BRUNO MOURA MONTEIRO

Lipidograma e glicemia de búfalos leiteiros criados no Estado de São Paulo: influência de fatores fisiológicos e valores de referência

São Paulo
2011

BRUNO MOURA MONTEIRO

Lipidograma e glicemia de búfalos leiteiros criados no Estado de São Paulo: influência de fatores fisiológicos e valores de referência

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2011

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2455
FMVZ

Monteiro, Bruno Moura

Lipidograma e glicemia de búfalos leiteiros criados no estado de São Paulo: influência de fatores fisiológicos e valores de referência / Bruno Moura Monteiro. -- 2011.

183 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior.

1. Metabolismo. 2. Lipídeos. 3. Soro. 4. Glicose. 5. Plasma. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Lipidograma de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Estado de São Paulo: valores de referência e influência dos fatores etários, sexuais da gestação e do puerpério", protocolado sob o nº1477/2008, utilizando 580 (quinhentos e oitenta) búfalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, 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 em reunião de 01/10/08.

We certify that the Research "Lipid profile of buffaloes (*Bubalus bubalis*) bred in São Paulo state: reference values and influence of age, gender, gestation and puerperium", utilizing 580 (fifty hundred eighty) buffalos, protocol number 1477/2008, under the responsibility Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MONTEIRO, Bruno Moura

Título: Lipidograma e glicemia de búfalos leiteiros criados no Estado de São Paulo: influência de fatores fisiológicos e valores de referência

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Data: 08/07/2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior. Instituição: FZEA/USP .

Julgamento: APROVADO .

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani . Instituição: FMVZ/USP .

Julgamento: APROVADO .

Prof. Dr. Raul Franzolin Neto . Instituição: FZEA/USP .

Julgamento: APROVADO .

EPÍGRAFE

“O que se precisa para ser feliz? Trabalho e amor.”

(Sigmund Freud)

DEDICATÓRIA

Aos meus avôs, Heronides Gomes Moura (*in memoriam*) e Laura Amélia Magalhães Moura.

Aos meus pais, José Henrique Monteiro e Carmen Laura Moura Monteiro.

A minha cúmplice, Vívian Anijar Fragoso Rei.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Por todas as graças alcançadas. Obrigado pelo dom da vida, pelas pessoas boas colocadas no meu caminho, pela saúde e segurança em terras estrangeiras, e por ter conseguido concluir essa dissertação.

À minha família,

Pelo amor, força e estímulo dedicados sem medidas até hoje. Obrigado pelo lar que serviu de alicerce pra todas as minhas conquistas.

À Vívian Fragoso,

Pelo amor, carinho, atenção, dedicação, zelo, confiança e paciência irrestritas durante toda a nossa vida juntos. Obrigado por acreditar! Sem você nada disso seria possível. Essa vitória é metade sua... Te amo!

À família Fragoso,

Tanto a parte belenense como a paulista, obrigado pelo carinho, respeito, e por sempre me tratarem como um filho. Seu carinho foi fundamental durante esse tempo longe de casa.

Ao amigo Celso Scatena,

Pela amizade. Obrigado pela atenção, confiança e carinho durante todos os momentos dessa jornada. Ficar longe de casa e da família se torna um pouco mais fácil na companhia de um cristão verdadeiro.

À Dna. Dirce,

Pela amizade e carinho tão importantes no início da vida em São Paulo. Obrigado por ter me adotado no período de minha seleção para ingressar no mestrado.

Ao Prof. Rinaldo Batista Viana,

Pela confiança, orientação e amizade. Obrigado por continuar colaborando na construção da minha vida profissional, e por ter sido determinante na formação do Veterinário que sou.

Ao Prof. Eduardo Harry Birgel Junior,

Pela orientação e confiança depositadas em mim. Obrigado pelo conhecimento e experiências compartilhadas, e pela estrutura técnica e financeira, responsáveis pela realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Pietro Sampaio Baruselli,

Por servir de exemplo e modelo. Obrigado pela confiança para continuar trabalhando com búfalos, e fazendo ciência.

