, T.P.; MILLER, L.D.; YOUNG J.W. Metabolic changes in blood and liver during development and treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.4238, 1991.
- VERMA, R.P.; BHAGI, H.K.; MISHRA, R.R. Levels of cholesterol, acid phosphatase and ascorbic acid in cross bred cattle. **Indian Journal of Dairy Science**, v.46, n.4, p.162-165, 1993.
- VERNON, R.G. Endocrine control of metabolic adaptation during lactation. **Proceeding of Nutrition Society**, n.48, p.23-32, 1989.
- VERNON, R.G. The partition of nutrient during the lactation cycle. *In*: GARNSWORTHY, P.C. **Nutrition and lactation in the dairy cow**. London : Butterworths, 1988. p 32-52.
- VERNON, R.G.; FINLEY, E. Roles of insulin and growth hormone in the adaptations of fatty acid synthesis in white adipose tissue during lactation cycle in sheep. **Biochemistry Journal**, n.256, p.873-878, 1988.

- VERNON, R.G.; SASAKI, S. Control of responsiveness of tissue to hormones. *In*: TSUDA, T.; SASAKI, S.; KAWASHIMA, R. (eds.) **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants – Proceedings of the seventh International Symposium on ruminant physiology**, San Diego : Academic Press, 1991. p.155-181.
- VERNON, R.G.; TAYLOR, E. Insulin, dexametasone, and their interactions in the control of glucose metabolism in adipose tissue from lactating and nonlactating cycle in sheep. **Biochemistry Journal**, n.256, p.509-514, 1988.
- VICINI, J.L.; BUONOMO, F.C.; VEENHUIZEN, J.J.; MILLER, M.A.; CLEMMONS, D.R.; COLLIER, R.J. Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor-binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v.121, p.1656-1664, 1991.
- VRZGULA, L. (eds.) **Metabolic disorders and their prevention in farm animals**. Amsterdam : Elsevier, 1991. p.243-246.
- WASHKO, P. W.; WELCH, R.W.; DHARIWAL, K. R.; WANG, Y.; LEVINE, M. Ascorbic acid and dehydroascorbic analyses in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v.204, p.1-14, 1992.
- WASHKO, P.; ROTROSEN, D.; LEVINE, M. Ascorbic acid in human neutrophils. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.1221S-1227S, 1991.
- WAYNER, D.D.M., BURTON, G. W. Mesurement of individual antioxidants and radical trapping activity. *In*: NIQUEL, J.; QUINTANILHA, A.D.; WEBER, H. (eds.) **CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidands in Biomedicine**. Boca Raton : CRC Press, 1989. v.3, p.223-232.
- WEAVER, L.D. Reproductive management programs for large dairies. *In*: MORROW, D.A. (ed.) **Current Therapy in Theriogenology**. 2 ed., Philadelphia : Saunders, 1986, p.383-389.
- WEEKES, T.E.C. Hormonal control of glucose metabolism. *In*: TSUDA, T.; SASAKI, S.; KAWASHIMA, R. (eds.) **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants – Proceedings of the seventh International Symposium on ruminant physiology**. San Diego : Academic Press, 1991. p.183-200.
- WILLIANSON, D.H.; MELANBY, J.; KREBS, H.A. Enzymatic determination of D(-)-b-hydroxybutiric acid and acetoacetic acid in blood. **Biochemistry Journal**, v.82, p.90-96, 1962.
- WINKLER, B.S.; ORSELLI, S.M.; REX, T.S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. **Free Radical Biology & Medicine**, v.17, p.333-349, 1994.
- YOUNG, J. W. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. **Journal of Dairy Science**, v.60, p.1, 1977.

