CELSO AKIO MARUTA

**Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos
às condições de alimentação normal, jejum e
realimentação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo
2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

4/3/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1489
FMVZ

Maruta, Celso Akio

Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos às condições de alimentação normal, jejum e realimentação / Celso Akio Maruta – São Paulo : C. A. Maruta, 2005.

93 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2005.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Perfil metabólico. 2. Perfil ruminal. 3. Jejum.
4. Realimentação. 5. Bovinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudos comparativos de provas Laboratoriais utilizadas no diagnóstico de carência protéica-energética em bovinos jovens", protocolo nº595/2004, utilizando 12 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Comparative study of clinical Laboratory assays for the diagnosis of prolonged energetic deficit in steers", protocol number 595/2004, utilizing 12 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: MARUTA, Celso Akio

Título: Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos às condições de alimentação normal, jejum e realimentação

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: 28 / 03 / 2005

Banca Examinadora

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani (Orientador)
Assinatura: _____

Instituição: FMVZ/USP
Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Júlio Naylor Lisboa
Assinatura: _____

Instituição: UEL
Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Francisco Gacek
Assinatura: _____

Instituição: UNISA
Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior
Assinatura: _____

Instituição: FMVZ/USP
Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Maria Claudia A. Sucupira
Assinatura: _____

Instituição: FMVZ/USP
Julgamento: Aprovado

Dedico esta Tese ao:

Professor Doutor Enrico Lippi Ortolani

*Professor, quanto mais tempo passamos juntos maior é a minha admiração, respeito,
carinho, conhecimentos etc.*

*Ratificando o que está escrito na minha Dissertação de Mestrado, o senhor continua sendo um
exemplo a ser seguido tanto na vida profissional
como na vida pessoal.*

*Parece que agora a nossa parceria Orientador-Orientado chegou ao fim, porém espero
estar iniciando uma nova parceria científica...*

**Agradeço ao meu pai Nobuiti Maruta (in memoriam).
Pai, finalmente, consegui alcançar o meu objetivo
dentro da Universidade, como havia falado para você...
Gostaria que você estivesse presente para comemorarmos
juntos esta nova conquista...
Muitas saudades!!!**

**Agradeço à minha mãe Akemi Maruta.
Mãe, hoje estou conseguindo retribuir toda
a dedicação de vida que vocês tiveram comigo...
Espero nunca te desapontar e sempre estar presente
quando precisar...
Eu te amo!!!**

*Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhadas (o),
**Ricardo, Conceição, Fabrício, Fábio, Priscilla, Élcio,
Suzi, Márcio, Fátima, Rafael, Claudia, Hae e
Luis** (vai nascer em junho!!!).
Graças a Deus, fui agraciado em fazer parte desta
família. Apesar das dificuldades, sempre conseguimos
ajudar uns aos outros e nunca deixamos de estender a
mão a quem precisou, seja da família ou dos amigos...
Vamos tentar manter esta união para sempre!!!*

*À minha namorada **Miriam Lisbôa**.
Você mostrou que podemos viver cada dia
intensamente, basta seguirmos o que a nossa
consciência diz...
Eu te amo!!!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, meu professor na Graduação e orientador na Pós-Graduação pelos conhecimentos técnicos e científicos, além dos exemplos de dedicação ao trabalho, à família e exaltação dos princípios éticos, principalmente, o da honestidade. Professor, agradeço todos estes anos de convivência e paciência, espero que nosso relacionamento científico e a nossa amizade sejam eternos. Desculpe todos os momentos em que estive ausente, mas pode ter certeza que o meu pensamento sempre esteve aqui.

À VALLÉE S.A., indústria nacional de produtos veterinários, em especial ao presidente Dr. Ronan de Freitas Pereira, ao diretor de gestão tecnológica Dr. Américo Martins Craveiro e aos amigos da Diretoria de Gestão Tecnológica, Alessandra Silva Lima, Ana Célia Severo, Ana Karina, Cristina Cortez, Maria Cláudia Sucupira, Maria do Carmo Cilento, Moacir Marchiori Filho, Neide Oliveira, Sandra Gatti, Sérgio Cirillo, pela amizade, convívio e apoio especialmente durante a fase final deste trabalho.

A amiga Clara Satsuki Mori, pela grande e competente ajuda durante todo o doutorado tanto durante todas as coletas como durante toda a parte laboratorial. Muito obrigado pelo convívio, amizade, dedicação durante esse período.

Aos amigos da “Família Científica Ortolani”: Alessandra Silva Lima, Alexandre Coutinho Antonelli, Maria Cláudia Sucupira, Neria Vânia Marcos dos Santos, Pierre Castro Soares e Sandra Satiko Kitamura, Luiz Augusto Batista Brito e Carlos Henrique Machado muito obrigado pelo convívio, amizade e companheirismo, sem esquecer a ajuda de vocês durante as cirurgias e coletas de materiais, mais uma vez, obrigado!

A grande amiga Marta Lizandra do Rêgo Leal, pessoa muito gente fina, amiga, fiel, carinhosa, alegre etc. Obrigado pela ajuda nesta última fase de confecção da tese.

Espero nunca perder contato com você e manter esta nossa amizade para sempre...

Ao Agnaildo Arcanjo dos Santos, por ter tratado dos animais durante todo o período experimental, bem como por ter ajudado em todas as coletas. Muito obrigado!

A Regina Mieko Sakata Mirandola, muito obrigado pelo incentivo, atenção e apoio durante as análises laboratoriais, bem como pela amizade e convívio.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica, Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera; Prof. Dr. Cássio Xavier de Mendonça Jr.; Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel; Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Jr.; Prof. Dr. Fernando José Benesi; Profa. Dra. Lillian Gregory; Prof. Dra. Raquel Yvone Arantes Baccarin; Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo; Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, pelo convívio e pelo compartilhamento de informações e experiências.

Aos amigos da Vallée/Uberlândia Andréa Marques Marra, Carlos Roberto Silva, Carlos José Tolentino, Ricardo Bitu, Fábio Lúcio Costa e Láudio Alessi, por me receber de braços abertos em Uberlândia, pelos ensinamentos de trabalho, colaboração, amizade e convivência. Muito obrigado!

Aos funcionários do Hospital de eqüinos, Márcio De La Penha Chiacchio e especialmente ao Marquinho, ao Ganga, ao Luizinho, ao Osmar e ao Gervásio, pelo apoio estrutural e ajuda no manejo dos animais.

Aos colegas de pós-graduação, Agnes Veridiana Mori, Enio Mori, Lúcia Shoultzu, Maria Consuelo Caribe Ayres, Rinaldo Batista Viana pela convivência e apoio.

Aos funcionários do departamento de Clínica Médica Alice, Adelaide de Jesus Borges, Maria Aparecida Freitas e Abelardo Souza (Dinho) pelo apoio estrutural e convívio.

A Harumi Doi Shiraishi, pela amizade, grande ajuda e constante disponibilidade em facilitar a nossa vida. Muito obrigado!

Aos funcionários da biblioteca, pelo profissionalismo, cordial atendimento e amizade.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela minha formação acadêmica, pós-graduação e por me acolher desde 1991.

Aos bovinos que foram fundamentais para a realização deste trabalho e que foram respeitados de acordo com os princípios de Bem Estar Animal.

A FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto, possibilitando assim sua realização.

A CAPES pela concessão da bolsa durante um ano e meio.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

A DEUS POR ESTAR AO MEU LADO EM TODOS OS MOMENTOS...

RESUMO

MARUTA, C. A. Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos às condições de alimentação normal, jejum e realimentação. **Ruminal and metabolic profile of fed, fasted and refeed steers. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.**

Estudou-se o efeito da alimentação, do jejum e da realimentação sobre o perfil metabólico e ruminal de bovinos em crescimento. Para tal, empregaram-se 12 garrotes mestiços, com cerca de 300 kg, obtendo-se amostras de sangue e fluido ruminal no decorrer dos seguintes períodos: 11 horas de alimentação normal (período pós-prandial), 48 horas consecutivas de jejum alimentar, seguida de 48 horas de realimentação. Comparado com o período pós-prandial, o jejum provocou as seguintes modificações: moderada hipoglicemia; acompanhada por marcante lipólise, detectada pelo aumento nos teores plasmáticos de ácidos graxos livres; ausência de lipidose hepática, visto que não ocorreram alterações na atividade da aspartato aminotransferase e nos teores de colesterol sérico; discreta cetogênese, confirmada pela pequena elevação de β -hidroxibutirato; e certo grau de proteólise, verificado pelo aumento dos teores de uréia sérica e da excreção urinária de uréia. Nesse mesmo período ocorreu uma ligeira hipovolemia, caracterizada pelo aumento no déficit de volume intravascular. Este quadro metabólico verificado durante o jejum foi completamente revertido durante a realimentação, com exceção da proteólise que foi temporariamente maior. O jejum provocou notável modificação no perfil ruminal: intensa elevação no pH do fluido; diminuição marcante na flora e fauna que foi detectada, respectivamente, pela menor quantidade de matéria seca bacteriana e expressiva redução no número de protozoários; notória elevação no tempo de redução do azul de metileno; queda no índice de excreção urinária de alantoína, contudo sem alteração no índice de excreção urinária de ácido úrico. A realimentação promoveu completa e rápida recuperação das variáveis do perfil ruminal, com exceção do número de protozoários, que embora tenha se elevado, não atingiu os valores basais. A prova

de redução de azul de metileno apresentou alta correlação positiva ($r = 0,89$) com a quantidade de matéria seca bacteriana. Devido à facilidade, rapidez e praticidade de ser conduzida e a alta sensibilidade indica-se a prova de redução do azul de metileno como teste de eleição na análise do perfil ruminal.

Palavras-chave: Perfil metabólico. Perfil ruminal. Jejum. Realimentação. Bovinos.

ABSTRACT

MARUTA, C. A. **Ruminal and metabolic profile of fed, fasted and refeed steers.** [Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos às condições de alimentação normal, jejum e realimentação]. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The effect of feeding, fasting and refeeding on metabolic and ruminal profile of steers was studied. Thus, blood and ruminal samples were drawn of twelve 300 kg crossbred steers throughout three different periods: 11 hour during normal feeding, 48 hour of fasting followed by the same time of refeeding. The fasting caused a moderate hypoglycemia, followed by marked lipolysis, detected by the high plasma free fatty acid concentration, but there was no evidence of hepatic lipidosis, since there were no changes in the activity of aspartate aminotransferase and serum cholesterol levels; a discrete ketogenesis occurred as there was a slight increase in the β -hidroxibutirate concentration; proteolysis were detected by the increase of serum and urinary excretion of urea. During the fasting the animals developed a slight hypovolemia detected by the increase of the plasma volume deficit. These metabolic changes were completely reversed during the refeeding, but the proteolysis had a temporary increase. The fasting gave rise to deeply changes in the ruminal profile, such as: increase in the rumen pH, reduction the number of rumen protozoa and bacteria, as seen by the low bacteria dry matter; increase in the methylene blue reduction time and lowering of the urinary excretion of allantoin, but no changes were seen in the uric acid urinary level. The refeeding made the rumen status return to normal, but the protozoa number that despite a slight increase was very far away from the basal standard. There was a high ($r = 0.89$) positive correlation between the methylene blue reduction time and the rumen bacteria dry matter. Due to the easiness, promptness, feasibility, and its high sensibility the methylene blue reduction method should be used to check the ruminal profile.

Key words: metabolic profile. Ruminal profile. Fasted. Reefed. Bovine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L), ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/L}$) e β -hidroxibutirato (mmol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	42
Tabela 2 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$), uréia (mmol/L), colesterol (mmol/L) e AST - aspartato aminotransferase - (U/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	44
Tabela 3 -	Valores de mediana das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$), uréia (mmol/L), colesterol (mmol/L) e AST – aspartato aminotransferase - (U/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	44
Tabela 4 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de proteína total (g/L), albumina (g/L) e globulina (g/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	46
Tabela 5 -	Valores de mediana das concentrações séricas de proteína total (g/L) e de globulina (g/L), e de média e desvio padrão da concentração sérica de albumina (g/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	47
Tabela 6 -	Valores médios e desvios-padrão do déficit de volume plasmático de proteína total, albumina e globulina de bovinos nos períodos de jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	48
Tabela 7 -	Valores de mediana do déficit de volume plasmático de proteína total, albumina e globulina de bovinos nos períodos de jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	49
Tabela 8 -	Valores médios e desvios-padrão dos índices de excreção urinário de uréia (mMol/L), alantoína (mMol/L) e ácido úrico ($\mu\text{Mol/L}$) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	50

Tabela 9 -	Valores de mediana dos índices de excreção urinário de uréia (mmol/L), alantoína (mmol/L) e ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	51
Tabela 10 -	Valores médios e desvios-padrão do pH, tempo de redução do azul de metileno (minutos), matéria seca (MS) bacteriana indireta (absorbância) e número de protozoários (unidades $\times 10^6/\text{mL}$) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	53
Tabela 11 -	Valores médios e desvios-padrão do pH e medianas do tempo de redução do azul de metileno (minutos), matéria seca (MS) bacteriana indireta (absorbância) e número de protozoários (unidades $\times 10^6/\text{mL}$) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) e ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/L}$) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	42
Gráfico 2 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (mmol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	43
Gráfico 3 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) e uréia (mmol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	45
Gráfico 4 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de colesterol (mmol/L) e AST - aspartato aminotransferase - (U/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	45
Gráfico 5 -	Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de proteína total (g/L), albumina (g/L) e globulina (g/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	47
Gráfico 6 -	Valores médios e desvios-padrão do déficit de volume plasmático (DVP) de proteína total, albumina e globulina de bovinos nos períodos de jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	49
Gráfico 7 -	Valores médios e desvios-padrão dos índices de excreção urinário (IEU) de uréia (mmol/L), alantoína (mmol/L) e de ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	52
Gráfico 8 -	Valores médios e desvios-padrão do pH e do tempo de redução do azul de metileno (minutos) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	54
Gráfico 9 -	Valores médios e desvios-padrão da matéria seca (MS) bacteriana indireta (absorbância) e do número de protozoários (unidades $\times 10^6/\text{mL}$) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001.....	55
Gráfico 10 -	Relação entre glicemia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	56
Gráfico 11 -	Relação entre a concentração plasmática de ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/L}$) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	56
Gráfico 12 -	Relação entre as concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (mmol/L) e ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/L}$) em bovinos no período de jejum. São Paulo, 2001.....	57
Gráfico 13 -	Relação entre a concentração sérica de uréia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	57

Gráfico 14	Relação entre o índice de excreção urinário de uréia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	58
Gráfico 15	Relação entre o índice de excreção urinário de uréia (mmol/L) e a concentração sérica de uréia do período de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001.....	58
Gráfico 16	Relação entre o déficit de volume plasmático de albumina (%) e o tempo de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001.....	59
Gráfico 17	Relação entre o pH do fluido ruminal e o tempo pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001.....	59
Gráfico 18	Relação entre o pH do fluido ruminal e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	60
Gráfico 19	Relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o tempo pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001.....	60
Gráfico 20	Relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o pH do fluido ruminal no período pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001.....	61
Gráfico 21	Relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o pH do fluido ruminal no período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	61
Gráfico 22	Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	62
Gráfico 23	Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta do período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	62
Gráfico 24	Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta do período pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001.....	63
Gráfico 25	Relação entre o pH do fluido ruminal e a matéria seca bacteriana indireta do período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	63
Gráfico 26	Relação entre o pH do fluido ruminal e a redução do azul de metileno do período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	64
Gráfico 27	Relação entre o número de protozoários e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001.....	64
Gráfico 28	Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta no período de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001.....	65
Gráfico 29	Relação entre a relação entre o índice de excreção urinário de alantoína e o tempo de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001.....	65
Gráfico 30	Relação entre a relação entre o índice de excreção urinário de alantoína e a matéria seca bacteriana indireta no período de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001.....	66

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Composição bromatológica do feno de coast-cross, do concentrado comercial e da dieta global oferecida aos bovinos durante o período experimental. São Paulo, 2001.....	31
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAL E MÉTODO	30
4.1	Animais e Alimentação	30
4.2	Instalações	31
4.3	Tratamentos e Delineamento Experimental	32
4.4	Coleta e processamento das amostras sanguíneas	32
4.4.1	Concentração plasmática de glicose.....	33
4.4.2	Concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGLs).....	34
4.4.3	Concentração plasmática de β -hidroxibutirato.....	34
4.4.4	Concentração sérica de colesterol.....	34
4.4.5	Concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST).....	35
4.4.6	Concentração sérica de uréia.....	35
4.4.7	Concentração sérica de creatinina.....	35
4.4.8	Concentração sérica de proteína total.....	35
4.4.9	Concentração sérica de albumina.....	35
4.4.10	Concentração sérica de globulina.....	36
4.4.11	Cálculo do Déficit Volume Plasmático.....	36
4.5	Coleta e processamento das amostras de urina	36
4.5.1	Concentração urinária de uréia.....	37
4.5.2	Concentração urinária de creatinina.....	37
4.5.3	Concentração urinária de alantoína.....	37
4.5.4	Concentração urinária de ácido úrico.....	37
4.5.5	Cálculo do índice de excreção urinária.....	38
4.5.6	Deteção da presença de corpos cetônicos na urina.....	38
4.6	Coleta e processamento das amostras de fluido ruminal	38
4.6.1	pH ruminal.....	39
4.6.2	Tempo de redução do azul de metileno.....	39
4.6.3	Matéria seca bacteriana.....	39

4.6.4	Contagem de protozoários.....	39
4.7	Análise Estatística.....	39
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Relação entre variáveis.....	56
6	DISCUSSÃO.....	67
6.1	Status energético: jejum contrastado com o período pós-prandial.....	67
6.2	Status energético: realimentação contrastada com o período de jejum.....	75
6.3	Variáveis ruminais e urinárias: jejum contrastado com período pós-prandial.....	78
6.4	Variáveis ruminais e urinárias: realimentação constrastada com o jejum e o período pós-prandial.....	83
7	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

A anorexia é um sintoma de origem complexa caracterizada pela completa ausência de apetite e evidenciada pela não ingestão de alimentos. O controle da ingestão é feito pelo hipotálamo, mais especificamente nos centros da fome e saciedade, com modulação de vários hormônios, de concentrações sanguíneas de vários metabólitos e do sistema nervoso autônomo (RADOSTITS et al., 2000). As causas da anorexia são as mais diversas, dentre elas citam-se as seguintes síndromes e estados: febre, dor, toxemia, intoxicações, traumas, inflamação, algumas carências, enfermidades nutricionais e metabólicas, doenças que provoquem a incapacidade da apreensão, ingestão ou deglutição de alimentos e outras circunstâncias específicas (RADOSTITS et al., 2000).