Aos Professores,

Enrico Lippi Ortolani, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Marcos Veiga dos Santos, Paulo Henrique Mazza Rodrigues, Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Francisco Palma Rennó e Ed Hoffman Madureira, por fazerem a diferença e servirem de exemplo.

Aos lobotomizados,

Fabio Celidonio Pogliani, Melina Marie Yasuoka, Raquel Fraga Silva Raimondo e Leandro Cavalcante Lipinski. Obrigado pela amizade e convívio. Pela indispensável ajuda na execução deste trabalho, e por terem proporcionado tantos momentos divertidos.

Aos amigos,

Camila, Laura, Juliana, Thales, Enoch, Dudu, Hubber, Leo, Carol Araújo, Fredão, Humberto, Bruna, Paulão, Mossoró, Carol Seino, Aline, Fernanda, Tio Chico, Marcelo, Eliza, Mariana, Danielle Yuri, Luciana Cunha, Aline Ameni, Fabiana Elias e Fernando Pípole, pelos bons momentos vividos durante o mestrado.

Aos alunos do PAE,

De Práticas Hospitalares em Buiatria e Clínica de Ruminantes que fui PAE. Obrigado pela paciência e confiança. E por terem colaborado na minha formação como docente.

Aos Professores da Universidade de São Paulo,

Pelas disciplinas oferecidas, e pelos conhecimentos compartilhados. Obrigado por me receberem em sua casa, me tratando como um dos seus.

Aos fazendeiros e funcionários,

José Carlos (Faz. Várzea Grande), César Kanashiro (Sítio Ribeira), Eduardo Dixo (Estância Alambari) e Dna. Wilma Ferreira Penteado (Faz. Santa Eliza), por terem colaborado com a realização desta pesquisa. A participação de vocês é essencial para que, juntos, consigamos desenvolver a agropecuária, e a bubalinocultura brasileira.

Ao Dr. Otavio Bernardes (Sítio Paineiras da Ingai),

Por disponibilizar sua fazenda, tempo, sabedoria e experiência para a execução desta pesquisa. Obrigado por fazer a diferença para a bubalinocultura nacional. Quisera mais criadores tivessem a curiosidade, interesse e dedicação para a produção animal.

Ao Dr. Nelcio Antônio Tonizza de Carvalho (Nelcião),

Pela amizade, atenção e paciência para a realização desta pesquisa. Obrigado também a toda equipe do Instituto de Zootecnia de Registro – Vale do Ribeira – SP.

À Henderson Ayres,

Pela ajuda, capricho e paciência, na realização da análise estatística deste trabalho. Obrigado também à Emiliana, pela força em parte da estatística.

Aos colaboradores,

Andreas Radke (Sítio Paineiras da Ingai), Danilo (Faz. Santa Eliza), Bastião (APTA/IZ) e Zé (Faz. Várzea Grande), pela enorme força durante as colheitas de sangue.

Às técnicas do laboratório,

Clara e Marli. Obrigado pela presteza e paciência na análise bioquímica de todas as amostras.

Aos funcionários do Hospital de Ruminantes,

Srs. Edson, Francisco, Luizinho e Dna. Maria, pela amizade e agradável convívio.

Às funcionárias da Biblioteca,

Dna. Elena e Elza. Muito obrigado pela atenção, paciência e presteza.

Aos funcionários da FMVZ,

Que de forma direta ou indireta colaboraram com a execução desta pesquisa.

Aos búfalos,

Que colaboraram com algo em torno de 16.416 mL de sangue colhido para que pudéssemos realizar esse trabalho. Desculpem as furadinhas...

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

Pela concessão da minha bolsa (processo nº 2008/07257-9) e auxílio pesquisa (processo nº 2009/08703-5), que foram indispensáveis tanto para minha estadia em São Paulo, como para que pudéssemos executar esse projeto de pesquisa.