APÊNDICE 1 –PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO
E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de Lactação ¹				Médias	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	7	16,59 ^b	21	30,31 ^a	26,88 ^a	
29-56	10	23,84 ^a	24	31,20 ^a	29,35 ^a	
57-140	9	21,62 ^{ab}	19	26,61 ^a	25,00 ^a	
141-280	12	19,42 ^{ab}	19	18,18 ^b	18,65 ^b	
Média	38	20,58	77	26,94	24,95	0,7687

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 2 - PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia): EFEITO DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO,
COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda ¹						Médias ¹	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	N	C		
1-28	13	26,34	5	27,20	10	27,43	26,88 ^a	
29-56	15	32,06	5	32,64	14	24,51	29,35 ^a	
57-140	12	26,57	5	28,36	11	21,76	25,00 ^a	
141-280	13	21,45	5	24,16	13	13,75	18,65 ^b	
Média²	53	26,81^a	20	28,09^a	48	21,58^b	24,95	0,7687

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

² Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 3 - PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia): EFEITO DO NÚMERO DE LACTAÇÕES,
COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de Lactação	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	N	C		
Primíparas	22	21,75	8	22,97	14	18,07	20,58	
Múltiparas	43	29,07	12	31,50	34	23,01	26,94	
Média²	53	26,81	20	28,09	48	21,58	24,95	0,7687

² Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 4 –CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (log cel/ml X 1000): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de lactação				Médias	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	7	4,48	23	5,49	5,26	
29-56	9	4,15	25	5,07	4,83	
57-140	11	4,98	25	5,05	5,02	
141-280	14	5,15	24	5,23	5,20	
Média	41	4,77	97	5,07	5,07	0,126

APÊNDICE 5 - CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (log cel/ml X 1000): EFEITO DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
1-28	9	6,73	12	4,58	9	4,69	5,26	
29-56	11	5,26	9	4,08	14	4,96	4,83	
57-140	12	5,33	14	4,18	10	5,84	5,02	
141-280	12	6,18	16	4,28	10	5,50	5,20	
Média¹	44	5,83^a	51	4,29^b	43	5,24^a	5,07	0,126

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 6 - CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (log cel/ml X 1000): EFEITO DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de Lactações	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
Primíparas	9	5,86	19	4,06	13	5,12	4,77	
Múltiparas	35	5,74	32	4,42	30	5,28	5,20	
Média	44	5,83^a	51	4,29^b	43	5,24^a	5,07	0,126

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 7 – ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/l): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de Lactações				Médias	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	10	2,39	26	2,78	2,67	
29-56	10	2,74	24	2,54	2,60	
57-140	10	2,27	24	2,54	2,46	
141-280	16	2,55	24	2,67	2,63	
Secas	10	2,62	22	2,59	2,60	
Média	56	2,63	120	2,52	2,59	0,0693

APÊNDICE 8 - ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/l): EFEITO DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
1-28	13	2,55	13	2,97	10	2,44	2,67	
29-56	12	3,09	9	2,95	13	1,91	2,60	
57-140	10	2,97	13	2,54	11	1,91	2,46	
141-280	12	2,43	16	2,88	12	2,46	2,63	
Secas	11	2,46	12	3,08	9	2,12	2,60	
Média¹	58	2,69^a	63	2,88^a	55	2,16^b	2,59	0,0693

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 9 - ÁCIDO ASCÓRBICO PLASMÁTICO (mg/l): EFEITOS DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de Lactações	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
Primíparas	19	2,63	24	2,61	13	2,15	2,51	
Múltiparas	39	2,72	39	3,04	42	2,16	2,63	
Média¹	58	2,69^a	63	2,88^a	55	2,16^b	2,59	0,0693

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 10 - ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS NO PLASMA (AGNE), EM $\mu\text{Eq/l}$: EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

LACTAÇÕES						
Estágio de Lactação (dias)	Número de Lactações				Médias ¹	Erro Padrão da Média
	Primíparas		Múltiparas			
	n		n			
1-28	9	0,289	26	0,315	0,308 ^a	
29-56	12	0,235	25	0,258	0,250 ^{ab}	
57-140	10	0,225	25	0,225	0,225 ^b	
141-280	14	0,188	26	0,194	0,192 ^b	
Secas	11	0,193	28	0,267	0,246 ^{ab}	
Média	56	0,222	130	0,252	0,2430	0,0095