Num Hospital de Ruminantes é comum a internação de animais, que pelos vários motivos citados acima, apresentam hipofagia ou anorexia. Porém em muitos casos as enfermidades em questão não desencadeiam *per se* um quadro de anorexia, mas outras circunstâncias associadas a internação, tais como estresse de viagem, manejo intensivo, adaptação ao novo ambiente e alimentação etc podem também provocar alterações no apetite. Em ambas as situações os quadros de anorexia ou hiporexia poderão gerar modificações no perfil metabólico sanguíneo como ruminal, freqüentemente utilizados, em especial o primeiro, para corroborar no diagnóstico clínico veterinário nesses centros de atendimento.

Essas alterações no perfil metabólico sanguíneo, causadas pela anorexia, embora aconteçam na rotina são pouco ou nada consideradas pelo profissional que atua em Hospitais Veterinários, merecendo maiores estudos. Soma-se a estas circunstâncias o efeito da realimentação que na maioria dos casos acontece após um breve período de adaptação no

Hospital ou mesmo no decorrer do período de recuperação dos quadros clínicos dos animais atendidos.

Geralmente quando da internação de ruminantes é comum ser solicitado rotineiramente exames laboratoriais, tais como: determinações dos teores sangüíneos de proteína total, albumina, uréia e glicose. Contudo, muitos estudos indicam que para a melhor caracterização do perfil metabólico seria também necessário a inclusão de outras análises, tais como: β -hidroxibutirato (β OHB), ácidos graxos livres (AGLs) entre outros metabólitos (BIDE, 1978; GONZÁLEZ, 2000; INGRAHAM; KAPPEL, 1988; PAYNE; PAYNE, 1987; ROWLANDS, 1980). Provas de exame de fluido ruminal também têm sido sugeridas para indicar os efeitos da anorexia sobre o metabolismo ruminal (NAGADI et al., 2000; ROSEMBERGER, 1983).

A maneira mais simples e prática para estudar os efeitos da anorexia sobre o perfil metabólico sangüíneo e ruminal é por meio do jejum alimentar (BOND et al., 1976; GALYEAN et al., 1981; RULE et al., 1985). Embora as conseqüências do jejum no metabolismo animal tenham sido intensivamente estudadas ainda existem pontos obscuros a serem devidamente compreendidos. Para melhor entendimento de algumas implicações metabólicas do jejum nos bovinos e dos mecanismos que regem estes fenômenos este assunto será revisto no capítulo que se segue.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Embora o ruminante não utilize a glicose como combustível universal para todas as suas células, este substrato é de fundamental importância para a manutenção energética das células nervosas, da glândula mamária, da musculatura, dos tecidos fetais, e em menor grau nos eritrócitos (LENG, 1962). Enquanto que nos monogástricos, parte considerável da glicose é proveniente da absorção no intestino da glicose oriunda da digestão dos alimentos, nos ruminantes, este metabólito é oriundo da gliconeogênese, ou seja, sintetizado indiretamente a partir de diferentes compostos orgânicos. Esta adaptação metabólica é derivada da situação em que os substratos energéticos, em especial os que contêm glicose, são intensivamente fermentados no rúmen (BERGMAN, 1973).

Os principais produtos desta fermentação ruminal são os ácidos acético, propiônico e butírico. Eles são absorvidos e direcionados diretamente para o fígado, nos hepatócitos o ácido propiônico é convertido a oxaloacetato, que é metabolizado em p-enolpiruvato e entra na rota oposta da via glicolítica, tendo como seu produto final, a glicose. O ácido propiônico é sem dúvida o principal precursor de glicose, podendo em algumas condições ser responsável por até 65% do total deste composto energético (HERDT, 2000). Outros precursores importantes são alguns aminoácidos (aspartato, alanina, glutamina etc) que podem gerar até 30% da glicose neoformada (BERGMAN, 1973). O glicerol proveniente da lipólise e o lactato oriundo da fermentação anaeróbica ou de fonte digestiva, também podem gerar glicose, porém em menores proporções que as fontes citadas anteriormente. O glicerol assume papel importante na gliconeogênese, em situações de hipoglicemia, por exemplo durante o jejum, pois o animal passa a mobilizar gordura dos seus depósitos por meio da lipólise, gerando ao

final do processo, uma molécula de glicerol para cada de triacilglicerol (LOMAX; BAIRD, 1983).

Com foi exposto acima, durante o déficit energético temporário ou prolongado existe uma tendência para menor formação de glicose, o que pode acarretar a hipoglicemia (BOUCHAT et al., 1981). Um dos pontos mais obscuros na literatura é a quantificação dos teores plasmáticos de glicose em bovinos, considerados como valores de referência por compêndios clássicos incontestes (KANEKO et al., 1997; PAYNE; PAYNE, 1987; RADOSTITS et al., 2000). Estes dados de glicemia foram determinados em vacas leiteiras ou de corte em lactação ou em gestação, as quais apresentam teores bem inferiores aos de ruminantes jovens (ROWLANDS, 1980; OTTO et al., 1992; SOUZA et al., 1999; SUCUPIRA, 2003), em cerca de 20,6% menores em relação aos valores de Kaneko et al. (1997) e Radostits et al. (2000) e até 64% menores em relação aos valores de Payne e Payne (1987). Esta discrepância coloca em cheque o diagnóstico de hipoglicemia que pode ser feita em bovinos jovens, visto que em quadros leves, a redução dos teores de glicemia poderia se apresentar ainda dentro dos valores considerados normais para vacas, o que acarretaria uma falsa interpretação e a um erro diagnóstico. No trabalho de Sucupira (2003) foi observado que a subalimentação energética intensa e prolongada provocou marcante hipoglicemia no término do período experimental, porém os valores ainda se encontravam dentro do intervalo considerado normal pelos autores clássicos. Faltam maiores estudos para demonstrar qual é a magnitude da queda da glicose no decorrer do jejum temporário em bovinos jovens e a relação destes valores com os considerados de referência na literatura.

Os ruminantes têm a capacidade de se adaptarem a períodos de subnutrição, de médio ou longo prazo, pois reduzem as necessidades de manutenção por meio da diminuição da taxa de metabolismo basal, efeito este mediado pela menor concentração dos hormônios da tireóide (CHILLIARD et al., 1998; OETZEL, 1988).

Porém, quando a privação da ingestão de alimentos se dá subitamente, antes mesmo de ocorrer a diminuição no metabolismo basal, o organismo mobiliza, com presteza, substratos de suas reservas corporais para suprir o déficit energético recém-instalado (OETZEL, 1988). A primeira captação de substrato vem dos estoques de glicogênio hepático e em bem menor grau da musculatura estriada e cardíaca, contudo estas reservas são bastante diminutas nos ruminantes, se comparadas com os monogástricos (HERDT, 1988, 2000).

Após as primeiras horas de privação alimentar, o organismo passa a mobilizar energia por meio da proteólise, em especial das reservas corporais de proteínas dos músculos esqueléticos. O catabolismo protéico é iniciado e mantido por meio da diminuição da concentração plasmática de insulina e do aumento da secreção de glicocorticóide (OETZEL, 1988). Essas proteínas são inicialmente cindidas a aminoácidos e peptídeos que no fígado serão submetidos a gliconeogênese. Neste processo haverá geração de amônia a qual é desintoxicada no Ciclo da Uréia, tendo como produto final o catabólito homônimo. Assim, o teor de uréia sérica poderá estar aumentado durante o desencadeamento da proteólise (HERDT, 1988). Porém, mesmo que haja elevação da concentração sérica de uréia, nem sempre esta será proporcional à intensidade da proteólise, visto que grande parte deste metabólito é excretada pelos rins, pois esta substância tem um baixo limiar renal de excreção (ORTOLANI, 2003). A magnitude desta excreção de uréia urinária pode ser calculada pela determinação total de uréia eliminada em todo o volume urinário do período de privação, ou ainda pelo índice de excreção urinária de uréia que espelha de maneira fiel estas eliminações totais, independentes do volume ou alterações de osmolaridade da urina (BRITO, 1998). Até o momento não foram realizados estudos que avaliassem tal eliminação de uréia urinária e que pudessem ter um caráter diagnóstico e subsidiário neste processo de déficit energético provocado pelo jejum temporário.

Além da proteólise, é fundamental para a manutenção da homeostase energética, a lipólise dos depósitos de gordura, que representam a principal fonte de energia para um ruminante aparentemente hígido. A lipólise é estimulada quando as concentrações de insulina declinam em relação à concentração de glucagon, resultando na mobilização de ácidos graxos livres (AGLs) que são originados da gordura mobilizada. Estes ácidos vão para o fígado, e dependendo de alguns fatores, podem ser oxidados ou esterificados. Na primeira condição, desde que haja déficit energético, os AGLs serão transferidos para interior das mitocôndrias, por intermédio da enzima carnitina palmititransferase I, sendo oxidados para acetato e acetilCoA, o qual se combinando com oxaloacetato, entrando inicialmente no ciclo de Krebs, e posteriormente no caminho reverso da via glicolítica, formando glicose. Caso haja grande formação de AGLs, estes poderão formar grande quantidade de acetilCo A, produzindo teores muito superiores do que a oxaloacetato disponível, fazendo com que o primeiro composto seja transformado em corpos cetônicos (HERDT, 1988). Tal desvio de rota é comum nos casos de cetose bovina e na toxemia da prenhez dos pequenos ruminantes (FOSTER, 1988). Devido ao baixo limiar renal de corpos cetônicos, a presença deste compostos em grande quantidade no sangue, favorecem a franca eliminação destes compostos pela urina. Segundo Kaneko et al. (1997) e Radostits et al. (2000) é comum o achado de cetonúria em ruminantes submetidos a intenso déficit energético. Contudo, Sucupira (2003) submeteu garrotes a drástica subalimentação em energia, por tempo prolongado, e nunca detectou cetonúria. É possível que a afirmação categórica de Kaneko et al. (1997) e Radostits et al. (2000) seja obtida exclusivamente de vacas leiteiras em início de lactação ou final de gestação, pois este quadro é comum em animais destas categorias, principalmente pelo fato do estímulo à lipólise ser mais pronunciado e pela menor produção de oxaloacetato (HERDT, 1988, 2000; KREBS, 1966). Maiores estudos são necessários para verificar se garrotes submetidos à restrição alimentar temporária de alimentos provoca ou não a cetonúria.

Caso haja lipólise continuada, parte dos AGLs neoformados irá para o fígado, onde pode ser esterificado e transformado em lipoproteínas, que são formas de energia altamente disponível para a maioria das células dos ruminantes adultos. Os AGLs são substâncias tóxicas para as células e devem ser esterificados a triglicérides, que são bem menos tóxicos, e que são envoltas por uma camada de colesterol e fosfolípide, para ser distribuída aos tecidos. Contudo, se a quantidade de triglicerídeos formados for muito superior a de colesterol e fosfolípide, o excesso de triglicerídeos poderá se condensar e formar gotículas de gordura que acumular-se-ão no citosol dos hepatócitos gerando um quadro de lipidose ou esteatose hepática (HERDT 1988, 2000). Neste distúrbio há uma correlação negativa de colesterol e acúmulo de gordura hepática, assim como há aumento na atividade de aspartato aminotransferase (AST) no sangue (HERDT, 1988; RADOSTITS et al., 2000). Embora em vacas leiteiras este assunto tenha sido intensivamente estudado, faltam dados para afirmar se em garrotes normais submetidos a jejum temporário ocorre ou não o desenvolvimento de lipidose.

O jejum alimentar pode provocar, em garrotes, significativa diminuição na ingestão de água (BOND et al., 1976) o que de alguma forma poderia provocar o surgimento de hipovolemia, e caso fosse de grau intenso, poderia diminuir o fluxo sangüíneo renal e, conseqüentemente, diminuir a produção de urina e a excreção de muitos catabólitos. Embora esta constatação tenha sido feita por Bond et al. (1976), faltam evidências para afirmar que ruminantes submetidos à jejum alimentar podem apresentar um quadro de hipovolemia e em que grau de intensidade este fato se manifestaria.

Sem dúvida nenhuma, a menor ingestão ou interrupção súbita no consumo de alimentos interfere negativamente no perfil ruminal, em especial nas avaliações numérica e da atividade funcional da sua população microbiana. Embora estas variáveis sejam pouco ou quase nada empregadas na rotina clínica, para precisar o status nutricional dos animais, em

especial nas alterações desenvolvidas em curto prazo, como por exemplo, no jejum temporário decorrente de outras enfermidades concomitantes, acredita-se que é possível obter informações rápidas e bem indicativas que auxiliem o diagnóstico clínico.

A determinação do pH do fluido ruminal é uma das provas ruminais mais conhecidas e realizadas no exame do suco de rúmen (ORTOLANI, 1980). O pH do conteúdo ruminal varia principalmente em função do tipo e da quantidade de alimento ingerido, do tempo passado da ingestão, da quantidade de saliva secretada e da absorção dos ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen (MARUTA, 2000; RADOSTITS, 2000; ROSEMBERGER, 1983). De forma geral, quanto mais rica em carboidratos solúveis for o alimento, maior será a produção de ácidos, principalmente, nas primeiras horas após a sua ingestão; quanto maior for o consumo de fibra bruta na dieta, maior será a secreção salivar, que tem um pH bastante alcalino e a função de tamponar o pH ruminal (BARTLEY, 1976). Grande parte desta secreção salivar acontece durante o período de ruminação, em geral com maior frequência entre os intervalos de picos na ingestão de alimentos. Ocorre alguma produção e deglutição de saliva quando do consumo e da mastigação da dieta, e uma percentagem menor de secreção salivar contínua, quando o animal não está ruminando nem ingerindo os alimentos (ORTOLANI, 1980). Estudos anteriores demonstraram que o jejum provoca um sensível incremento no pH ruminal devido a menor fermentação ruminal, a continua absorção de ácidos anteriormente produzidos, assim como a secreção pequena, mas prolongada de saliva (BARTLEY 1976).

Outra forma de avaliação da normalidade da microbiota ruminal, é a contagem de seu número. Enquanto que a determinação da população de protozoários não implica no uso de técnicas complexas e de difícil execução, as de bactérias têm constituído uma grande barreira para o clínico, ou para o fisiologista, pois exigem equipamentos sofisticados, caros e de difícil manuseio (RADOSTITS, 2000; ROSEMBERGER, 1983). Contudo, ultimamente têm surgido

técnicas mais simples que substituem com várias vantagens as metodologias tradicionais. Entre elas, destaca-se a descrita por Nagadi et al. (2000) que verificaram alta correlação entre a matéria seca microbiana ou sua capacidade fermentativa “in vitro” e a determinação indireta da matéria seca microbiana, que é realizada por meio da diluição do conteúdo ruminal com solução própria e simples leitura em espectrofotômetro usual num comprimento de onda fixo (600 nm). Embora esses autores tenham testado este método para bovinos alimentados com diferentes dietas, os mesmos não o utilizaram para animais em jejum ou em outras condições anormais, merecendo um maior estudo.