RESUMO

MONTEIRO, B. M. **Lipidograma e glicemia de búfalos leiteiros criados no Estado de São Paulo**: influência de fatores fisiológicos e valores de referência. [Lipid and glucose profile of dairy buffaloes raised in São Paulo state: influence of physiological factors and reference values]. 2011. 183 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência dos fatores etários, sexuais, da gestação, do puerpério, da lactação e dos sistemas de criação nos constituintes do metabolismo lipídico e glicemia de búfalos. A análise bioquímica foi obtida por meio da determinação dos teores séricos de colesterol, triglicérides, β -hidroxibutirato (β -HBO), ácidos graxos não esterificados (NEFA), e teores plasmáticos de glicose. Também foi objetivo sugerir valores de referência para estes metabólitos. Foram utilizadas seis propriedades de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, e mestiços, todas localizadas no Estado de São Paulo. No total, foram colhidas amostras de soro e plasma de 635 animais, entre novembro de 2009 e julho de 2010. Para a avaliação da condição do estado geral dos animais, foi utilizada avaliação do escore de condição corporal (ECC) atribuindo notas de 1 a 5 somente para animais acima de 24 meses. Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2. Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analyse* do SAS. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Idade; Gestação; Lactação; Sexo; Puerpério; Sistema de Criação), Fazenda; Categoria; Número de Crias e ECC, assim como suas interações, foram utilizadas nos modelos estatísticos. Concluiu-se que os constituintes metabólicos foram consideravelmente influenciados pela idade, sexo, puerpério, lactação e sistema de criação, não sendo verificada influência relevante pela gestação de novilhas. Devido à grande quantidade de amostras estrategicamente colhidas, obtidas de diferentes realidades criatórias, também foi possível sugerir valores de referência para o lipidograma e glicemia de búfalos de diferentes idades, sexos, momentos gestacionais, fases do parto e períodos de lactação.

Palavras-chave: Metabolismo. Lipídios. Soro. Glicose. Plasma.

ABSTRACT

MONTEIRO, B. M. **Lipid and glucose profile of dairy buffaloes raised in São Paulo state: influence of physiological factors and reference values.** [Lipidograma e glicemia de búfalos leiteiros criados no Estado de São Paulo: influência de fatores fisiológicos e valores de referência]. 2011. 183 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The aim of this study was to analyze the influence of age, gender, pregnancy, puerperium, lactation and breeding systems in the constituents of lipid metabolism and glucose of buffaloes. The biochemical analysis was obtained by determining the levels of serum cholesterol, triglycerides, beta-hydroxybutyrate (β -HBO), non-esterified fatty acids (NEFA) and plasma glucose levels. It was also meant to suggest reference values for these metabolites. Were used six properties of buffaloes Murrah, Mediterranean, and crossbreed, all located in the São Paulo state. Were collected 635 samples of serum and plasma between November 2009 and July 2010. To assess the condition of the general state of animals was used to evaluate body condition score (BCS) by assigning scores from 1 to 5 only for animals over 24 months. The values of the arithmetic mean, standard deviation, standard error means, coefficient of variation, confidence interval (95%), and minimum and maximum values were calculated using the *Means* procedure of SAS version 9.2. Tests for normality of residuals and homogeneity of variances were performed using the *SAS Guide to Data Analysis*. Data were analyzed by ANOVA using the SAS procedure *Glimmix*. The group information (Age, Pregnancy, Lactation, Gender, Puerperium; Creation System), Farm, Category, Number of Offspring and BCS, as well as their interactions, were used in statistical models. It was concluded that the metabolic components were significantly influenced by age, gender, postpartum, lactation and breeding system, and is not verified by the relevant influence pregnant heifers. Due to the large number of samples strategically taken, obtained from different stock breeding, were also suggest reference values for serum lipids and glucose of buffaloes in different ages, genders, moments of pregnancy, stages of peripartum and lactation periods.

Keywords: Metabolism. Lipids. Serum. Glucose. Plasma.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
---------------------------	-----------

2 REVISÃO DA LITERATURA	27
--------------------------------------	-----------

2.1 PECULIARIDADES DA CRIAÇÃO DE BÚFALOS.....	27
---	----

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO DE RUMINANTES ..	29
---	----

2.3 VALORES DE REFERÊNCIA PARA O LIPIDOGRAMA DE BÚFALOS.....	42
--	----

3 MATERIAL E MÉTODOS	48
-----------------------------------	-----------

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS E COLHEITA DAS AMOSTRAS	48
--	----

3.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA REALIZAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS	49
--	----