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

APÊNDICE 11 - ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS NO PLASMA (AGNE) , EM $\mu\text{Eq/l}$: EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias ¹	Erro Padrão da Média
	A		B		C			
	n		n		n			
1-28	13	0,247	12	0,299	10	0,397	0,308 ^a	
29-56	15	0,193	9	0,203	13	0,349	0,250 ^{ab}	
57-140	11	0,212	14	0,207	10	0,264	0,225 ^b	
141-280	12	0,169	15	0,205	13	0,194	0,192 ^b	
Secas	11	0,239	12	0,223	16	0,268	0,246 ^{ab}	
Média	62	0,211	62	0,227	62	0,290	0,2430	0,0095

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

APÊNDICE 12 - ÁCIDOS GRAXOS NÃO ESTERIFICADOS NO PLASMA (AGNE) , EM $\mu\text{Eq/l}$: EFETOS DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de Lactações	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	A		B		C			
	N		n		n			
Primíparas	20	0,205	20	0,234	14	0,225	0,222	
Múltiparas	42	0,214	42	0,222	48	0,309	0,252	
Média	62	0,211	62	0,227	62	0,290	0,2430	0,0095

APÊNDICE 13–ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ESCALA DE 1 A 5): EFEITOS DE
ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de LACTAÇÕES				Médias ¹	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	10	3,42	25	3,32	3,35 ^a	
29-56	11	3,29	25	3,33	3,32 ^c	
57-140	11	3,64	25	3,42	3,49 ^c	
141-280	16	3,64	25	4,04	3,88 ^{bc}	
Secas	11	4,00	29	4,12	4,09 ^{ab}	
Média	59	3,60	129	3,67	3,64	0,054

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 14 –ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ESCALA DE 1 A 5): EFEITO DE
ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias ¹	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
1-28	12	3,67	13	3,46	10	3,17	3,35 ^a	
29-56	13	3,48	9	3,17	14	3,28	3,32 ^c	
57-140	11	4,00	14	3,06	11	3,54	3,49 ^c	
141-280	12	4,25	16	3,50	13	4,02	3,88 ^{bc}	
Secas	12	4,52	12	3,75	16	4,01	4,09 ^{ab}	
Média	60	3,91^a	64	3,39^b	64	3,64^{ab}	3,64	0,054

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 15 - ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ESCALA DE 1 A 5): EFEITO DE
NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de Lactações	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
Primíparas	21	3,92	24	3,35	14	3,55	3,66	
Múltiparas	39	3,90	40	3,41	50	3,66	3,60	
Média¹	60	3,91^a	64	3,39^b	64	3,64^{ab}	3,64	0,054

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 16 - GLICOSE PLASMÁTICA (mg/dl): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de Lactações				Médias ¹	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	10	59,70 ^a	24	53,13 ^b	55,06 ^b	
29-56	12	55,83 ^a	25	58,40 ^{ab}	57,57 ^b	
57-140	11	54,45 ^a	25	54,64 ^b	54,58 ^b	
141-280	13	59,08 ^a	25	59,20 ^{ab}	59,16 ^{ab}	
Secas	11	64,82 ^a	28	66,75 ^a	66,21 ^a	
Média²	57	58,66	133	58,72	58,67	0,8667

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

² Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 17 - GLICOSE PLASMÁTICA (mg/dl): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias ¹	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
1-28	13	51,61	12	47,83	9	69,67	55,06 ^b	
29-56	15	53,47	9	49,11	13	68,15	57,57 ^b	
57-140	12	50,00	14	47,21	10	70,40	54,58 ^b	
141-280	13	55,08	15	52,93	10	73,80	59,16 ^{ab}	
Secas	12	62,25	12	61,67	15	73,00	66,21 ^a	
Média²	65	54,40^b	62	51,79^b	57	71,05^a	58,67	0,8667