Uma das poucas provas que tem sido utilizada eventualmente na rotina clínica é o teste de redução do azul de metileno, que tem como função avaliar a capacidade do grupo de bactérias conhecidas como redutoras em transformar o azul em metileno, tornando-o incolor (ROSEMBERGER 1983). A vantagem deste teste é que pode ser feito ao pé do animal, com rápida resposta, com certa precisão, a baixo custo e sem necessidade de equipamento mais complexo (RADOSTITS, 2000). Por incrível que pareça, ainda não foi empregado no acompanhamento de ruminantes em jejum, o que justifica um estudo mais detalhado.

Um outro método que estima de forma indireta a quantidade total de microorganismos ruminais que saíram do rúmen e que sofreram digestão intestinal, é o índice de excreção urinário das purinas, em especial o da alantoína e do ácido úrico (SUCUPIRA, 2003). Esta prova baseia-se no fato que os organismos ruminais digeridos liberam fragmentos de DNA e RNA, os quais são absorvidos pelo hospedeiro e catabolizados em alantoína e ácido úrico. O fato de apresentarem baixo limiar de excreção renal, a excreção destes metabólitos é facilitada. Visto que a maior dos derivados purínicos (cerca de 85 %) é proveniente da microbiota ruminal, a sua estimativa na urina é considerada um bom indicador da população microbiana presente no rúmen (CHEN, 1990; SUCUPIRA, 2003), porém praticamente não

foram realizados estudos que demonstrassem a sua excreção urinária em bovinos submetidos em jejum temporário.

3 OBJETIVOS

Estudar, em garrotes, as influências do período pós-prandial, do jejum não prolongado e da realimentação sobre o perfil metabólico sanguíneo, no concernente às modificações ligadas ao metabolismo energético, e das variáveis ruminais, relacionadas às alterações fermentativas e funcionais da flora e fauna.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais e Alimentação

Foram utilizados 12 bovinos mestiços, machos, hípidos, inteiros, com idade média de 18 meses e peso médio de 300 kg no início do experimento.

Dois meses antes do início do período experimental, os animais foram vermifugados e submetidos às cirurgias de descorna e colocação de cânula ruminal de látex. Após as cirurgias, os garrotes passaram por um período de adaptação às instalações e ao novo manejo alimentar. Durante tal período e no decorrer do período experimental os animais receberam água, sal mineralizado (Fosbovi 20[®] – Tortuga) à vontade e a quantidade de alimentos, calculada em relação à matéria seca dos alimentos, equivalente a 2,7 % do peso vivo individual, sendo 70% de feno de capim coast-cross e 30 % de ração concentrada comercial, simulando uma dieta de bovinos de corte em confinamento para a obtenção de um ganho de peso ao redor de 600 g/ dia. As constituições bromatológicas dos alimentos e da dieta global encontram-se no quadro 1. Com o intuito de simular o oferecimento de alimentos na forma de “ração total misturada”, cuidado especial era dispensado na mistura do concentrado com o feno. Além disso, a dieta foi dividida e oferecida, em quantidades iguais, duas vezes ao dia, nos seguintes horários (7:00 horas e 18:00 horas).

Composição*	Feno	Concentrado	Dieta Global
%MS (matéria seca)	87,2	84,3	86,3
% FB (fibra bruta)	31,2	6,4	23,7
% PB (proteína bruta)	7,1	17,6	10,3
% EE (extrato etéreo)	1,8	5,1	2,8
% MM (matéria mineral)	6,4	9,5	7,3
% ENN** (extrato não nitrogenado)	53,6	61,4	55,9
% NDT (total de nutrientes digestíveis)	54,3	74,9	60,5
% FDN (fibra solúvel em detergente neutro)	76,2	27,0	61,4
%FDA (fibra solúvel em detergente ácido)	38,1	12,4	30,4
EB *** (kcal/kg)	4224	4275	4240

* Determinações realizadas no Laboratório de Doenças Nutricionais (FMVZ-USP)

** Calculado pela diferença da MS, PB, MM, EE e FB.

***EB = energia bruta das dietas dos tratamentos utilizando-se a fórmula $EB = [(5,72 \times \%PB) + (9,5 \times \%EE) + (4,79 \times \%FB) + (4,03 \times \%ENN)] \times 10$, extraída do NRC (1984).

Quadro 1 - Composição bromatológica do feno de coast-cross, do concentrado comercial e da dieta global oferecida aos bovinos durante o período experimental. São Paulo, 2001

4.2 Instalações

Os animais foram mantidos em baias individuais amarrados por corda e cabresto, nas dependências do “Galpão de Experimentação Clínica de Ruminantes” do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Campus de São Paulo, onde havia a possibilidade de avaliar o consumo alimentar individual.

As pesagens dos animais foram feitas antes das cirurgias e no início do período experimental em balança Filizola[®], modelo 3106100, com capacidade de 1.500 kg e sensibilidade de 200 g.

4.3 Tratamentos e Delineamento Experimental

O experimento constou de três fases distintas e consecutivas, onde todos os animais foram submetidos, ao mesmo tempo, às condições dos tratamentos, num delineamento para resposta de fluxo continuado, segundo descrito por SAMPAIO (2002).

Na primeira fase denominada de “período pós-prandial”, as amostras de fluidos biológicos (sangue, urina e fluido ruminal) foram obtidas e avaliadas nas seguintes horas: zero (momentos antes do oferecimento do alimento), 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a e 11^a horas após a alimentação matinal.

A segunda fase, denominada de “período de jejum”, iniciou-se na manhã do dia seguinte ao período anterior, após a retirada de todo alimento presente no cocho, oferecido às 18:00 horas do dia anterior. O acesso livre à água foi mantido e o sal mineralizado não foi ofertado neste período. Os animais permaneceram em jejum alimentar por 48 horas e as amostras de fluidos biológicos foram obtidas e avaliadas nas seguintes horas: zero (momentos antes da retirada do alimento), 12^a, 24^a, 36^a e 48^a horas após a retirada do alimento.

A terceira fase, denominada de “período de realimentação”, iniciou-se ao término das 48 horas de jejum, com o oferecimento da mesma dieta, em quantidade e esquema, do primeiro período. Os animais foram acompanhados por 48 horas e as amostras de fluidos biológicos foram obtidas e avaliadas nas seguintes horas: zero (mesma amostra da 48^a hora do jejum), 6^a, 12^a, 24^a e 48^a horas após o oferecimento do alimento.

4.4 Coleta e processamento das amostras sanguíneas

As amostras de sangue foram obtidas por meio de venipunctura da jugular externa, utilizando-se tubos de coleta à vácuo. Para as determinações plasmáticas de glicose, ácidos

graxos livres (AGL) e β -hidroxibutirato (β -OHB), o sangue foi coletado em tubos vacutainer[®] com anticoagulante de fluoreto; enquanto que para as determinações séricas de ácido úrico, colesterol, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), albumina e proteínas totais, o sangue foi coletado em tubos vacutainer[®] sem anticoagulante.

Os tubos contendo sangue sem anticoagulante foram mantidos à temperatura ambiente e, aproximadamente após três horas da coleta, foram centrifugados por dez minutos a 250 G para a obtenção do soro. Logo após, este material foi transferido para tubos plásticos, tipo KMA, e armazenado em freezer à -20°C até que fossem realizadas as análises bioquímicas.

Os tubos contendo sangue com anticoagulante foram prontamente resfriados e, aproximadamente após três horas da coleta, foram centrifugadas por cinco minutos a 250 G, para a obtenção de plasma. Logo após, este material foi transferido para tubos plásticos, tipo KMA, e armazenado em freezer à -20°C até que fossem realizadas as análises bioquímicas.

As determinações bioquímicas sangüíneas de glicose, ácidos graxos livres, β -hidroxibutirato, colesterol, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase, proteína total e albumina foram feitas utilizando-se o analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS[®].

4.4.1 Concentração plasmática de glicose

A concentração plasmática de glicose foi determinada utilizando-se *kit* comercial SIGMA[®] kit nº 315-100, seguindo a técnica enzimática descrita por TRINDER (1969).

4.4.2 Concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGLs)

A concentração plasmática de AGLs foi determinada utilizando-se *kit* comercial Wako® Fine Chemical Industries USA, nº 994-75409 D, segundo o método enzimático desenvolvido pela Wako. Neste método, o AGL na presença de adenosina trifosfato (ATP), magnésio e coenzima (CoA), sofre ação da acyl-CoA sintetase (ACS) formando acil-CoA. Este composto é oxidado pela acil-CoA oxidase (ACOD) formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase (POD) permite a condensação oxidativa do 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina (MEHA) com 4-aminoantipirina formando uma coloração púrpura medida colorimetricamente à 550 nm.

4.4.3 Concentração plasmática de β - hidroxibutirato

A concentração plasmática de β - hidroxibutirato foi determinada utilizando-se o *kit* comercial SIGMA® nº 310-A, seguindo a técnica enzimática descrita por Williamson, Mellanby e Krebs (1962).

4.4.4 Concentração sérica de colesterol

A concentração sérica de colesterol foi determinada utilizando-se o *kit* comercial BIOSYSTEMS® código 11805, seguindo a técnica enzimática descrita por ALLAIN et al (1974).

4.4.5 Concentração sérica da aspartato aminotransferase (AST)

A concentração sérica de aspartato aminotransferase foi determinada utilizando-se o *kit* comercial BIOSYSTEMS[®] código 11830, seguindo a técnica enzimática descrita por GELLA et al (1985).

4.4.6 Concentração sérica de uréia

A concentração sérica de uréia foi determinada utilizando-se *kit* comercial BAYER[®] n° T-01 1821-56, seguindo a técnica descrita por TALKE e SCHUBERT (1965).

4.4.7 Concentração sérica de creatinina

A concentração sérica de creatinina foi determinada utilizando-se o *kit* comercial SIGMA[®] n° 555, seguindo a técnica cinética descrita por LUTSGARTEN e WENK (1972).

4.4.8 Concentração sérica de proteína total

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto e processada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS[®].

4.4.9 Concentração sérica de albumina

A concentração sérica de albumina foi determinada pelo método do verde bromocresol e processada no analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS[®].

4.4.10 Concentração sérica de globulina

A concentração sérica de globulina foi determinada pela diferença entre as concentrações de proteína total e albumina.

4.5 Coleta e processamento das amostras de urina

As amostras de urina foram coletadas dos animais, por meio de massagem prepucial que objetivou a indução da micção, utilizando-se frascos plásticos de boca larga com tampa (coletor universal). Logo após às coletas, as amostras foram prontamente resfriadas e no laboratório, a primeira ação foi a realização da Prova de Rothera. Posteriormente, as amostras de urina foram centrifugadas por cinco minutos 500 G em centrífuga refrigerada JOUAN/MR22[®]. Logo após, este material foi transferido para tubos plásticos, tipo KMA, e armazenado em freezer à -20°C , até que fossem realizadas as análises bioquímicas.

As determinações bioquímicas urinárias de uréia, creatinina e ácido úrico foram feitas utilizando-se o analisador bioquímico automático Liasys, marca AMS[®].

4.5.1 Concentração urinária de uréia

A concentração urinária de uréia foi determinada utilizando-se *kit* comercial BAYER[®] nº T-01 1821-56, seguindo a técnica descrita por Talke e Schubert (1965).

4.5.2 Concentração urinária de creatinina

A concentração urinária de creatinina foi determinada utilizando-se o *kit* comercial da marca Sigma® nº 555, seguindo o método cinético descrito por Lutsgarten e Wenk (1972). Tal determinação foi realizada com o intuito de possibilitar a correção das excreções urinárias de alantoína, ácido úrico e uréia.

4.5.3 Concentração urinária de alantoína

A concentração urinária de alantoína foi determinada utilizando-se o método colorimétrico descrito por Borchers (1977). As leituras foram feitas em Espectrofotômetro Digital B342II, Micronal®.

4.5.4 Concentração urinária de ácido úrico

A concentração urinária de ácido úrico foi determinada utilizando-se *kit* comercial BioSystems® nº 11821, seguindo a técnica descrita por Fossati, Prencipe e Berti (1980).

4.5.5 Cálculo do índice de excreção urinária

As concentrações urinárias (uréia, alantoína e ácido úrico) foram corrigidas pela concentração de creatinina urinária e pelo peso metabólico (Peso Vivo^{0,75}) dos animais, segundo descrito por Brito (1998), utilizando-se a seguinte fórmula:

$\frac{\text{Concentração do metabólito em questão (mmol/L)} \times \text{Peso Vivo}^{0,75}}{\text{Concentração de creatinina urinária (mmol/L)}}$
--

4.5.6 Detecção da presença de corpos cetônicos na urina

Os corpos cetônicos urinários foram determinados utilizando-se o kit diagnóstico Ketocheck (Great States Animal Health) na Prova de Rothera. Esta prova é baseada na intensidade da coloração púrpura formada pela reação da acetona do leite ou urina com o nitropussiato em meio alcalino (no caso, o carbonato de sódio). Quanto maior for a concentração de corpos cetônicos (especialmente acetoacetato e acetona) maior evidenciação da coloração púrpura.

4.6 Coleta e processamento das amostras de fluido ruminal

O fluido ruminal foi coletado diretamente da cânula ruminal em frascos plásticos de boca larga com tampa (coletor universal). Imediatamente após a coleta, foi mensurado o pH do fluido e realizado a prova de redução do azul de metileno. Para a contagem de protozoários, foi adicionado dez mililitros de solução de formol a 50%, em dez mililitros de fluido ruminal, esta amostra permaneceu em temperatura ambiente até a análise.

O restante do fluido ruminal foi prontamente resfriado e no laboratório foi feita a determinação da matéria seca bacteriana.

4.6.1 pH ruminal

A determinação do pH do fluido ruminal foi feita utilizando-se potenciômetro digital de mesa marca Celm[®], previamente calibrado, modelo PH-10, com sensibilidade de 0,01 grau, acoplado em eletrodo íon específico, marca Sensotec[®], modelo 2.13.

4.6.2 Tempo de redução do azul de metileno

O tempo de redução do azul de metileno foi determinado utilizando-se solução de azul de metileno à 0,01%, seguindo a técnica descrita por Wenzel (1977). Todos os tempos obtidos foram transformados em minutos, por exemplo: 4 minutos e 30 segundos foi expresso em 4.5 minutos.

4.6.3 Matéria seca bacteriana

A determinação de matéria seca (MS) bacteriana foi feita de maneira indireta mensurando a absorbância à 600 nm, seguindo a técnica descrita por Nagadi et al. (2000).

4.6.4 Contagem de protozoários

A contagem de protozoários foi feita segundo técnica descrita por Ortolani e Takimoto (1987).

4.7 Análise Estatística

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Kolgomorov & Smirnov para verificar se os dados apresentavam distribuição paramétrica. Quando a distribuição dos dados foi não-paramétrica, as variáveis foram analisadas pelo Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Tanto para a avaliação da influência do dia da coleta (intragrupo), como do tratamento proposto (intergrupos), os dados foram submetidos inicialmente ao Teste F (ANOVA) e

quando significativo, as médias foram comparadas entre si pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Para o estudo de relação entre duas variáveis foi utilizada tanto a análise de regressão linear como o coeficiente de correlação. A significância obtida na regressão linear foi avaliada através de Teste F. Foram consideradas diferenças significativas quando p for inferior a 0,05 (LITTLE; HILLS, 1978; SAMPAIO, 1998). De acordo com os referidos autores, uma correlação foi considerada alta quando $r > 0,6$; média quando os valores de r estavam entre 0,3 e 0,6; e baixa quando $r < 0,3$.

5 RESULTADOS

A glicemia não se alterou no decorrer do primeiro período experimental, denominado de pós-prandial ($p > 0,05$); contudo menores valores foram encontrados nas 36^a e 48^a horas em relação aos tempos iniciais do período de jejum ($p < 0,001$); no período da realimentação, o momento inicial foi significativamente ($p < 0,001$) menor que todos os momentos subseqüentes; em relação à 6^a h, a significância foi de ($p < 0,05$); as concentrações das 6^a e 48^a horas foram ($p < 0,01$) inferiores à 12^a hora (Tabela 1 e Gráfico 1).