3.3 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ECC)	52
--	----

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
------------------------------	----

CAPÍTULO 1 - LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS: INFLUÊNCIA DA IDADE E VALORES DE REFERÊNCIA

4 INTRODUÇÃO	57
---------------------------	-----------

4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
-----------------------------	----

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
----------------------------------	----

4.3 CONCLUSÃO.....	72
--------------------	----

CAPÍTULO 2 - LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS: INFLUÊNCIA DO SEXO E VALORES DE REFERÊNCIA

5 INTRODUÇÃO	75
---------------------------	-----------

5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
-----------------------------	----

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
----------------------------------	----

5.3 CONCLUSÃO.....	89
--------------------	----

CAPÍTULO 3 - LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS: INFLUÊNCIA DA GESTAÇÃO E VALORES DE REFERÊNCIA

6 INTRODUÇÃO.....	93
6.1 MATERIAL E MÉTODOS	94
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
6.3 CONCLUSÃO	106

CAPÍTULO 4 - LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS: INFLUÊNCIA DO PUERPÉRIO E VALORES DE REFERÊNCIA

7 INTRODUÇÃO.....	111
7.1 MATERIAL E MÉTODOS	112
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
7.3 CONCLUSÃO	127

CAPÍTULO 5 - LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS: INFLUÊNCIA DA LACTAÇÃO E VALORES DE REFERÊNCIA

8 INTRODUÇÃO.....	131
8.1 MATERIAL E MÉTODOS	132
8.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	135
8.3 CONCLUSÃO	146

CAPÍTULO 6 - LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS: INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE CRIAÇÃO

9 INTRODUÇÃO.....	151
9.1 MATERIAL E MÉTODOS	152
9.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	155
9.3 CONCLUSÃO	175

10 CONCLUSÕES.....	176
---------------------------	------------

REFERÊNCIAS.....	177
-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

Diferentemente do que se pode imaginar, o maior produtor de leite do mundo é a Índia, sendo que mais da metade desse leite é produzido por búfalas (FAO, 2009). Este país também ocupa o terceiro lugar na exportação mundial de carne, depois somente do Brasil e Estados Unidos, mas seguramente, num lugar onde as vacas são sagradas, só assumiu este posto por ser o maior produtor de carne de búfalo do planeta.

Estima-se que a produção de leite de búfalas no Brasil seja da ordem de 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 búfalas em 2.500 rebanhos. E que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país, que transformam anualmente 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados, gerando um faturamento bruto da ordem de U\$ 55 milhões aos laticínios e de cerca de U\$ 17 milhões aos criadores (BERNARDES, 2007).

No Brasil, o crescimento acumulado do rebanho bubalino, entre 1961 e 2005, foi de surpreendentes 1.806%, destacando-se ainda que, no mundo, segundo a FAO, o rebanho bubalino cresceu nos períodos de 1961-1980 e 1980-2005, respectivamente 38% e 43% e o bovino, 29% e 11%. Hoje o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009) estima que o rebanho nacional esteja em torno de 1.131.986 de búfalos.

O maior crescimento numérico do búfalo em relação ao bovino nos trópicos deve levar em conta não somente sua adaptação às características ambientais, mas a coincidência do fotoperíodo – atividade reprodutiva e vigor vegetativo das pastagens, em particular da pastagem nativa, no final do verão (sol e chuvas) e início do outono (sazonalidade reprodutiva favorável para o búfalo durante fotoperíodo negativo). Portanto, fica claro por que nas regiões tropicais a condição corporal da búfala é expressivamente melhor do que a apresentada pela bovina, e em consequência, a taxa de fertilidade é mais elevada para búfalos (ZICARELLI, 2001), podendo atingir até 97% com monta natural (BERNARDES, 2007).

O búfalo é originário de zonas tropicais, e atualmente, cerca de 90% dos búfalos são criados entre os dois trópicos, onde a umidade relativa e temperatura (dificilmente abaixo de 18°C) são elevadas, o período inverno-primaveril é seco, enquanto que o período outonal é normalmente quente e chuvoso. E diversamente do que se verifica com a raça bovina européia, a alta temperatura ambiental não interfere na sua homeostase e bem estar (ZICARELLI, 2001).