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

² Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 18 - GLICOSE PLASMÁTICA (mg/dl): EFEITOS DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de LACTAÇÕES	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
Primíparas	22	57,64	23	52,86	12	71,91	58,66	
Múltiparas	43	52,74	39	51,15	45	70,82	58,72	
Média¹	65	54,40^b	62	51,79^b	57	71,05^a	58,67	0,8667

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 19 - β -HIDROXIBUTIRATO NO PLASMA (mg/dl): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de Lactações				Médias	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	10	5,36	25	5,63	5,56	
29-56	12	5,48	26	5,34	5,38	
57-140	11	5,57	25	5,02	5,19	
141-280	14	5,01	26	5,67	5,43	
Secas	11	4,13	29	4,66	4,51	
Média	58	5,11	131	5,25	5,21	0,142

APÊNDICE 20 - β -HIDROXIBUTIRATO NO PLASMA (mg/dl): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
1-28	13	4,59	12	7,21	10	4,83	5,56	
29-56	15	4,91	9	5,88	14	5,58	5,38	
57-140	12	5,25	13	5,48	11	4,78	5,19	
141-280	13	4,67	15	5,86	12	5,93	5,43	
Secas	12	3,89	12	4,02	16	5,36	4,51	
Média¹	65	4,67^a	61	5,68^a	63	5,29^{ab}	5,21	0,142

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 21 - β -HIDROXIBUTIRATO NO PLASMA (mg/dl): EFEITOS DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de LACTAÇÕES	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
Primíparas	22	4,58	23	5,77	13	4,82	5,109	
Múltiparas	43	4,72	38	5,63	50	5,42	5,254	
Média	65	4,67^a	61	5,68^a	63	5,29^{ab}	5,21	0,142

¹ Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).

APÊNDICE 22 - ATIVIDADE DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE SÉRICA (UI/I):
EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE
LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de LACTAÇÕES				Médias	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	10	29,80	26	27,00	27,78	
29-56	10	29,80	23	28,48	28,88	
57-140	10	29,20	25	30,96	30,46	
141-280	15	32,33	25	28,80	30,13	
Secas	11	25,73	29	27,21	26,80	
Média	56	29,57	128	28,44	28,78	0,536

APÊNDICE 23 - ATIVIDADE DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE SÉRICA (UI/I):
EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR
FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
1-28	13	24,77	13	28,15	10	31,20	27,78	
29-56	15	27,53	8	28,87	10	30,90	28,88	
57-140	11	29,90	14	29,57	10	32,30	30,46	
141-280	12	28,58	15	30,80	13	30,77	30,13	
Secas	12	25,83	12	27,25	16	27,18	26,80	
Média	63	27,25	62	29,03	59	30,15	28,78	0,536

APÊNDICE 24 - ATIVIDADE DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE SÉRICA (UI/I):
EFEITOS DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR
FAZENDA

Número de LACTAÇÕES	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
Primíparas	20	27,55	23	30,08	13	31,77	29,57	
Múltiparas	43	27,11	39	28,41	46	29,65	28,44	
Média	63	27,25	62	29,03	59	30,15	28,78	0,536

APÊNDICE 25 - INSULINA SÉRICA ($\mu\text{UI/l}$): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO E DE NÚMERO DE LACTAÇÕES

Estágio de Lactação (dias)	Número de LACTAÇÕES				Médias ¹	Erro Padrão da Média
	n	Primíparas	n	Múltiparas		
1-28	10	10,04	24	10,50	10,37 ^{bc}	
29-56	12	15,40	25	16,63	16,23 ^c	
57-140	10	16,02	25	15,69	15,79 ^b	
141-280	14	20,51	26	31,70	27,78 ^a	
Secas	11	9,72	29	14,70	13,33 ^{bc}	
Média	57	14,73	129	17,91	16,93	1,026