Não ocorreu diferença entre os teores de AGL durante o período pós-prandial, mas estes aumentaram continuamente no desenvolver do jejum ($p < 0,001$); ocorrendo o inverso com o passar do tempo na realimentação ($p < 0,05$), com exceção da igualdade de valores da 24^a h em relação aos momentos 12 e 48 horas (Tabela 1 e Gráfico 1).

Durante o período pós-prandial, as concentrações de β -hidroxibutirato foram menores no momento zero em relação aos demais tempos ($p < 0,05$), com exceção da 1^a h que apresentou valores iguais. No período do jejum, os teores de β -hidroxibutirato na 12^a h foram menores que nas demais horas ($p < 0,001$), com exceção da 24^a h que foi semelhante; a 48^a h obteve maiores concentrações que a 24^a h ($p < 0,01$). No período da realimentação, os momentos zero e 6^a h apresentaram maiores concentrações ($p < 0,001$) de β -hidroxibutirato que os momentos subseqüentes (Tabela 1 e Gráfico 2).

Não ocorreram diferenças nas concentrações de creatinina sérica durante o período pós-prandial e do jejum, porém menores ($p < 0,05$) teores foram encontrados nos momentos zero e 48^a h em relação à 6^a e 12^a horas, do período de realimentação (Tabela 2 e Gráfico 3). No cômputo geral, maiores ($p < 0,05$) teores de creatinina sérica foram verificados na realimentação que no período pós-prandial (Tabela 3).

Tabela 1 – Valores médios e desvios-padrão das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L), ácidos graxos livres (μmol/L) e β-hidroxibutirato (mmol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

TEMPOS		Glicose (mmol/L)	Ácidos Graxos Livres (μmol/L)	β-Hidroxibutirato (mmol/L)
PÓS-PRANDIAL	0 Hora	4,1 ± 0,7 ^a	124 ± 50 ^a	0,45 ± 0,09 ^b
	1 Hora	3,9 ± 0,4 ^a	122 ± 44 ^a	0,49 ± 0,09 ^{ab}
	3 Horas	4,0 ± 0,5 ^a	120 ± 40 ^a	0,54 ± 0,09 ^a
	5 Horas	4,1 ± 0,5 ^a	108 ± 33 ^a	0,56 ± 0,12 ^a
	7 Horas	4,2 ± 0,5 ^a	111 ± 40 ^a	0,57 ± 0,10 ^a
	9 Horas	4,2 ± 0,5 ^a	114 ± 31 ^a	0,54 ± 0,09 ^a
	11 Horas	4,3 ± 0,5 ^a	109 ± 49 ^a	0,55 ± 0,07 ^a
JEJUM	0 Hora	4,5 ± 0,8 ^a	124 ± 59 ^e	0,54 ± 0,03 ^{ab}
	12 Horas	4,4 ± 0,7 ^a	317 ± 135 ^d	0,39 ± 0,06 ^c
	24 Horas	4,3 ± 0,7 ^a	622 ± 126 ^c	0,46 ± 0,08 ^{bc}
	36 Horas	3,8 ± 0,6 ^b	821 ± 113 ^b	0,51 ± 0,10 ^{ab}
	48 Horas	3,5 ± 0,3 ^b	1115 ± 272 ^a	0,57 ± 0,19 ^a
REALIMENTAÇÃO	0 Hora	3,5 ± 0,3 ^c	1115 ± 272 ^a	0,57 ± 0,19 ^a
	6 Horas	4,0 ± 0,3 ^b	509 ± 141 ^b	0,52 ± 0,13 ^a
	12 Horas	4,8 ± 0,4 ^a	245 ± 121 ^c	0,39 ± 0,13 ^b
	24 Horas	4,5 ± 0,3 ^{ab}	141 ± 48 ^{cd}	0,35 ± 0,10 ^b
	48 Horas	4,3 ± 0,2 ^b	91 ± 38 ^d	0,33 ± 0,07 ^b

Gráfico 1 - Valores médios e desvios-padrão das concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L) e ácidos graxos livres (μmol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

Gráfico 2 - Valores médios e desvios-padrão das concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (mmol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

Menores teores de uréia sérica foram detectados no momento zero em relação à 3^a, 5^a, 7^a e 9^a horas ($p < 0,001$) durante o período pós-prandial. No período de jejum, maiores concentrações de uréia sérica foram determinadas nos momentos 24, 36 e 48 horas que nos tempos zero e 12 horas ($p < 0,01$). Na realimentação, maiores valores de uréia foram apurados na 6^a h ($p < 0,05$), seguida da 12^a h ($p < 0,05$), a qual foi superior ao momento zero ($p < 0,01$), que finalmente foi maior ($p < 0,001$) que os momentos 24 e 48 horas (Tabela 2 e Gráfico 3). Não existiram diferenças significativas entre as medianas globais dos períodos (Tabela 3).

Não ocorreram diferenças significativas no período pós-prandial e durante o jejum nos teores de colesterol, porém na realimentação, o momento zero foi ($p < 0,05$) superior à 48^a h (Tabela 2 e Gráfico 4). A mediana global dos dados indica maiores ($p < 0,01$) concentrações de colesterol durante o jejum que no período pós-prandial (Tabela 3).

Não foram evidenciadas diferenças na concentração de AST durante todos os períodos (Tabela 2 e Gráfico 4), porém a mediana global foi menor ($p < 0,05$) no período pós-prandial (Tabela 3).

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$), uréia (mmol/L), colesterol (mmol/L) e AST - aspartato aminotransferase - (U/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

TEMPOS		Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)	Uréia (mmol/L)	Colesterol (mmol/L)	AST (U/L)
PÓS-PRANDIAL	0 Hora	159 $\pm$ 21 ^a	3,74 $\pm$ 1,80 ^b	4,11 $\pm$ 0,92 ^a	30,6 $\pm$ 2,9 ^a
	1 Hora	159 $\pm$ 17 ^a	4,39 $\pm$ 1,76 ^{ab}	3,98 $\pm$ 0,75 ^a	31,5 $\pm$ 3,0 ^a
	3 Horas	162 $\pm$ 19 ^a	5,49 $\pm$ 1,92 ^a	4,00 $\pm$ 0,79 ^a	31,9 $\pm$ 3,5 ^a
	5 Horas	163 $\pm$ 22 ^a	6,00 $\pm$ 2,00 ^a	3,86 $\pm$ 0,68 ^a	31,5 $\pm$ 3,2 ^a
	7 Horas	162 $\pm$ 22 ^a	5,79 $\pm$ 1,99 ^a	3,85 $\pm$ 0,62 ^a	32,2 $\pm$ 4,2 ^a
	9 Horas	162 $\pm$ 20 ^a	5,41 $\pm$ 2,06 ^a	3,95 $\pm$ 0,70 ^a	31,6 $\pm$ 4,9 ^a
	11 Horas	161 $\pm$ 18 ^a	4,86 $\pm$ 2,05 ^{ab}	3,92 $\pm$ 0,72 ^a	35,1 $\pm$ 7,0 ^a
JEJUM	0 Hora	162 $\pm$ 17 ^a	3,35 $\pm$ 1,73 ^b	4,03 $\pm$ 0,76 ^a	35,4 $\pm$ 6,8 ^a
	12 Horas	160 $\pm$ 19 ^a	4,04 $\pm$ 1,34 ^b	4,11 $\pm$ 0,91 ^a	36,6 $\pm$ 6,5 ^a
	24 Horas	167 $\pm$ 24 ^a	5,48 $\pm$ 1,20 ^a	4,24 $\pm$ 0,85 ^a	35,8 $\pm$ 6,5 ^a
	36 Horas	168 $\pm$ 30 ^a	5,49 $\pm$ 1,23 ^a	4,20 $\pm$ 0,68 ^a	35,0 $\pm$ 5,2 ^a
	48 Horas	169 $\pm$ 33 ^a	5,59 $\pm$ 1,46 ^a	4,34 $\pm$ 0,77 ^a	34,5 $\pm$ 4,0 ^a
REALIMENTAÇÃO	0 Hora	169 $\pm$ 33 ^b	5,59 $\pm$ 1,46 ^c	4,34 $\pm$ 0,77 ^a	34,5 $\pm$ 4,0 ^a
	6 Horas	185 $\pm$ 38 ^a	8,30 $\pm$ 1,51 ^a	4,18 $\pm$ 0,64 ^{ab}	35,2 $\pm$ 4,7 ^a
	12 Horas	185 $\pm$ 37 ^a	6,97 $\pm$ 1,68 ^b	3,92 $\pm$ 0,64 ^{ab}	33,8 $\pm$ 4,8 ^a
	24 Horas	179 $\pm$ 36 ^{ab}	3,81 $\pm$ 1,84 ^d	3,93 $\pm$ 0,76 ^{ab}	33,7 $\pm$ 4,6 ^a
	48 Horas	165 $\pm$ 25 ^b	3,31 $\pm$ 1,46 ^d	3,85 $\pm$ 0,68 ^b	33,4 $\pm$ 5,9 ^a

Tabela 3 – Valores de mediana das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$), uréia (mmol/L), colesterol (mmol/L) e AST - aspartato aminotransferase - (U/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

PERÍODOS	Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)	Uréia (mmol/L)	Colesterol (mmol/L)	AST (U/L)
Pós-Prandial	160 ^b	4,81 ^a	3,7 ^b	31,8 ^b
Jejum	166 ^{ab}	5,15 ^a	4,0 ^a	35,4 ^a
Realimentação	177 ^a	5,98 ^a	3,9 ^{ab}	33,9 ^a
Nível de Significância	p < 0,05	p > 0,52	p < 0,01	p < 0,05

Gráfico 3 - Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de creatinina ($\mu\text{mol/L}$) e uréia (mmol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

Gráfico 4 - Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de colesterol (mmol/L) e AST - aspartato aminotransferase - (U/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

Não existiram diferenças significativas nos teores de proteína sérica no período pós-prandial, porém maiores valores foram detectados na 48^a h em relação a zero hora ($p < 0,001$) durante o jejum; no período de realimentação, maiores concentrações ($p < 0,01$) de proteína sérica foram determinadas no momento zero que na 12^a, 24^a e 48^a horas seguintes (Tabela 4 e

Gráfico 5). A mediana global da proteína sérica foi maior ($p < 0,01$) no jejum que nos dois outros períodos (Tabela 5).

Não existiram diferenças nas concentrações de albumina no decorrer do período pós-prandial, porém maiores teores foram detectados na 48^a h do jejum que no momento zero e 12^a horas ($p < 0,01$); o mesmo fato ocorreu na realimentação, com maiores ($p < 0,05$) valores encontrados nos momentos zero e 6^a horas que nos tempos 12 e 48 horas (Tabela 4 e Gráfico 5). Maiores medianas globais ($p < 0,01$) foram determinadas nos períodos do jejum e da realimentação que na etapa pós-prandial (Tabela 5).

Tabela 4 – Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de proteína total (g/L), albumina (g/L) e globulina (g/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

TEMPOS		Proteína Total (g/L)	Albumina (g/L)	Globulina (g/L)
PÓS-PRANDIAL	0 Hora	68,0 ± 6,3 ^a	31,5 ± 1,7 ^a	36,5 ± 6,0 ^a
	1 Hora	68,6 ± 5,2 ^a	31,7 ± 1,3 ^a	37,0 ± 5,1 ^a
	3 Horas	68,1 ± 6,2 ^a	31,4 ± 1,7 ^a	36,7 ± 5,7 ^a
	5 Horas	67,3 ± 5,1 ^a	31,1 ± 1,4 ^a	36,1 ± 5,0 ^a
	7 Horas	67,9 ± 6,2 ^a	31,2 ± 1,4 ^a	36,8 ± 6,1 ^a
	9 Horas	69,2 ± 5,3 ^a	31,4 ± 1,5 ^a	37,8 ± 5,1 ^a
	11 Horas	67,2 ± 5,0 ^a	31,4 ± 1,4 ^a	35,8 ± 4,8 ^a
JEJUM	0 Hora	69,2 ± 5,1 ^b	31,5 ± 1,2 ^b	37,7 ± 4,8 ^b
	12 Horas	71,5 ± 4,9 ^{ab}	31,8 ± 1,7 ^b	39,6 ± 4,7 ^{ab}
	24 Horas	71,6 ± 6,5 ^{ab}	32,2 ± 1,7 ^{ab}	39,4 ± 6,1 ^{ab}
	36 Horas	70,9 ± 4,7 ^{ab}	32,5 ± 1,2 ^{ab}	38,3 ± 4,8 ^{ab}
	48 Horas	75,2 ± 5,8 ^a	33,4 ± 1,7 ^a	41,8 ± 5,5 ^a
REALIMENTAÇÃO	0 Hora	75,2 ± 5,8 ^a	33,4 ± 1,7 ^a	41,8 ± 5,5 ^a
	6 Horas	71,5 ± 4,5 ^{ab}	33,2 ± 1,2 ^a	38,3 ± 4,5 ^{ab}
	12 Horas	68,4 ± 5,3 ^b	31,9 ± 1,3 ^b	36,5 ± 5,2 ^b
	24 Horas	69,4 ± 2,6 ^b	32,3 ± 1,1 ^{ab}	37,1 ± 2,9 ^b
	48 Horas	67,3 ± 6,2 ^b	31,6 ± 2,2 ^b	35,6 ± 4,6 ^b

Tabela 5 – Valores de mediana das concentrações séricas de proteína total (g/L) e de globulina (g/L), e de média e desvio padrão da concentração sérica de albumina (g/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

PERÍODOS	Proteína Total (g/L)	Albumina (g/L)	Globulina (g/L)
Pós-Prandial	68,9 ^b	31,4 ± 1,4 ^b	38,1 ^b
Jejum	73,0 ^a	32,5 ± 1,7 ^a	40,2 ^a
Realimentação	70,0 ^b	32,2 ± 1,6 ^a	36,7 ^b
Nível de Significância	p < 0,01	p < 0,01	P < 0,01

Não ocorreram diferenças significativas nos teores de globulina sérica no período pós-prandial; porém maiores concentrações de globulinas foram verificadas na 48^a h que na zero hora ($p < 0,05$). Na realimentação, o momento zero apresentou maiores ($p < 0,01$) teores que nas 12^a, 24^a e 48^a horas na realimentação (Tabela 4 e Gráfico 5). No jejum foi encontrada maior mediana global ($p < 0,01$) que nos períodos pós-prandial e realimentação (Tabela 5).

Gráfico 5 – Valores médios e desvios-padrão das concentrações séricas de proteína total (g/L), albumina (g/L) e globulina (g/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

Não houve diferença no déficit de volume plasmático de proteína total durante o período de jejum, porém no período da realimentação, maiores déficits foram evidenciados no momento zero em relação aos tempos subsequentes ($p < 0,01$); e na 6^a h foi maior ($p < 0,05$) que na 48^a h (Tabela 6 e Gráfico 6). A mediana global do período de jejum apresentou maior déficit ($p < 0,0005$) que a do período da realimentação (Tabela 7).

O déficit de volume plasmático de albumina, no período de jejum, foi maior na 48^a h em relação ao momento zero ($p < 0,001$); na realimentação, o tempo zero apresentou maior déficit de volume plasmático de albumina que os momentos 12 e 48 horas ($p < 0,01$), enquanto que a 6^a h foi maior ($p < 0,01$) que a 48^a h (Tabela 6 e Gráfico 6). Não houve ($p > 0,45$) diferença entre as medianas globais dos dois períodos estudados (Tabela 7).