No Brasil, o maior conhecimento de suas potencialidades e características produtivas associada a diversas ações promocionais, notadamente a partir da década de 80, motivou acentuada expansão e disseminação da espécie para diversas regiões, inicialmente com o objetivo de ocupar os chamados “vazios pecuários”, regiões em que, por suas características naturais, a pecuária bovina não se desenvolvia bem. Posteriormente, com o avanço de explorações com características mais profissionais observou-se a introdução da bubalinocultura mesmo em regiões de maior tradição pecuária bovina, onde os búfalos passaram a ser explorados tanto para corte quanto para produção leiteira (BERNARDES, 2007).

O baixo preço pago pela carne de búfalo ao produtor é um entrave que está ficando para trás, pois tem se mostrado incompatível com o reconhecimento e o preço dados ao produto nas gôndolas dos mercados. O que já não acontece com o leite, que há tempos mantém seu preço em média duas vezes maior ao do bovino. Além disso, a força para tração também é utilizada, principalmente na agricultura familiar, o que caracteriza não somente sua docilidade, mas a tripla aptidão. E dependendo da taxa de lotação (UA/ha), ainda pode intervir beneficemente na proliferação de aves, anfíbios, vegetais e insetos da região, ou seja, preservar o meio ambiente (WIEGLEB; KRAWCZYNSKI, 2010).

Vale ressaltar que a carne de búfalo, de acordo com a ABCB, tem 40% menos colesterol, 12 vezes menos gordura, 55% menos calorias, 11% mais proteínas, e 10% mais minerais, quando comparada com a carne bovina, podendo até ser considerada a “carne vermelha light”. E seu leite possui 4,00% de proteínas, 8,00% de lipídios, 4,90% de lactose, 82,00% de água e 214mg% de colesterol total, tendo rendimento bem superior na indústria de laticínios.

Não somente pelas propriedades organolépticas de seus produtos, as necessidades nutricionais dos búfalos leiteiros provavelmente diferem dos bovinos leiteiros de países temperados, mas principalmente em decorrência de diferenças nas condições climáticas, na qualidade dos alimentos e também na própria eficiência de utilização dos nutrientes. Padrões de alimentação apropriados para búfalos não estão claramente definidos, havendo grandes diferenças (de até 40%) nos requerimentos nutricionais prescritos por vários padrões de alimentação (PAUL; LAL, 2010).

Sob mesmas condições nutricionais que os bovinos, os búfalos apresentam menor ingestão de matéria seca (medida em % do peso vivo), e melhor digestibilidade de matéria seca, fibra bruta e de forragens verdes e fenadas. Os búfalos possuem uma maior microbiota

ruminal, além de apresentarem maior aproveitamento de nitrogênio endógeno e melhor aproveitamento de alimentos mais pobres em proteína bruta (PAUL; LAL, 2010).

Levando-se em conta a composição química média das pastagens durante o ano nas regiões tropicais, pode-se afirmar que pela alta relação energia:proteína, a forragem destas regiões satisfazem melhor as necessidades das búfalas que a das bovinas. Com equivalência da energia produzida com o leite, dietas carentes em proteínas determinam nas bovinas uma perda de peso superior àquela que se verifica nas búfalas (ZICARELLI, 2001).

A recente intensificação das criações de búfalo determinou a prática de modernas técnicas de criação já usadas em gado de leite, como arraçãoamento artificial, redução da utilização de pastos, ordenha mecânica e a introdução da segunda ordenha (GRASSO et al., 2004). E junto com o aumento na produção de leite, veio a necessidade de alimentar essas fêmeas, em quantidade, qualidade e frequência adequadas para que o balanço energético fosse suficiente para manter as exigências produtivas (THOMAS et al., 2005).

O balanço energético é um dos fatores que mais impactam nutricionalmente o crescimento, saúde, lactação, e em especial, o desempenho reprodutivo (MONDAL; PRAKASH, 2004), pois os requerimentos energéticos são aumentados para a fecundação e manutenção da gestação (VAN SOEST, 1994), principalmente em animais de alta produção. Tradicionalmente, as mudanças no balanço energético podem ser monitoradas pela avaliação do escore de condição corporal (ECC) dos animais (MONDAL; PRAKASH, 2004). Porém, segundo Van Saun (2000), esse procedimento pode não ser uma ferramenta sensível o suficiente para avaliar todas as categorias animais.