¹ Linhas com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

APÊNDICE 26 - INSULINA SÉRICA ($\mu\text{UI/l}$): EFEITOS DE ESTÁGIO DE LACTAÇÃO, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Estágio de Lactação (dias)	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
1-28	12	10,30	12	8,69	10	12,65	10,37 ^{bc}	
29-56	14	17,38	9	18,22	14	13,79	16,23 ^c	
57-140	11	14,47	14	15,90	10	17,07	15,79 ^b	
141-280	12	16,67	15	40,78	13	23,04	27,78 ^a	
Secas	12	12,93	12	10,06	16	16,08	13,33 ^{bc}	
Média	61	14,42	62	19,73	63	16,82	16,93	1,026

APÊNDICE 27 - INSULINA SÉRICA ($\mu\text{UI/l}$): EFEITOS DE NÚMERO DE LACTAÇÕES, COM DISTRIBUIÇÃO POR FAZENDA

Número de LACTAÇÕES	Fazenda						Médias	Erro Padrão da Média
	n	A	n	B	n	C		
Primíparas	20	13,67	23	14,56	14	16,50	14,73	
Múltiparas	41	14,78	39	22,78	49	16,65	17,91	
Média	55	14,42	61	19,73	54	16,82	16,93	1,026

APÊNDICE 28– DIETAS DA FAZENDA A: COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA, COM
BASE NA MATÉRIA SECA.

Composição	Lote 1 Lactação	Lote Vaca Seca	Feno Alfafa (Vaca Seca)
% MS	44,60	42,66	86,95
% PB	13,86	9,29	18,03
% MM	6,05	6,91	8,80
% EE	2,66	1,78	1,23
% FB	17,46	19,06	26,05
% FDA	23,41	24,66	31,00
% FDN	39,92	46,01	39,57
% Ca	0,67	0,56	1,21
% P	0,34	0,31	0,22

MS: Matéria Seca; PB: Proteína Bruta; MM: Matéria Mineral; EE: Extrato Etéreo; FB: Fibra Bruta; FDA: Fibra Detergente Ácido; FDN: Fibra Detergente Neutro; Ca: Cálcio; P: Fósforo.

APÊNDICE 29– DIETAS DA FAZENDA B: COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA COM
BASE NA MATÉRIA SECA.

Composição	Lote 1 (Início de Lactação)	Lote 2 (Meio de lactação)	Lote 3 (Final de lactação)	Lote Vaca Seca
% MS	50,43	51,83	51,10	41,28
% PB	15,78	15,66	14,09	8,40
% MM	6,66	6,67	7,14	4,82
% EE	2,61	2,73	2,74	1,27
% FB	15,35	14,54	14,95	8,40
% FDA	19,95	18,80	19,32	29,12
% FDN	35,40	35,48	35,35	50,61
% Ca	0,89	0,99	1,02	0,41
% P	0,42	0,43	0,41	0,12

MS: Matéria Seca; PB: Proteína Bruta; MM: Matéria Mineral; EE: Extrato Etéreo; FB: Fibra Bruta; FDA: Fibra Detergente Ácido; FDN: Fibra Detergente Neutro; Ca: Cálcio; P: Fósforo.

APÊNDICE 30– DIETAS DA FAZENDA C: COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA COM
BASE NA MATÉRIA SECA.

Composição	Lote 1 (Início de Lactação)	Lote 2 (Final de lactação)	Lote Vaca Seca
% MS	26,36	23,25	19,41
% PB	17,70	16,59	15,35
% MM	8,77	8,12	8,34
% EE	2,56	3,07	2,51
% FB	20,12	21,85	25,50
% FDA	27,41	29,21	35,24
% FDN	48,51	50,43	55,77
% Ca	0,79	0,76	0,56
% P	0,49	0,52	0,49

MS: Matéria Seca; PB: Proteína Bruta; MM: Matéria Mineral; EE: Extrato Etéreo; FB: Fibra Bruta; FDA: Fibra Detergente Ácido; FDN: Fibra Detergente Neutro; Ca: Cálcio; P: Fósforo