Tabela 6 – Valores médios e desvios-padrão do déficit de volume plasmático de proteína total, albumina e globulina de bovinos nos períodos de jejum e realimentação. São Paulo, 2001

TEMPOS		Déficit de Volume Plasmático de Proteína Total (%)	Déficit de Volume Plasmático de Albumina (%)	Déficit de Volume Plasmático de Globulina (%)
JEJUM	12 Horas	-4,7 ± 4,6 ^a	-1,4 ± 2,0 ^a	-7,3 ± 8,3 ^a
	24 Horas	-4,8 ± 5,0 ^a	-2,5 ± 2,8 ^{ab}	-6,4 ± 8,1 ^a
	36 Horas	-3,9 ± 4,7 ^a	-3,5 ± 2,8 ^{ab}	-4,3 ± 7,5 ^a
	48 Horas	-9,3 ± 6,7 ^a	-6,1 ± 4,2 ^b	-11,8 ± 9,1 ^a
REALIMENTAÇÃO	0 Hora	-9,3 ± 6,7 ^c	-6,1 ± 4,2 ^c	-11,8 ± 9,1 ^b
	6 Horas	-4,6 ± 7,1 ^b	-5,4 ± 4,2 ^{bc}	-4,0 ± 10,2 ^{ab}
	12 Horas	-0,3 ± 6,3 ^{ab}	-1,6 ± 2,4 ^{ab}	1,1 ± 10,2 ^a
	24 Horas	-1,9 ± 7,4 ^{ab}	-2,9 ± 2,2 ^{abc}	-1,0 ± 12,9 ^a
	48 Horas	1,4 ± 4,7 ^a	-0,6 ± 5,1 ^a	3,11 ± 7,4 ^a

Tabela 7 – Valores de mediana do déficit de volume plasmático de proteína total, albumina e globulina de bovinos nos períodos de jejum e realimentação. São Paulo, 2001

PERÍODOS	Déficit de Volume Plasmático de Proteína Total (%)	Déficit de Volume Plasmático de Albumina (%)	Déficit de Volume Plasmático de Globulina (%)
Jejum	-4,5 ^b	-3,0 ^a	-4,3 ^b
Realimentação	0,1 ^a	-2,7 ^a	2,2 ^a
Nível de Significância	p < 0,0005	p > 0,45	p < 0,0001

No período de jejum, não houve diferença do déficit de volume plasmático de globulina; porém no período de realimentação, maior déficit ($p < 0,01$) foi evidenciado no tempo zero em relação às 12^a, 24^a e 48^a horas (Tabela 6 e Gráfico 6). A mediana global do período de jejum apresentou maior ($p < 0,0001$) déficit que a do período de realimentação (Tabela 7).

Gráfico 6 – Valores médios e desvios-padrão do déficit de volume plasmático (DVP) de proteína total, albumina e globulina de bovinos nos períodos de jejum e realimentação. São Paulo, 2001

Maior índice de excreção urinária de uréia foi determinado na 5^a h que na 1^a h do período pré-prandial ($p < 0,05$); no jejum existiu um menor índice no momento zero comparado com a 24^a, 36^a, e 48^a horas ($p < 0,05$); na realimentação maiores ($p < 0,05$) índices foram obtidos na 6^a e 12^a horas que na 24^a e 48^a horas (Tabela 8 e Gráfico 7). Não existiram diferenças entre as medianas globais ($p > 0,68$) dos diferentes períodos (Tabela 9).

Tabela 8 – Valores médios e desvios-padrão dos índices de excreção urinário de uréia (mmol/L), alantoína (mmol/L) e ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

TEMPOS		Uréia (mmol/L)	Alantoína (mmol/L)	Ácido Úrico ($\mu\text{mol/L}$)
PÓS-PRANDIAL	0 Hora	1625 $\pm$ 893 ^{ab}	98,5 $\pm$ 31,4 ^a	11392 $\pm$ 3842 ^a
	1 Hora	1485 $\pm$ 852 ^b	122,7 $\pm$ 22,7 ^a	7969 $\pm$ 3183 ^a
	3 Horas	1903 $\pm$ 785 ^{ab}	119,5 $\pm$ 22,8 ^a	7061 $\pm$ 3854 ^a
	5 Horas	2300 $\pm$ 1184 ^a	116,6 $\pm$ 29,1 ^a	7699 $\pm$ 3078 ^a
	7 Horas	2279 $\pm$ 1032 ^{ab}	120,9 $\pm$ 20,1 ^a	8099 $\pm$ 3426 ^a
	9 Horas	1995 $\pm$ 882 ^{ab}	116,8 $\pm$ 19,6 ^a	8535 $\pm$ 4677 ^a
	11 Horas	1768 $\pm$ 841 ^{ab}	118,8 $\pm$ 32,5 ^a	7366 $\pm$ 3910 ^a
JEJUM	0 Hora	1009 $\pm$ 371 ^b	125,1 $\pm$ 46,5 ^a	9107 $\pm$ 6960 ^a
	12 Horas	1382 $\pm$ 442 ^{ab}	88,2 $\pm$ 33,6 ^b	10488 $\pm$ 7545 ^a
	24 Horas	1872 $\pm$ 358 ^a	82,9 $\pm$ 17,7 ^b	7219 $\pm$ 4651 ^a
	36 Horas	1921 $\pm$ 436 ^a	62,0 $\pm$ 23,0 ^b	7957 $\pm$ 8858 ^a
	48 Horas	2050 $\pm$ 461 ^a	71,0 $\pm$ 19,0 ^b	8135 $\pm$ 5169 ^a
REALIMENTAÇÃO	0 Hora	2050 $\pm$ 461 ^{ab}	71,0 $\pm$ 19,0 ^c	8135 $\pm$ 5169 ^a
	6 Horas	2188 $\pm$ 310 ^a	81,7 $\pm$ 18,4 ^b	3919 $\pm$ 2603 ^a
	12 Horas	2164 $\pm$ 377 ^a	73,8 $\pm$ 10,8 ^c	4809 $\pm$ 3622 ^a
	24 Horas	1243 $\pm$ 569 ^{bc}	107,1 $\pm$ 24,9 ^{ab}	7371 $\pm$ 5237 ^a
	48 Horas	1189 $\pm$ 516 ^c	127,1 $\pm$ 24,9 ^a	10834 $\pm$ 8207 ^a

Tabela 9 – Valores de mediana dos índices de excreção urinário de uréia (mmol/L), alantoína (mmol/L) e ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

PERÍODOS	Uréia (mmol/L)	Alantoína (mmol/L)	Ácido Úrico ($\mu\text{mol/L}$)
Pós-Prandial	1581 ^a	116,3 $\pm$ 26,1 ^a	8598 ^a
Jejum	1779 ^a	76,0 $\pm$ 25.5 ^c	6856 ^a
Realimentação	1844 ^a	97,4 $\pm$ 29.2 ^b	4645 ^a
Nível de Significância	p > 0,68	p < 0,001	p > 0,13

O índice de excreção urinária de alantoína não apresentou diferença significativa no decorrer do período pré-prandial, porém maior valor foi encontrado no momento zero em relação aos tempos posteriores do período do jejum ($p < 0,01$); na realimentação, a média foi maior na 48^a h ($p < 0,01$) que nos momentos zero, 6 e 12 horas; nas 24^a e 6^a horas foram observados maiores ($p < 0,05$) índices que na 0 e 12 horas (Tabela 8 e Gráfico 7). A mediana global do período pós-prandial foi superior a da realimentação, que por sinal foi ($p < 0,001$) maior que a do jejum (Tabela 9).

Nem entre os vários tempos dentro dos períodos, nem entre as medianas globais, existiram diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de índice de excreção urinária de ácido úrico (Tabelas 8 e 9 e Gráfico 7).

Não foi detectado em nenhuma amostra, quer seja obtida no período pós-prandial, no jejum ou realimentação, quaisquer vestígios de corpos cetônicos na urina.

Gráfico 7 – Valores médios e desvios-padrão dos índices de excreção urinário (IEU) de uréia (mmol/L), alantoína (mmol/L) e de ácido úrico (μ mol/L) de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

O pH do fluido ruminal foi maior na 1^a h do período pós-prandial que na 5^a, 9^a e 11^a h, a qual foi inferior 7^a h ($p < 0,01$). Maiores valores de pH ruminal foram obtidos na 36^a e 48^a h em relação aos demais tempos do período do jejum ($p < 0,01$). O pH do fluido ruminal foi maior na zero hora da realimentação que 48^a h, a qual foi superior a 24^a h, que por sua vez foi maior ($p < 0,01$) que a 12^a h (Tabela 10 e Gráfico 8). O valor da média global foi maior no jejum que nos períodos pós-prandial e realimentação (Tabela 11).

Tabela 10 - Valores médios e desvios-padrão do pH, tempo de redução do azul de metileno (minutos), matéria seca (MS) bacteriana indireta (absorbância) e número de protozoários (unidades x 10⁶/mL) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

TEMPOS		pH fluido ruminal	Tempo Redução do Azul de Metileno (minutos)	MS Bacteriana Indireta (absorbância)	Número de Protozoários (unidades x 10 ⁶ /mL)
PÓS-PRANDIAL	0 Hora	7,06 ± 0,09 ^a	2,1 ± 0,9 ^a	0,12 ± 0,02 ^b	3,60 ± 4,21 ^a
	1 Hora	6,92 ± 0,12 ^a	1,2 ± 0,5 ^a	0,22 ± 0,06 ^a	3,24 ± 2,91 ^a
	3 Horas	6,83 ± 0,18 ^{ab}	0,8 ± 0,5 ^a	0,23 ± 0,06 ^a	2,24 ± 2,12 ^a
	5 Horas	6,57 ± 0,20 ^b	0,9 ± 0,3 ^a	0,28 ± 0,11 ^a	3,30 ± 3,02 ^a
	7 Horas	6,50 ± 0,18 ^c	1,2 ± 0,4 ^a	0,28 ± 0,09 ^a	3,05 ± 2,98 ^a
	9 Horas	6,57 ± 0,17 ^b	1,4 ± 0,8 ^a	0,30 ± 0,05 ^a	3,44 ± 3,94 ^a
	11 Horas	6,59 ± 0,12 ^b	1,2 ± 0,7 ^a	0,29 ± 0,07 ^a	4,05 ± 4,40 ^a
JEJUM	0 Hora	6,84 ± 0,10 ^c	1,6 ± 0,5 ^c	0,22 ± 0,03 ^a	2,78 ± 2,87 ^a
	12 Horas	7,20 ± 0,05 ^{bc}	5,4 ± 2,2 ^{bc}	0,16 ± 0,04 ^{ab}	2,19 ± 2,52 ^a
	24 Horas	7,38 ± 0,06 ^{bc}	19,1 ± 12,1 ^b	0,13 ± 0,05 ^{ab}	1,15 ± 0,78 ^{ab}
	36 Horas	7,70 ± 0,10 ^a	18,0 ± 13,8 ^b	0,11 ± 0,03 ^b	0,28 ± 0,21 ^b
	48 Horas	7,84 ± 0,13 ^a	42,7 ± 27,1 ^a	0,09 ± 0,03 ^b	0,13 ± 0,05 ^b
REALIMENTAÇÃO	0 Hora	7,84 ± 0,13 ^a	42,7 ± 27,1 ^a	0,09 ± 0,03 ^b	0,13 ± 0,05 ^a
	6 Horas	6,76 ± 0,09 ^{bc}	1,7 ± 0,5 ^b	0,21 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,06 ^a
	12 Horas	6,22 ± 0,24 ^d	2,2 ± 0,6 ^b	0,19 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,05 ^a
	24 Horas	6,57 ± 0,13 ^c	5,5 ± 1,5 ^b	0,20 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,09 ^a
	48 Horas	6,94 ± 0,09 ^b	5,0 ± 3,2 ^b	0,18 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,11 ^a

Tabela 11 - Valores médios e desvios-padrão do pH e medianas do tempo de redução do azul de metileno (minutos), matéria seca (MS) bacteriana indireta (absorbância) e número de protozoários (unidades x 10⁶/mL) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

PERÍODOS	pH fluido ruminal	Tempo Redução do Azul de Metileno (minutos)	MS Bacteriana Indireta (absorbância)	Número de Protozoários (unidades x 10 ⁶ /mL)
Pós-Prandial	6,72 ± 0,25 ^b	1,0 ^c	0,26 ^a	1,54 ^a
Jejum	7,53 ± 0,27 ^a	12,3 ^a	0,12 ^c	0,55 ^b
Realimentação	6,62 ± 0,31 ^b	2,7 ^b	0,19 ^b	0,14 ^c
Nível de Significância	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,05

Gráfico 8 - Valores médios e desvios-padrão do pH e do tempo de redução do azul de metileno (minutos) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

Não existiu diferença significativa no tempo de redução do azul de metileno no período pós-prandial, porém no período de jejum, o tempo de redução da 48^a h foi ($p < 0,001$) maior que os demais momentos; enquanto que a 24^a e 36^a horas foram superiores ($p < 0,001$) a zero hora; na realimentação o tempo zero foi muito superior ($p < 0,001$) aos demais momentos (Tabela 10 e Gráfico 8). A mediana global foi maior ($p < 0,001$) no jejum, que na realimentação a qual foi superior ao período pós-prandial (Tabela 11).

Gráfico 9 - Valores médios e desvios-padrão da matéria seca (MS) bacteriana indireta (absorbância) e do número de protozoários (unidades x 10⁶/mL) do fluido ruminal de bovinos nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação. São Paulo, 2001

A matéria seca bacteriana indireta foi maior em todos os momentos do período pós-prandial que na hora zero ($p < 0,01$); no jejum, esta variável foi maior no momento zero que na 36^a e 48^a h ($p < 0,01$), por outro lado, na realimentação, o no tempo zero apresentou menor ($p < 0,05$) matéria seca bacteriana que os demais momentos (Tabela 10 e Gráfico 9). A mediana global foi maior ($p < 0,05$) no período pós-prandial, seguido da realimentação que foi superior ao jejum (Tabela 11).

Não existiu diferença significativa no número de protozoários no decorrer do período pós-prandial e da realimentação, porém no período de jejum, menor ($p < 0,05$) quantidade foi detectada nas 36^a e 48^a horas se comparado ao momento zero e 12 h desse período (Tabela 10 e Gráfico 9). A mediana global foi maior ($p < 0,05$) no período pós-prandial, seguido do jejum que foi superior à realimentação (Tabela 11).

5.1 Relação entre variáveis

O gráfico 10 representa a relação entre a glicemia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativo ($r = -0,52$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 10 – Relação entre glicemia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 11 representa a relação entre a concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) ($\mu\text{mol/L}$) e o tempo de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positivo ($r = 0,92$; $p < 0,00001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 11 – Relação entre a concentração plasmática de ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/L}$) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 12 representa a relação entre as concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (mmol/L) e ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/L}$) em bovinos no período de jejum, que obteve coeficiente de correlação positivo ($r = 0,68$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 12 – Relação entre as concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (mmol/L) e ácidos graxos livres ($\mu\text{mol/L}$) em bovinos no período de jejum. São Paulo, 2001

O gráfico 13 representa a relação entre a concentração sérica de uréia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positivo ($r = 0,52$; $p < 0,001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 13 – Relação entre a concentração sérica de uréia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 14 representa a relação entre o índice de excreção urinário de uréia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positivo ($r = 0,66$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 14 – Relação entre o índice de excreção urinário de uréia (mmol/L) e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 15 representa a relação entre o índice de excreção urinário de uréia (mmol/L) e a concentração sérica de uréia do período de realimentação em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positivo ($r = 0,80$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 15 – Relação entre o índice de excreção urinário de uréia (mmol/L) e a concentração sérica de uréia do período de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 16 representa a relação entre o déficit de volume plasmático de albumina (%) e o tempo de realimentação em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positivo ($r = 0,45$; $p < 0,02$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 16 – Relação entre o déficit de volume plasmático de albumina (%) e o tempo de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 17 representa a relação entre o pH do fluido ruminal e o tempo pós-prandial em bovinos, que obteve coeficiente de correlação ($r = 0,79$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 17 – Relação entre o pH do fluido ruminal e o tempo pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 18 representa a relação entre o pH do fluido ruminal e o tempo de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positiva ($r = 0,96$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 18 – Relação entre o pH do fluido ruminal e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 19 representa a relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o tempo pós-prandial em bovinos, que obteve coeficiente de correlação ($r = 0,64$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 19 – Relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o tempo pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 20 representa a relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o pH do fluido ruminal no período pós-prandial em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativa ($r = -0,76$; $p < 0,001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 20 – Relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o pH do fluido ruminal no período pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 21 representa a relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o pH do fluido ruminal no período de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativa ($r = -0,84$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 21 – Relação entre a matéria seca bacteriana indireta e o pH do fluido ruminal no período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 22 representa a relação entre o tempo de redução do azul de metileno e o tempo de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positiva ($r = 0,68$; $p < 0,001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 22 – Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 23 representa a relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta do período de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativa ($r = -0,88$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 23 – Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta do período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 24 representa a relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta do período pós-prandial em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativa ($r = -0,72$; $p < 0,001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 24 – Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta do período pós-prandial em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 25 representa a relação entre o pH do fluido ruminal e a matéria seca bacteriana indireta do período de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativa ($r = -0,84$; $p < 0,001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 25 – Relação entre o pH do fluido ruminal e a matéria seca bacteriana indireta do período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 26 representa a relação entre o pH do fluido ruminal e a redução do azul de metileno do período de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positiva ($r = 0,84$; $p < 0,001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 26 – Relação entre o pH do fluido ruminal e a redução do azul de metileno do período de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 27 representa a relação entre o número de protozoários e o tempo de jejum em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativa ($r = - 0,81$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 27 – Relação entre o número de protozoários e o tempo de jejum em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 28 representa a relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta no período de realimentação em bovinos, que obteve coeficiente de correlação negativa ($r = -0,89$; $p < 0,001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 28 – Relação entre o tempo de redução do azul de metileno e a matéria seca bacteriana indireta no período de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 29 representa a relação entre o índice de excreção urinário de alantoína e o tempo de realimentação em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positiva ($r = 0,73$; $p < 0,0001$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 29 – Relação entre a relação entre o índice de excreção urinário de alantoína e o tempo de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001

O gráfico 30 representa a relação entre o índice de excreção urinário de alantoína e a matéria seca bacteriana indireta no período de realimentação em bovinos, que obteve coeficiente de correlação positiva ($r = 0,24$; $p < 0,015$) entre estas duas variáveis.