O perfil metabólico sanguíneos tem sido amplamente utilizado para identificar e indicar distúrbios metabólicos e baixa produtividade (LEE et al., 1978). E é constatado que o estudo dos metabólitos sanguíneos pode ajudar a entender as peculiaridades do búfalo, nas mais diversas condições de criação, a fim de que se possa ajustar o manejo e a alimentação que os búfalos precisam (CAMPANILE, 1998; RENDINA et al., 2007; HAGAWANE et al., 2009).

Segundo Dirksen e Breitner (1993), os componentes bioquímicos sanguíneos mais comumente determinados no perfil metabólico representam as principais vias metabólicas do organismo, das quais a glicose, o colesterol e o betahidroxibutirato representam o metabolismo energético, além dos ácidos graxos não esterificados (VAN SAUN, 2000).

Na maioria dos países, os búfalos sempre foram criados sem os devidos cuidados zootécnicos, e submetidos a um manejo deficiente. Um dos grandes problemas relacionados com a produção de búfalos no mundo, é que ele foi originado e criado em países em

desenvolvimento (com exceção da Itália), onde as condições de manejo, alimentação, sanidade e de pesquisas muito deixavam a desejar, mascarando dessa forma o seu potencial fisiológico e o conhecimento de suas potencialidades como animal doméstico (VALE; RIBEIRO, 2005).

Além disso, as pesquisas já desenvolvidas precisam de uma adequada avaliação para serem utilizadas fora de sua região de origem, pois os animais criados sob diferentes condições ambientais, com diferentes alimentos e subprodutos disponíveis, e diferentes tipos de manejo, podem influenciar diretamente nos constituintes sangüíneos. O que mostra a necessidade de estudos da bioquímica sangüínea de cada região geográfica, os quais ajudariam a identificar possíveis erros nutricionais e/ou desordens metabólicas, contribuindo com a melhor adaptação do manejo nutricional de búfalos em relação aos diferentes estágios produtivos.

Portanto, a existência de poucas informações na literatura brasileira relativa ao metabolismo lipídico em ruminantes e, principalmente, a ausência, no Brasil, de pesquisas adequadamente planejadas para avaliar a influência de fatores indutores da variação no lipidograma de búfalos estimulou a elaboração da presente dissertação que visa, por meio da determinação dos teores séricos de colesterol, triglicérides, β -hidroxibutirato (β -HBO), ácidos graxos não esterificados (NEFA), e teores plasmáticos de glicose, analisar a influência dos fatores etários, sexuais, da gestação, do puerpério, da lactação, e dos sistemas de criação, bem como estabelecer os valores de referência para estes constituintes do metabolismo lipídico de búfalos criados no Estado de São Paulo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PECULIARIDADES DA CRIAÇÃO DE BÚFALOS

A domesticação do búfalo data de 3.000 a.C., na região da Mesopotâmia e nos Vales Hindus, e posteriormente na China, há 2.000 a.C. No entanto, a primeira importação para o Brasil somente aconteceu ao final do século XIX, quando alguns animais foram trazidos do Leste Asiático, passando pela Guiana Francesa e Suriname, até o Baixo Amazonas, região que hoje compreende os Estados do Pará, Amapá e Amazonas (COCKRILL, 1974).

Desde então as importações mantiveram-se expressivas, com animais oriundos de Roma (1895) por Vicente Chermont de Miranda, na Ilha do Marajó, e de outras origens (Egito 1902 e 1907; Trinidad 1906; Java 1907; Índia 1918 e 1921; e Itália 1920) e destinos (para São Paulo, em 1908 e 1920 da Índia, e 1948 da Itália; e Minas Gerais em 1919, da Índia), até as últimas importações de animais da Itália, em 1989.