Gráfico 30 – Relação entre a relação entre o índice de excreção urinário de alantoína e a matéria seca bacteriana indireta no período de realimentação em bovinos. São Paulo, 2001

6 DISCUSSÃO

Para facilitar e tornar mais didático o entendimento deste capítulo decidiu-se dividi-lo em quatro sub-capítulos de acordo com o assunto discutido, como denominados a seguir: 6.1) Status energético: jejum contrastado com o período pós-prandial; 6.2) Status energético: realimentação contrastada com o período de jejum; 6.3) Variáveis ruminais e urinárias: jejum contrastado com período pós-prandial; 6.4) Variáveis ruminais e urinárias: realimentação contrastada com o jejum e o período pós-prandial.

6.1 Status energético: jejum contrastado com o período pós-prandial

A maioria dos resultados obtidos no perfil metabólico dos animais no período pós-prandial comportaram-se conforme descrição na literatura clássica. Um dos exemplos típicos foi a curva glicêmica, que apesar de não evidenciar diferença significativa, apresentou, numericamente, concentração média de glicose inferior na 1ª hora pós-prandial em relação aos momentos subseqüentes. Isto era de se esperar, pois a absorção de propionato ruminal provoca uma súbita liberação de insulina com conseqüente diminuição moderada da glicemia (BOUCHAT et al., 1981).

A glicemia é considerada uma variável básica e de grande importância na avaliação do status energético (PAYNE; PAYNE, 1987). Os dados de glicemia no período pós-prandial do presente experimento, considerando-se o intervalo de dois desvios padrão em torno da média (3,4 a 4,8 mmol/L; média de 4,1 mmol/L), estiveram bem acima do que alguns autores clássicos descreveram (2,5 a 4,2 mmol/L, KANEKO et al., 1997) e (2,0 a 3,0 mmol/L,

PAYNE; PAYNE, 1987). Estes últimos dados foram obtidos em vacas leiteiras ou de corte, em lactação ou em gestação, que sabidamente apresentam menores valores de glicemia que bovinos jovens (OTTO et al., 1992; ROWLANDS, 1980; SOUZA et al., 1999; SUCUPIRA, 2003). Esta evidência indica que deveriam existir dois valores de referência para a glicemia, ou seja, um para bovinos adultos e outro para jovens. Esta condição também foi advogada por Otto et al. (1992), no Paraguai, que descreveram valores de referência de glicose ($4,32 \pm 0,72$ mmol/L, com 2 desvios-padrão) em bovinos jovens de corte, semelhante aos obtidos neste experimento.

A glicemia apresentou significativa diminuição no decorrer do período de jejum, sendo esta queda mais intensa ($r = -0,52$; $p < 0,0001$) quanto mais prolongado foi o tempo de abstenção alimentar (Gráfico 10). Isto também foi observado por outros autores (BOUCHAT et al., 1981; NDIBUALONJI et al., 1996; RULE et al., 1985). Apesar da nítida diminuição na glicemia, o organismo dos animais em jejum procurou manter a homeostase energética de maneira indireta, ou seja, gerando energia por meio da lipólise e da proteólise. Estes fatos foram direta ou indiretamente comprovados no presente experimento.

A gordura nas reservas está armazenada na forma de triacilglicerol. A enzima lipase desdobra este composto em glicerol e em três moléculas de ácidos graxos livres. Em condições experimentais demonstrou-se que o jejum induz o bovino a diminuir a quantidade de insulina secretada e por outro lado aumentar a secreção de glucagon. Esta condição hormonal é altamente estimulante para a maior atividade da lipase, pois a insulina tem um efeito inibidor enquanto que o glucagon estimulador dessa enzima (RULE et al., 1985). Neste experimento, a lipólise foi constatada de maneira direta (Gráfico 11) pelo aumento substancial nos teores séricos de ácidos graxos livres, que foram mais altos quanto maior o período de jejum ($r = 0,92$; $p < 0,0001$).

O glicerol e os ácidos graxos voláteis podem gerar glicose pelo processo denominado gliconeogênese. O primeiro substrato entra na via glicolítica transformando-se em triose-fosfato e em seguida em glicose, sendo esta uma rota muito utilizada no decorrer do jejum (LOMAX; BAIRD, 1983). Enquanto que o segundo vai ao fígado e dentro das mitocôndrias pode ser oxidado, gerando ATP, e também fornece acetil-CoA que se combina com oxaloacetato, entrando no ciclo de Krebs e finalmente na direção oposta à via glicolítica, formando glicose, numa rota chamada de gliconeogênese (HERDT, 1988).

Em casos de geração de grandes quantidades de ácidos graxos livres há uma diminuição nos teores de oxaloacetato, resultando na formação de corpos cetônicos, representados em cerca de 65 % pelo β -OH Butirato (KREBS, 1966; HERDT, 1988). Este composto também pode ser originado pelo butirato produzido na fermentação ruminal, que é absorvido e transformado no epitélio ruminal em β -OH Butirato e quando adentra a corrente circulatória, é utilizado como energia por alguns tecidos. Normalmente, o β -OH Butirato detectado no plasma é advindo da fermentação ruminal. No presente trabalho, a concentração plasmática de β -OH Butirato no período pós-prandial variou de 0,35 mMol/L (valor mínimo antes do oferecimento da dieta) a 0,67 mmol/L, de acordo com o descrito por Herdt (2000). Curiosamente, os teores de β -OH Butirato no plasma de bovinos em jejum apresentaram distribuição de função de segundo grau (quadrática), ou seja, no tempo zero os valores foram altos (0,54 mmol/L de média) constituindo-se basicamente do β -OH Butirato advindo da fermentação ruminal e nas próximas 24 horas do jejum apresentando valores mais baixos. Lomax e Baird (1983) determinaram a concentração de butirato na veia porta de bovinos submetidos a dois dias de jejum e verificaram que a concentração era zero, demonstrando que no jejum, o butirato ruminal nada contribuía para a formação do β -OH Butirato sanguíneo. No presente experimento, da 24^a hora até a 48^a hora de jejum, ocorreu um aumento na concentração de β -OH Butirato plasmático. Embora a elevação final (0,57 mmol/L) dos teores

de β -OH Butirato ainda estivesse dentro dos valores considerados normais, pode-se afirmar que a grande maioria do composto foi advindo da geração de corpos cetônicos, pois foi evidenciada alta correlação positiva ($r = 0,68$; $p < 0,0001$) entre os teores plasmáticos de AGLs e β -OH Butirato (Gráfico 12), indicando que ocorreu cetogênese, porém esta não foi suficiente para provocar um quadro de cetose, o qual pode ser caracterizado em bovinos, quando a concentração de β -OH Butirato ultrapassar a concentração plasmática de 1 mmol/L (HERDT, 1988; 2000).

A quantidade de corpos cetônicos produzida durante o jejum não foi suficiente para ser detectada na urina, o que normalmente são evidenciados em casos de cetose. Rule et al. (1985) submetendo garrotes a jejum por oito dias, demonstraram que o β -OH Butirato plasmático se elevou até o 2º dia de jejum (atingindo 0,6 mmol/L, semelhante ao teor aqui detectado) mantendo-se neste patamar até o 8º dia de jejum. Estes resultados levantam dúvidas nas afirmações clássicas, mas genéricas, de que a cetonúria é um fato comum em ruminantes submetidos a jejum (KANEKO et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000). Particularmente, a cetonúria pode ocorrer com mais frequência, em vacas parturientes em jejum, que apresentam perfil hormonal característico e um alto requerimento para a síntese láctea, o que provoca um notório balanço energético negativo, favorecendo a lipólise e gerando no processo quantidades muito mais altas de corpos cetônicos, os quais então ultrapassam o limiar renal e possibilitando a sua detecção no exame de Rothera (HERDT, 1988; 2000). Vale ressaltar que também não foi constatada cetonúria em garrotes submetidos à prolongada deficiência dietética de energia (SUCUPIRA, 2003).

Os ácidos graxos livres são considerados o principal metabólito sangüíneo para revelar problemas de energia em bovinos, mas tem como inconveniente o alto coeficiente de variação em vacas ao término de gestação e início de lactação que estão mais sujeitas a apresentarem balanço energético negativo, além de sofrerem alta influência do estresse, que também

estimula a lipólise (HERDT, 1988; 2000). Os coeficientes de variação médios desta variável determinados nos períodos pós-prandial, jejum e realimentação do presente trabalho foram, respectivamente, 35 %, 30% e 35 %, não caracterizando um alto coeficiente de variação, indicando assim que os ácidos graxos livres foram uma variável bastante sensível para detectar déficit energético em bovinos jovens, pois os teores de AGLs aumentaram constantemente durante o jejum ($p < 0,0001$), elevando-se mais de oito vezes ao término deste período em relação a concentração do período pós-prandial.

Os ácidos graxos livres ao serem mobilizados para o fígado podem seguir duas rotas metabólicas, ou seja: entrar para a mitocôndria dos hepatócitos, e serem oxidados ou permanecer no citosol e serem esterificados convertendo-se inicialmente em triglicerídeos, os quais são envoltos por uma camada de fosfolípides, colesterol e proteínas formando as lipoproteínas, que são facilmente disponibilizadas como energia para as células do organismo (HERDT, 1988; 2000). A mobilização excessiva de AGLs pode “congestionar” tanto a rota oxidativa como a de formação de lipoproteínas. Se a quantidade de triglicerídeos formados exceder a capacidade de síntese de fosfolípides e colesterol, os triglicérides se condensam e formam gotículas de gordura dentro dos hepatócitos, dando origem à lipidose ou esteatose hepática. Segundo Herdt (1988), existe uma correlação negativa entre a concentração sérica de colesterol total e o acúmulo de gordura no fígado. Em quadros de esteatose hepática há menor secreção de lipoproteínas para a corrente circulatória, conseqüentemente, há uma diminuição do colesterol total determinado no soro, pois parte deste metabólito analisado é proveniente destas lipoproteínas (HERDT, 1988). Uma intensa lipidose ainda pode provocar disfunção hepática, com conseqüente morte de hepatócitos, aumentando desta forma a atividade da enzima aspartato aminotransferase sérica (HERDT, 1988; RADOSTITS et al., 2000).

A mediana geral do colesterol e da AST no período do jejum apresentaram discreto aumento significativo se comparado com o pós-prandial. Apesar deste aumento significativo, ambas as variáveis encontraram-se dentro dos valores de referência indicados por González et al. (2000), ou seja, colesterol total 2,7 a 5,3 mmol/L e AST 30 a 130 U/L. Em outras palavras, a mobilização de ácidos graxos livres para o fígado não provocou lesões nos hepatócitos e nem alterou os mecanismos de esterificação dos triglicerídeos, não gerando uma lipidose hepática.

Como ressaltado no início deste capítulo, os bovinos em jejum procuraram manter a homeostase energética por meio de mobilização e uso de lipídeos e de aminoácidos de suas reservas corporais. Em bovinos normais, os teores séricos de uréia são máximos da 3^a hora a 9^a hora do período pós-prandial, devido principalmente à absorção da amônia, gerada pela digestão do nitrogênio dietético no rúmen e devidamente convertida no fígado à uréia, no ciclo do mesmo nome (BRITO, 1998).

Os teores séricos de uréia de bovinos em jejum iniciaram-se baixos no momento zero, refletindo a pequena quantidade de amônia gerada dentro do rúmen. Galyean et al. (1981) constataram queda contínua e expressiva nos teores de amônia no fluido ruminal de garrotes submetidos a jejum. Contudo, neste experimento quanto mais prolongado foi o período do jejum maior ($r = 0,52$; $p < 0,0001$) foram os teores de uréia sérica obtidos (Gráfico 13). Como a amônia de origem alimentar foi provavelmente pequena, este aumento de uréia pode ser explicado pela mobilização e uso de aminoácidos pela proteólise para geração de energia, o que também foi constatado por Rule et al. (1985) até o 2^o dia de jejum. A mobilização de aminoácidos e de proteínas da musculatura é estimulada em bovinos com balanço energético negativo, como por exemplo, no jejum onde há queda na razão dos teores de insulina:hormônio do crescimento ou aumento de glucagon (NDIBUALONJI et al., 1997). No jejum este perfil hormonal é comumente encontrado (NDIBUALONJI et al., 1997; RULE et

al., 1985). Os aminoácidos, em especial a alanina, aspartato, glutamina, glicina e serina entram no ciclo de Krebs ou no sentido oposto à via glicolítica, e geram glicose. Nesse processo, há liberação endógena de amônia que é devidamente desintoxicada em uréia e eliminada pela urina (BERGMAN, 1973).

Os teores de uréia sérica nem sempre espelham a real atividade do ciclo da uréia, pois este metabólito apresenta um limiar renal relativamente baixo, indicando que em condições normais, parte expressiva da uréia pode ser excretada pela urina, fazendo com que os teores de uréia sérica tendam a se manter constantes. Assim, seria mais plausível a avaliação do índice de excreção urinária da uréia que a uréia sérica “per se” (ORTOLANI, 2003). Nos animais em jejum, o índice de excreção urinária de uréia iniciou-se baixo, elevando-se no decorrer do ($r = 0,66$; $p < 0,0001$) tempo de abstinência alimentar (Gráfico 14). Isto indica que ocorreu no decorrer do jejum, maior mobilização de proteína muscular e conseqüente proteólise, que por seu turno aumentou o teor de amônia no sangue gerando um incremento no ciclo da uréia e na eliminação de uréia pela urina.

A excreção de uréia pela urina pode diminuir em casos de redução do fluxo sangüíneo renal e com conseqüente queda na taxa de filtração glomerular, alterações comumente encontradas em casos de intensa desidratação e hipovolemia (KANEKO et al., 1997). Em condições normais a creatinina sérica é francamente excretada pelos rins, mantendo uma baixa e constante concentração sérica, mas em casos de marcante desidratação, hipovolemia ou de menor fluxo sangüíneo renal este catabólito se eleva na corrente circulatória (KANEKO, 1997). Neste experimento ficou demonstrado que o jejum alimentar provocou moderado aumento na taxa de déficit de volume plasmático, em outras palavras, causou leve hipovolemia, evidenciada pela albumina, proteína total, e globulinas séricas, que se incrementaram na 48^a hora em média 6,1 %, 9,3% e 11,8%, respectivamente. Em nenhum momento ao término do período do jejum foi verificado qualquer sintoma clínico indicativo

de desidratação, diferente da situação encontra por Maruta (2001) que detectou em bovinos com acidose láctica ruminal altas taxas de déficit de volume plasmático (em torno de 35%) e constatação evidente de quadro de desidratação e oligúria. Embora tivesse existido uma moderada hipovolemia no presente experimento, o fato de não ter ocorrido o aumento concomitante da creatinina sérica, supõe-se que o jejum alimentar de 48 horas não interferiu no fluxo sanguíneo renal e nem na taxa de filtração glomerular. Maiores estudos são necessários para provar esta hipótese. A gênese desta leve hipovolemia provavelmente é consequência da menor ingestão de água provocada pelo jejum alimentar “per se”, além disto sabe-se que parte significativa do consumo de água esta ligada à presença desta substância no próprio alimento. Em experimento controlado, Bond et al. (1976), submeteram garrotes de 300 kg a jejum alimentar e avaliaram a ingestão de água diária; enquanto que no período controle a ingestão média de água era de 41 litros, ao término de 48 horas de jejum o consumo passou a ser apenas de 8,5 litros.

Finalmente, deve-se considerar que embora o jejum de 48 horas tivesse diminuído a concentração de glicose sanguínea, o que proporcionou aumento da lipólise e proteólise, a restrição alimentar provocou nos animais queda no metabolismo basal e que de certa forma diminuiu os requerimentos energéticos e, conseqüentemente, diminuiu o déficit energético. Lomax e Baird (1983) verificaram que a utilização de oxigênio pelo fígado, que normalmente consome cerca de 20% do total gasto pelo organismo, há redução de até 41% em bovinos submetidos a dois dias de jejum. No presente experimento a pO_2 sanguínea (dados não apresentados) durante o jejum foi cerca de 11,4 % menor que no período de alimentação.

Em suma, o jejum alimentar de 48 horas provocou nos animais moderada hipoglicemia, acompanhada de destacada lipólise, que desencadeou discreto aumento na quantidade de β -OH Butirato sérico de origem cetogênica, sem ocorrência de cetonúria e lipidose hepática. O jejum promoveu proteólise que foi determinada pelo maior índice de

excreção urinária de uréia, e embora coexistisse um discreto aumento no déficit de volume plasmático este parece não ter alterado a capacidade renal de excreção.

6.2 Status energético: realimentação contrastada com o período de jejum

Se por um lado ficou demonstrado que o jejum provocou uma significativa alteração no metabolismo energético em curto prazo, a realimentação gerou imediata recuperação do status energético, principalmente, se for observada a curva glicêmica. Esta variável se regularizou, em relação ao período pós-prandial, já na 6^a hora após o oferecimento dos alimentos, atingindo o seu valor máximo na 12^a hora, com teores quase hiperglicêmicos (4,8 mmol/L, valor igual ao limiar superior obtido no período pós-prandial, considerando-se dois desvios padrão). Deve-se também considerar que a mediana global de glicose foi superior na realimentação que nos períodos pós-prandial e jejum. Por outro lado, os teores de AGLs reduziram de maneira significativa na 6^a hora, atingindo os valores considerados normais dentro das próximas 24 horas. Paralelamente, os teores de β -OH Butirato diminuíram drasticamente nas mesmas 24 horas.

O conjunto destes resultados indica que no primeiro dia de realimentação, existiu marcante gliconeogênese, acompanhada de drástica redução da lipólise e da geração de β -OH Butirato pela via cetogênica. Houve um período transitório, nas primeiras 6 horas, de maiores teores séricos de uréia e, por coincidência, de ($r = 0,80$; $p < 0,0001$) maior índice de excreção renal de uréia, os quais se correlacionaram positivamente (Gráfico 15). Por incrível que pareça, não foram encontrados trabalhos na literatura que acompanhassem ao mesmo tempo o perfil metabólico e a variação hormonal de bovinos em realimentação, o que torna as ponderações alinhavadas nos próximos parágrafos hipotéticas.

O presente trabalho verificou que durante a realimentação existiu lenta recuperação na microbiota ruminal, em especial dos protozoários, indicando que a fermentação ruminal estava abaixo do padrão normal, o que é confirmado por uma série de outros trabalhos que serão discutidos em outro sub-capítulo. No trabalho de Lomax e Baird (1983) demonstrou-se que no 1º dia de realimentação, após longo período de jejum, a quantidade de propionato ruminal absorvido para a veia porta era 68,5% inferior que em condições normais de alimentação em bovinos. Ou seja, a intensa gliconeogênese gerada no 1º dia de realimentação não foi determinada basicamente pelo propionato ruminal, normalmente o principal substrato da gliconeogênese. Como ocorreu queda na lipólise, que também poderia gerar substratos para a gliconeogênese, especula-se que a principal fonte geradora de glicose provenha da proteólise, visto que nesse período foram encontrados os maiores teores, entre todos os obtidos nos três períodos, de uréia sérica e de índice de excreção de urinária de uréia.

No complexo trabalho de Lomax e Baird (1983), baseando-se na quantidade de propionato, lactato, β -OH Butirato, glicerol e alguns aminoácidos que foram determinados na artéria hepática, teorizaram que o principal substrato precursor da glicose durante a realimentação seria o lactato com 54,4%, seguido pelo propionato (16,9%) e de alguns aminoácidos (4,4%), porém não consideraram o aspartato. Contudo, os autores não comentaram a origem do lactato no organismo. Bond et al. (1975) descreveram que bovinos realimentados com dieta contendo concentrados energéticos podem até dobrar a quantidade de ácido láctico produzido no rúmen e sua absorção, porém este substrato não seria suficiente para gerar a maioria da glicose neoformada descrita por Lomax e Baird (1983). Estes autores ao estudar unicamente a geração de glicose pelo fígado, desconsideraram os rins, que segundo Brockman e Laarveld (1986), podem sintetizar cerca de 15 % da glicose. Além disso, subestimaram quantitativamente a geração de glicose pelos aminoácidos, em especial do

aspartato. Os altos teores de uréia sérica obtidos na 6^a hora da realimentação reforçam esta última hipótese de que os aminoácidos foram essenciais para a formação de glicose.

Caso esta hipótese seja correta, torna-se mais complexo o entendimento dos mecanismos hormonais regulatórios do perfil metabólico durante a realimentação. Como no presente trabalho, as concentrações de AGLs diminuíram drasticamente no decorrer da realimentação, seria lógico afirmar que as secreções de insulina tenham aumentado e as de glucagon tenham diminuído, pois este quadro hormonal levaria à redução da lipólise. Além disso, também haveria a diminuição da proteólise (HERDT, 1988). Logo, poder-se-ia afirmar que essa situação pode ter não ocorrido, pois no início da realimentação foram encontradas as menores médias de glicose plasmática, o que estimularia a secreção de glucagon e do hormônio de crescimento. Por outro lado, a quantidade de insulina secretada nas primeiras horas de realimentação não deve ter sido muito alta, pois este hormônio é mais secretado quanto maior for a absorção de propionato ruminal. Segundo Galyean et al. (1981), os teores de propionato ruminal de bovinos na sexta hora da realimentação, após período de jejum, foram 79% menores que os encontrados no grupo controle. Além do mais, a secreção de insulina pós-prandial, em ruminantes hipoglicêmicos, é bastante baixa. (BROCKMAN; LAARVELD, 1986).

Este provável perfil hormonal, alta concentração de glucagon e de hormônio do crescimento e baixa de insulina, facilitaria a neoglicogênese e a proteólise, mas, por outro lado provocaria uma alta lipólise. Supõe-se que a neoglicogênese seria de tal forma incrementada a partir do início da realimentação que levaria a um aumento na glicemia na 6^a hora, e em maior grau na 12^a hora, como verificado neste trabalho. Esta hiperglicemia “per se” estimularia a lipogênese diminuindo conseqüentemente a lipólise (HERDT, 2000). Com diminuição da lipólise, ocorre concomitantemente queda na cetogênese.

Na síntese destas hipóteses, deve ter ocorrido nas primeiras horas de realimentação, altas secreções de glucagon e de hormônio de crescimento e diminuição da insulina, resultando numa hiperglicemia, a qual levariam a um quadro final de neoglicogênese devido à proteólise e redução da lipólise. Maiores estudos são necessários para comprovar estas hipóteses.

O déficit de volume plasmático, calculado pela albumina sérica, aumentou levemente no período do jejum e apresentou moderada correlação negativa ($r = 0,45$; $p < 0,02$) com o tempo durante a realimentação (Gráfico 16), ou seja, quanto mais tempo decorreu do início deste período experimental maior foi a incorporação de fluidos no plasma, indicando que o leve grau de desidratação intravascular foi devidamente corrigido no decorrer da realimentação. No experimento de Bond et al. (1976), os autores verificaram que garrotes submetidos a jejum, mesmo tomando menos água neste período, retornaram à ingestão normal de água durante a realimentação, facilitando assim, a recuperação do déficit de volume plasmático.

Em suma, na realimentação ocorreu rápida recuperação da leve hipoglicemia detectada no jejum, com marcada queda na lipólise e na cetogênese, acompanhada temporariamente por maior proteólise. A leve desidratação intravascular constatada no período do jejum foi aparentemente corrigida durante a realimentação.

6.3 Variáveis ruminiais e urinárias: jejum contrastado com período pós-prandial

O pH do fluido ruminal no período pós-prandial apresentou flutuações, tornando-se mais ácido durante a fermentação ruminal, atingindo seu menor valor na 7^a hora, e tendendo a retornar aos valores mais alcalinos, do início do experimento, ($r = 0,79$; $p < 0,0001$) nas horas

subseqüentes (Gráfico 17), seguindo o mesmo comportamento descrito por Ortolani (1980) que mensurou o pH do fluido ruminal no mesmo período supracitado em novilhas alimentadas com ração total. No período de jejum, o fluido ruminal apresentou elevação contínua do seu pH ($r = 0,96$; $p < 0,0001$), tornando-se, em média, um grau mais alcalino ao término do ensaio (Gráfico 18). Este resultado indica que no decorrer deste período houve aumento de dez vezes na concentração de bases.

Esta alcalinidade foi semelhante à descrita em outros trabalhos, ocorrendo basicamente devido à menor produção de ácidos graxos voláteis totais, à menor absorção dos mesmos, e à secreção de saliva no decorrer do jejum (BOND et al., 1975; COLE; HUTCHESON, 1981, 1985; GALYEAN et al., 1981). A saliva dos ruminantes apresenta alto pH (8,1), pois é rica em bicarbonato. Cerca de 36% do total do volume secretado pelo animal ocorre durante o período em que o animal está em “descanso”, ou seja, não ruminando e nem se alimentando (BARTLEY, 1976).

A falta de ingestão de alimentos reduziu de maneira significativa a flora e a fauna ruminal, assim como, sua atividade fermentativa. As bactérias que são os principais constituintes da biomassa ruminal, foram avaliadas, indiretamente, neste trabalho de três maneiras: determinação indireta da matéria seca bacteriana, tempo de redução de azul de metileno e excreção de derivados purínicos pela urina.

Os resultados da determinação indireta da matéria seca bacteriana indicaram que a biomassa da flora variou, no período pós-prandial, numa distribuição de função de segundo grau (quadrática) ($r = 0,64$; $p < 0,001$) em função com o tempo (Gráfico 19), tendo alta correlação negativa ($r = -0,76$; $p < 0,001$) com o pH ruminal (Gráfico 20); já no jejum a biomassa bacteriana declinou linearmente ($r = -0,84$; $p < 0,0001$) com o decorrer deste período. Ao término do jejum esta determinação caiu cerca de 59%, quantia semelhante à queda na atividade fermentativa ruminal (70%) detectada por Cole e Hutcheson (1981) em

garrotes em jejum hídrico e alimentar de 48 horas. O teste empregado por estes autores mensurou o gás produzido “in vitro” por bactérias presentes em 20 mililitros de fluido ruminal. Nagadi et al. (2000) encontrou alta correlação entre o teste indireto de determinação de matéria seca bacteriana e a matéria seca propriamente dita, assim como com a atividade fermentativa ruminal “in vitro”. Sem qualquer dúvida o teste utilizado no presente trabalho mostrou-se de grande valia pela sua simplicidade, praticidade e importância na mensuração de função tão fundamental para estimativa da atividade bacteriana ruminal. Contudo, até o momento não existem outros relatos, além do de Nagadi et al. (2000) utilizando esta técnica tão simples e que pode trazer tanta informação para o clínico veterinário.

Outro teste que também determinou a menor atividade bacteriana ruminal, no decorrer do jejum, foi o tempo de redução de azul de metileno; quanto mais prolongado o jejum maior foi o ($r = 0,68$; $p < 0,001$) tempo de redução do azul de metileno (Gráfico 22). Este teste não foi utilizado por outros autores que estudaram os efeitos do jejum sobre a flora ruminal. Vale ressaltar que possui grande vantagem sobre os demais testes, pois pode ser conduzido no campo, realizado em poucos minutos, sem a necessidade de equipamentos, além disso, o reativo é estável em vidro âmbar por longo período de tempo. A sensibilidade parece ter sido muito maior que a determinação indireta bacteriana, pois enquanto os valores deste último teste diminuíram em média cerca de 2,4 vezes, em relação ao período pós-prandial, a redução de azul de metileno aumentou mais de 20 vezes. O princípio deste teste é a capacidade de avaliação das bactérias redutoras presentes no fluido ruminal em reduzir o corante azul de metileno, tornando-o incolor (ROSENBERGER, 1983). Estas bactérias diminuem o seu número expressivamente quando há excesso de oxigênio no ambiente ruminal ou na ausência de substrato dietético. No jejum, há queda no número de bactérias e protozoários, em especial aqueles que têm a capacidade redutora, e que são necessários para manter a anaerobiose no interior do rúmen. Consequentemente, nesta situação ocorre acúmulo de oxigênio dentro do

fluido ruminal. Sabe-se que o oxigênio, em especial quando difundido dentro da fase líquida do rúmen, é tóxico para as bactérias anaeróbicas obrigatórias, assim como, para os protozoários holotríquios (HOBSON, 1988; VAN SOEST, 1982). Existiu uma alta correlação negativa entre a determinação indireta da matéria seca bacteriana e o teste de redução de azul de metileno ($r = -0,88$; $p < 0,0001$) durante o jejum (Gráfico 23), o mesmo ocorre durante o período ($r = -0,72$; $p < 0,001$) pós-prandial (Gráfico 24), indicando que este último teste é bastante adequado para avaliar a atividade bacteriana ruminal.

Outras constatações interessantes foram as altas correlações negativa entre a matéria seca bacteriana e o ($r = -0,84$; $p < 0,001$) pH ruminal (Gráfico 25) e positiva, entre o pH do fluido ruminal e o ($r = 0,84$; $p < 0,001$) teste de redução do azul de metileno (Gráfico 26) durante o jejum. Ou seja, se a falta de substrato provocou queda no número de bactérias, que por seu turno diminuíram a quantidade de AGVs dentro do rúmen e aumentaram o pH do fluido ruminal. O presente trabalho demonstrou que esta alcalinidade interferiu negativamente na atividade das bactérias redutoras ruminais. De fato, trabalho recente de Smith e Correa (2004) que suplementaram vacas com hidróxido de magnésio, com intenção de elevar o pH ruminal, e constataram que quanto maior foi o valor desta variável, maior foi o tempo de redução do azul de metileno, como também observado no presente trabalho.

Não ocorreu apenas a diminuição do número das bactérias ruminais. Os protozoários também apresentaram queda numérica linear ($r = -0,81$; $p < 0,0001$) no decorrer do jejum (Gráfico 27), com cerca de 95% de redução dentro de 48 horas. Num experimento similar com garrotes, mas com restrição de água, Galyean et al. (1981) constataram na 32^a hora de jejum, diminuição de cerca de 67 % dos protozoários, enquanto que na 36^a hora do presente experimento, esta queda era da ordem de 90%. O desaparecimento mais intenso do número de protozoários no presente trabalho esta ligado ao fato do oferecimento de água a vontade, enquanto que Galyean et al. (1981) restringiram a água, que além de causar a diluição dos

protozoários, provoca “implosão” de parte dos infusórios com membrana citoplasmática menos resistente (ORTOLANI; TAKIMOTO, 1987).

Outro teste que revelou de alguma forma as mudanças na biomassa ruminal foi a excreção de catabólitos das purinas (alantoína e ácido úrico) pela urina. Esses catabólitos são provenientes da degradação do DNA endógeno, do próprio bovino, como o DNA das bactérias e protozoários ruminais, que foram mortos, digeridos e os seus ácidos nucleicos absorvidos nos intestinos. No ruminante, cerca de 85 % das purinas são oriundos da microbiota ruminal (SUCUPIRA, 2003). No presente trabalho, a alantoína teve uma diminuição na sua excreção renal já na 12^a hora de jejum, porém quantidades semelhantes de alantoína foram eliminadas nos horários posteriores, demonstrando não ser um marcador sensível e prático da biomassa bacteriana, evacuada do rúmen, durante o jejum. Por outro lado, as técnicas de redução de azul de metileno e da matéria seca bacteriana expressaram, além da 12^a hora de jejum, intensa diminuição na atividade bacteriana. Estudos recentes demonstraram que bovinos jovens, que não tinham desenvolvido ainda microbiota ruminal, apresentaram sensível diminuição na excreção de alantoína endógena pela urina durante o jejum (FUJIHARA et al., 2003). Este resultado sugere que a alantoína excretada no decorrer do jejum, no presente experimento, era de origem exógena, ou seja, da microbiota ruminal. Assim, é possível que parte da alantoína excretada na urina no decorrer jejum tenha sido proveniente da microbiota ruminal que adentrou os segmentos posteriores do intestino, mascarando os resultados. Caso isto seja verdade, haverá necessidade do prolongamento do jejum para provocar queda mais substancial na excreção renal de alantoína.

O índice de excreção de ácido úrico na urina não se revelou, neste experimento, ser bom indicador da biomassa ruminal, por decorrências de motivos desconhecidos.