Nesse momento o Brasil conhecidamente possuía rebanhos bubalinos nos Estados do Pará, Amapá, Amazonas, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina, e Mato Grosso (Pantanal). Mas hoje já é possível afirmar que existam criações de búfalos em todas as Regiões, Estados e climas brasileiros.

Obedecendo a heterogeneidade de um país continental, a bubalinocultura brasileira pode ser encontrada nas mais diversas formas de criação. Desde pequenas propriedades com exploração de subsistência pela agricultura familiar, normalmente leiteira, até grandes empreendimentos rurais de cadeia completa de carne e/ou leite, com cria, recria, engorda e beneficiamento de subprodutos, mais comumente laticínios. E animais sendo criados de forma ultra-extensiva (latifúndios com mais de 3.000 ha, com manejo somente para vacina contra febre aftosa), onde têm a possibilidade de resgatar comportamentos mais primitivos ou selvagens, até animais manejados várias vezes ao dia, chegando a valer algumas dezenas de milhares de reais.

Talvez pela sua mais recente domesticação em relação aos bovinos, ou pelos critérios de seleção adotados nos países onde o búfalo inicialmente cresceu e adaptou-se, esta espécie ainda pode ser vista e tratada como um animal de dupla aptidão, ou seja, com habilidades tanto para a produção de carne como para a de leite. Da mesma forma que vemos a búfala

recordista produtora de leite atingir 33 litros de leite no seu pico de lactação (concurso leiteiro na Índia), também vemos animais engordarem 1.100 g/dia somente à pasto, e atingir peso de abate aos 18 meses de vida (BERNARDES, 2007).

Para a bubalinocultura de corte, observamos um manejo muito semelhante ao dos bovinos de corte, no entanto, quando observamos o manejo dos búfalos de exploração leiteira, objeto de estudo deste trabalho, pudemos notar peculiaridades importantes que influenciarão diretamente nos resultados obtidos, e discussões realizadas. Portanto, as observações a seguir são baseadas no manejo observado nas fazendas durante o experimento, sempre tentando abranger dentro dos sub-grupos formados, o mais próximo do que se encontra à campo.

Ao momento do nascimento, diferentemente do bezerro bovino de leite, o bezerro bubalino leiteiro permanece com a mãe por um período de 7 a 15 dias, mamando o colostro à vontade. Somente depois deste período a vaca parida é introduzida na linha de ordenha. E durante um período médio de 3 meses, variando de acordo com o critério subjetivo de desenvolvimento e saúde do bezerro, esta vaca terá somente 3, dos 4 quartos da glândula mamária ordenhados, ficando 1 (encontra-se até 2 quartos) para o aleitamento do bezerro, quando somente então acontece o desmame. Porém, o bezerro é utilizado para o apoio (descida do leite) da glândula mamária até o final da corrente lactação, que geralmente dura entre 7 e 10 meses. Dependendo do sistema de criação, este bezerro recebe ou não suplementação alimentar, neste período que compreende o desmame até o final da lactação.

Após o desmame propriamente dito, ao fim do período de secagem da búfala, estes bezerros serão conduzidos para recria, onde serão selecionados para reposição de fêmeas da propriedade, futuros reprodutores ou animais para abate. No entanto, devido a peculiaridades fisiológicas, a reprodução destes animais só começa efetivamente após os 24 meses de idade (o parto mais precoce observado durante os 2 anos de experimento, em 6 fazendas, foi aos 35 meses de idade de uma novilha). Fato este que nos levou a considerar como bezerros os animais com 1 ano ou menos, animais entre 1 até 2 anos como pré-púberes, e adultos somente os animais com mais de 2 anos.

Para a diferenciação entre sexo, ampliamos as categorias bezerro, pré-púbere e adulto, para conter amostras não somente de fêmeas, mas também de machos. Porém, como para machos adultos só tínhamos animais para abate ou reprodutores, onde os reprodutores sempre em números substancialmente menores que as fêmeas (1 : 20-70), optamos por trabalhar com os machos de engorda, entre 25 e 72 meses, e fêmeas novilhas de mesma faixa etária, até no máximo 9 meses de gestação, portanto, sem efeitos de idade, parto ou puerpério.