Em suma, o jejum provocou, comparado com o período pós-prandial, aumento no pH do fluido ruminal, com intensa queda na atividade fermentativa bacteriana deste órgão, o que

foi verificado pela diminuição da matéria seca bacteriana - medida indiretamente; menor excreção de alantoína pela urina, aumento no tempo de redução do teste de azul de metileno, e também pela drástica redução na quantidade de protozoários. Uma esperada diminuição no índice de excreção urinária de ácido úrico não ocorreu.

6.4 Variáveis ruminais e urinárias: realimentação contrastada com o jejum e o período pós-prandial

Durante todo o período de realimentação, o pH do fluido ruminal apresentou queda significativa em relação ao momento inicial, indicando que estava ocorrendo adequada atividade fermentativa no rúmen, fazendo com que houvesse retorno dos valores normais de pH obtidos no decorrer do período pós-prandial. Contudo, chama a atenção o momento 12 horas, cuja média de pH ($6,22 \pm 0,24$) foi bem inferior ($p < 0,01$) às detectadas no decorrer de todo o período pós-prandial, especialmente em relação à 11^a hora ($6,59 \pm 0,12$). Em experimentos com delineamento semelhante, Cole e Hutcheson (1981) e Galyean et al. (1981) também verificaram este comportamento. Os primeiros autores estudaram paralelamente a capacidade tampão do suco de rúmen e constataram que esta variável tinha diminuído concomitantemente com a queda do pH do fluido ruminal, devido a uma provável menor produção de saliva e a diluição do conteúdo ruminal conseqüente do consumo de alimentos e de água. O jejum, sem dúvida, é um processo que causa estresse nos animais. Crookshank et al. (1979) determinaram maiores teores de cortisol em garrotes submetidos ao estresse. O estresse também provoca aumento na liberação de hormônios simpatomiméticos os quais interferirão negativamente na produção e secreção de saliva pelo ruminante, explicando em

parte o motivo da baixa capacidade tampão no rúmen durante o período inicial da realimentação (ORTOLANI, 1981).

A determinação indireta da matéria seca ruminal apresentou elevação muito rápida já na 6^a hora (133% superior ao tempo basal) mantendo-se neste patamar no decorrer de todo o período de realimentação. Mesmo assim, a mediana geral da realimentação foi inferior ao obtido no período pós-prandial. Resultados semelhantes foram também verificados por Cole e Hutcheson (1981) e Galyean et al. (1981) que determinaram que a atividade fermentativa ruminal, como a contagem global de bactérias ruminais, respectivamente, foram se equiparar ao período pós-prandial, à partir do 3^o dia de realimentação.

Os resultados constatados no tempo de redução de azul de metileno foram intrigantes. Enquanto que no momento basal este era de 42,7 minutos, na 6^a hora caiu para 1,7 minutos (coeficiente de variação 29%). Curiosamente, cinco dos 12 animais do experimento apresentaram aumento no tempo de redução de azul de metileno nos momentos posteriores da realimentação, chegando num caso (na 48^a hora) de até 10 minutos. Curiosamente, estes animais que tiveram os referidos incrementos no tempo de redução, também exibiram diminuição na determinação indireta da matéria seca bacteriana, conseqüente à altíssima correlação negativa ($r = -0,89$; $p < 0,001$) entre estas variáveis (Gráfico 28). Como este resultado, corrobora outros mostrados acima entre estas variáveis, pode-se sugerir que o número de bactérias redutoras espelha nas várias circunstâncias de ambiente ruminal a quantidade global de bactérias presentes no rúmen.

Os presentes resultados de contagem do número de protozoários diferem apenas em magnitude aos obtidos por Galyean et al. (1981) - os únicos a estudarem o assunto em bovinos mantidos em jejum e realimentação. Neste trabalho americano houve constatação da diminuição da população protozoária em cerca de 70 %, na 32^o hora de jejum, momento que este foi interrompido. No presente trabalho, esta queda, na 36^a hora, foi de 90 %. O jejum, no

presente experimento, foi prolongado por mais 12 horas, o que fez a população protozoária ser reduzida pela metade, diminuindo drasticamente seu número. Em relação a população contada na 48^a hora de jejum, a multiplicação dos protozoários após 48 horas de realimentação foi de 132% no trabalho americano, enquanto que no presente trabalho atingiu 185 %. A quantidade de protozoários voltou ao normal após 72 horas no trabalho de Galyean et al. (1981), o que segundo projeções dificilmente seria atingida no presente trabalho. Assim, pode-se teorizar que a submissão de bovinos a mais de 32 horas de jejum fez com que o retorno da população protozoária seja muito mais lenta, devido provavelmente ao baixo número de infusórios ao término do período de jejum.

A população protozoária do rúmen teve um comportamento completamente diferente da bacteriana no período de realimentação. Enquanto que a primeira apresentou pequeno e pouco expressivo crescimento de seu número após o oferecimento de alimentos (9%), a bacteriana se elevou de maneira muito marcante, ou seja, 73 %. As bactérias tendem a se multiplicar com maior rapidez em ambiente rúminar defaunado que faunado, além disto não diminuem tão drasticamente seu número durante o jejum pois, apresentam grandes depósitos de grânulos de polissacarídeos no seu citoplasma (HOBSON, 1988).

O índice de excreção urinária de alantoína elevou-se no ($r = 0,73$; $p < 0,0001$) decorrer da realimentação (Gráfico 29), sendo que nos dois últimos momentos (36^a e 48^a horas) seus valores médios foram semelhantes aos obtidos no período pós-prandial. Como a realimentação não faz aumentar a quantidade excretada de alantoína endógena (FUJIHARA et al., 2003), é praticamente certo que este aumento de eliminação de alantoína seja devida ao componente exógeno, pois existiu aumento concomitante da matéria seca bacteriana ruminal, existindo moderada correlação significativa ($r = 0,24$; $p < 0,015$) entre estas duas variáveis na realimentação (Gráfico 30). Mais uma vez o índice de excreção urinário de ácido úrico não se mostrou eficiente para quantificar a microbiota ruminal.

Em suma, no decorrer das 48 horas de realimentação, o pH do fluido ruminal retornou à normalidade, embora na 12^a hora, seu valor tenha sido temporariamente mais baixo, a determinação indireta da matéria seca bacteriana teve um expressivo aumento quase atingindo os valores normais; o tempo de redução de azul de metileno diminui de maneira significativa, correlacionando-se com a matéria seca bacteriana; a contagem de protozoários apresentou lenta, mas significativa, recuperação de seu número, porém muito aquém de atingir a normalidade; o índice de excreção urinário de alantoína apresentou, ao término deste período, a normalização de seus valores, não ocorrendo tal fato com o índice de ácido úrico, que não se mostrou eficiente em quantificar a microbiota ruminal.

7 CONCLUSÕES

O perfil metabólico sanguíneo de garrotes submetidos à 48 horas de jejum alimentar apresentou moderada hipoglicemia, proteólise e destacada lipólise, com discreta cetogênese e não desenvolveu lipidose hepática evidente

O perfil metabólico sanguíneo de garrotes submetidos à 48 horas de realimentação apresentou rápida recuperação da hipoglicemia, pronta interrupção dos processos de lipólise, cetogênese e aumento temporário da proteólise

O jejum alimentar de 48 horas gerou discreto aumento do déficit de fluidos intravascular, ou seja, moderada hipovolemia, a qual foi prontamente corrigida durante a realimentação

O perfil ruminal de garrotes submetidos à 48 horas de jejum alimentar apresentou elevação no pH do fluido ruminal, menor atividade fermentativa do rúmen, diminuição significativa da matéria seca bacteriana, aumento expressivo do tempo de redução de azul de metileno, drástica queda no número de protozoários, e pequena redução no índice de excreção urinária de alantoína.

O perfil ruminal de garrotes submetidos à 48 horas de realimentação apresentou normalização do pH do fluido ruminal, retorno integral do número e função redutora da flora ruminal e recuperação parcial da população protozoária.

O teste de redução do azul de metileno apresentou alta correlação com a matéria seca bacteriana, sendo o teste de eleição por ser prático, rápido e de fácil execução.

REFERÊNCIAS

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, N.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 470-475, 1974.

BARTLEY, E. E. **Buffers in ruminant physiology and metabolism**, New York:Church Dwight Co., Inc, 1976. 172 p.

BERGMAN, E. N. Glucose metabolism in ruminants as related to hypoglycemia and ketosis. **Cornell Veterinary**, v. 63, n. 3, p. 342-382, 1973.

BIDE, R. W. Metabolic profiles of beef cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 19, n. 12, p. 344-345, 1978.

BOND, J.; RUMSEY, T. S.; WEINLAND, B. T. Effect of deprivation and reintroduction of feed and water on the feed and water intake behavior of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 873-878, 1976.

BOND, J.; SLYTER, L. L.; RUMSEY, T. S. Fasting and refeeding of forage and concentrate diets to cattle. **Journal of Animal Science**, v. 41, p. 392, 1975. Suplemento.

BORCHERS, R. Allantoin determination. **Analytical Biochemistry**, v. 79, n. 2, p. 612-613, 1977.

BOUCHAT, J. C.; DOIZE, F.; PAQUAY, R. Influence of diet and prolonged fasting on blood lipids, ketone bodies, glucose and insulin in adult sheep. **Reproduction Nutrition Development**, v. 21, n. 1, p. 69-81, 1981.

BRITO, L. A. B. **Avaliação do uso intensivo de cama de frango na alimentação de bovinos: alguns aspectos toxicológicos e do metabolismo do nitrogênio**. 1998. 253 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: A Review. **Livestock Production Science**, v. 14, n. 4, p. 313-334, 1986.

CHEN, X. B.; HOVELL, F. D.; ORSKOV, E. R.; BROWN, D. S. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. **Brithish Journal Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 131-142, 1990.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREALL, M. Digestive and metabolic adaptation of ruminants to undernutrition and consequences on reproduction. **Reproductive Nutrition Development**, v. 38, n. 2, p. 131-152, 1998.

COLE, N. A.; HUTCHESON, D. P. Influence on beef steers of two sequential short periods of feed and water deprivation . **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 4, p. 907-915, 1981.

COLE, N. A.; HUTCHESON, D. P. Influence of realimentation diet on recovery of rumen activity and feed intake in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 61, n. 3, p. 692-701, 1985.

CROOKSHANK, H. R.; ELISSALDE, M.H.; WHITE, R. G.; CLANTON, D. C.; SMALLEY, H. E. Effect of transportation and handling of calves on blood serum composition. **Journal Animal Science**, v. 48, n. 2, p. 430, 1979.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L.; BERTI, G. Use of 3,5-dicloro-hydroxybenzenesulfonicacid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzyme assay of uric acid in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 227-231, 1980.

FOSTER, L. A. Clinical ketosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.4, n. 2, p. 253-267, 1988.

FUJIRAH, T.; TODOROKI, M.; NAKAMURA, K. The effect of rumen protozoa on the urinary excretion of purine derivatives in goats. **Journal of Agricultural Science**, v. 140, n. 1, p. 101-105, 2003

GALYEAN, M. L.; LEE, R. W.; HUBBERT, M. E. Influence of fasting and transit on ruminal and blood metabolites in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 7-18, 1981.

GELLA, F. J.; OLIVELLA, T.; CRUZ PASTOS, M.; ARENAS, J.; MORENO, O. R.; DURBAN, R.; GOMEZ, J. A. A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. **Clinical Chemistry Acta**, v. 157, n. 1, p. 241-247, 1985.

GONZÁLEZ, F. H. D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 63-74.

HERDT, H. H. Fuel homeostasis in the ruminant. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 4, n. 2, p. 213-231, 1988.

HERDT, H. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 16, n. 2, p. 215-229, 2000.

HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier applied science, 1988. 104 p.

INGRAHAM, R. H.; KAPPEL, L. C. Metabolic profile testing. **The Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 4, n. 2, p. 391-409, 1988.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KREBS, H. A. Bovine ketosis. **The Veterinary Record**, v. 78, n. 6, p. 187-192, 1966.

LENG, R. A.; ANNISON, E. F. Metabolic activities of sheep erythrocytes. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 13, n. 1, p. 31-44, 1962.

LISBOA, J. A. N.; BENESI, F. J.; MARUTA, C. A.; CARPIGIANE, C. M. C. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico quando mantidas sob conservação em água gelada. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 271-276, 2001.

LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. **Agricultural Experimentation – Design and Analysis**, New York: John Wiley & Sons, 1978. 350 p.

LOMAX, M. A.; BAIRD, G. D. Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow: effects of lactation and fasting. **British Journal of Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 481-496, 1983.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MARUTA, C. A. **Comparação da susceptibilidade de bovinos da raça Jersey e Gir à acidose láctica ruminal, induzida experimentalmente com sacarose.** 2000. 120 f. Tese (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

NAGADI, S.; HERRERO, M.; JESSOP, N. S. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and in vitro gas production degradability parameters. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, n. 3, p. 231-239, 2000.

NDIBUALONJI, B. B.; DEHARENG, D., BECKERS, F., VAN EENAEME, C.; GODEAU, J. M. Continuous profile and within-day variations of metabolites and hormones in cows fed diets varying in alimentary supplies before short-term feed deprivation. **Journal Animal Science**, v. 75, n. 12, p. 3262-3277, 1997.

OETZEL, G. R.; OLSON, J. D.; CURTIS, C. R. Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 71, n. 7, p. 3302-3309, 1988.

ORTOLANI, E. L. **Determinação dos valores do pH do suco de rúmen dos bovinos: efeito da espécie, cruzamento e dieta.** 1980. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1980.

ORTOLANI, E. L. Considerações técnicas sobre o uso da sonda esofágica na colheita do suco de rúmen de bovinos para mensuração do pH. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 33, n. 2, p. 269-275, 1981.

ORTOLANI, E. L. Intoxicação cúprica acumulativa em ovinos. In: CONGRESSO DE BUIATRIA, 11., 2003, Salvador. **Anais...** v. 1, p. 138.

ORTOLANI, E. L.; TAKIMOTO, C. Estudos comparativos da fauna do rúmen entre o *Bos taurus*, *Bos indicus* e mestiços. Aspectos quantitativos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 81-91, 1987.

OTTO, F.; IBANEZ, A.; CABALLERO, B.; BOGIN, E. Blood profile of paraguayan cattle in relation to nutrition, metabolic state, management and race. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, n. 3, p. 91-99, 1992.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The Metabolic Profile.** 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 1987. p. 179.

RADOSTITS, O. M.; ARUNDEL, J. H. **Veterinary Medicine**. 9th ed. London; New York: Saunders, 2000. 1877 p.

ROSEMBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1983. 429 p.

ROWLANDS, G. J. A review of variations in the concentrations of metabolites in the blood of beef and dairy cattle associated with physiology, nutrition and disease, with particular reference to the interpretation of metabolic profiles. **World Review Nutrition Diet**, v. 35, n. 1, p. 172-235, 1980.

RULE, D. C.; BEITZ, D. C.; BOER, G.; LYLE, R. R.; TRENKLE, A. H.; YOUNG, J. W. Changes in hormone metabolite concentrations in plasma of steers during a prolonged fast. **Journal of Animal Science**, v. 61, n. 4, p. 868-875, 1985.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. p. 265.

SMITH, G. W.; CORREA, M. T. The effects of oral magnesium hydroxide administration on rumen fluid in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, n. 1, p. 109-112, 2004.

SOUZA, P. M.; BIRGEL, E. H.; ARAUJO, W. P.; TAVORA, J. P. F. Valores de referência da glicose plasmática de bovinos da raça Gir, Holandesa e Girolanda criados no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, p. 138, 1999. Suplemento.

SUCUPIRA, M. C. A. **Estudo comparativo de exames clínico-laboratoriais no diagnóstico de carência energética prolongada em garrotes**. 2003. 173 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TALKE, H.; SCHUBERT, G. E. Enzymatische harnstoffbestimmung in blut und serum in optischen test nach warburg. **Klinische Wochenschrift**, v. 43, n. 1, p. 174, 1965.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 158-161, 1969.

VAN SOEST, P. J. **Nutrition Ecology of Ruminants**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1982. 573 p.

WENZEL. H. **Vergleichende prüfung der methylenblauprobe, der resazurinprobe, des nitrittests und der glukosegärprobe in der klinischen pansensaftuntersuchung bei rind und schaf.** 1977. 94 p. Tese (Doutorado) – Faculdade Tiermedizin der Ludwig-Maximilians, Universidade de Monique, Monique, 1977.

WILLIAMSON, D. H.; MELLANBY, J.; KREBS, H. A. Enzymatic determination of D(-) β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. **Biochemistry Journal**, v. 82, n. 1, p. 90-96, 1962.