Das novilhas que entraram em atividade reprodutiva para a cobertura, selecionamos fêmeas vazias e em diferentes estágios gestacionais. Convencionalmente nos referimos à gestação dos bovinos em terços, por terem uma gestação média de 270 dias. Já os bubalinos apresentam média de 310 dias de gestação, mas como também quisemos observar os efeitos do momento pré-parto, dividimos os grupos de gestação em novilhas vazias, e prenhes, até 3 meses, mais de 3 até 6 meses, mais de 6 até 9 meses, e mais de 9 até 1 dia antes do parto.

Vale ressaltar, que não somente as novilhas prenhes, mas os bezerros desmamados, machos e fêmeas de recria e engorda, e as vacas secas, normalmente encontram-se nos pastos menos favorecidos da fazenda. Isso porque os melhores e mais bem localizados e manejados pastos forrageiros estão sempre disponíveis para as búfalas leiteiras.

Por fim, uma peculiaridade, que guardadas as devidas proporções, o bovino Nelore também desfruta, mas que nos búfalos, perpassa pela exploração de leite, a dita rusticidade. É uma característica real, mas que só seria vantajosa se não fosse vastamente entendida como “produzir sem comida”. Logo, decidimos confrontar animais de genética semelhante, tratados sob condições de manejo semelhantes, com cuidados sanitários semelhantes, tendo como único diferencial a alimentação.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO DE RUMINANTES

Após entrar no aparelho digestivo dos ruminantes, o alimento é atacado por enzimas celulolíticas, amilolíticas, glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas produzidas por bactérias, protozoários e fungos, os quais são responsáveis pelos processos da digestão fermentativa ruminal. Desta maneira, basicamente todos os nutrientes têm sua biodisponibilidade alterada para poderem ser utilizados como energia por essa categoria de animais herbívoros.

Grande parte dos carboidratos alimentares disponíveis para a fermentação ruminal quer sejam na forma de açúcares, amido ou parede celular (celulose, hemicelulose e parte da lignina), são convertidos em ácidos graxos voláteis (AGV), também chamados de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Dentre os AGV produzidos em maior quantidade, e conseqüentemente, de maior importância, temos o acetato (C2), o propionato (C3) e o butirato (C4; CUNNINGHAM, 1999).

Nos ruminantes, grande parte da energia utilizada no seu metabolismo é obtida de ácidos graxos voláteis provenientes da fermentação ruminal, sendo que a síntese de glicose a partir dos ácidos graxos voláteis é dependente do perfeito funcionamento do fígado, uma vez que este órgão é o regulador da concentração de glicose no sangue e da oferta de glicose aos tecidos, sendo essencialmente o único local para a gliconeogênese (formação de glicose a partir de compostos carbônicos), ainda que exista uma pequena contribuição do córtex renal (HERDT, 2000).

O acetato (forma dissociada), ou ácido acético (forma em que é absorvido pelo epitélio ruminal), atinge a circulação sangüínea e é capturado pelo tecido adiposo principalmente presente na gordura subcutânea e na glândula mamária. Apesar do fígado também ter essa função em ruminantes, é bem mais expressivo em animais não-ruminantes (CUNNINGHAM, 1999). No citosol celular, esse AGV é utilizado para a formação de acetil-CoA, o precursor de cadeias com 16 a 18 carbonos, denominadas ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), também chamadas ácidos graxos livres (AGL), ou ainda, ácidos graxos não-esterificados (NEFA). Os AGCL, ou NEFAs, são esterificados ao composto alcoólico glicerol, dando origem aos triglicérides que compõe a gordura (KANEKO, 2008).

O propionato, apesar de também poder ser utilizado para a formação de AGCL nas mitocôndrias do fígado e para formação de glicerol no tecido adiposo, é essencialmente utilizado para a formação de glicose (KANEKO, 2008). Quando em excesso, a glicose é estocada no organismo sob a forma de glicogênio, um polímero altamente ramificado da glicose. Praticamente todos os tecidos animais podem sintetizar e armazenar glicogênio sob a forma de grânulos no citosol celular, sem que haja grandes interferências na osmolaridade de líquidos intracelulares. Assim, os níveis de glicogênio hepático e muscular são relativamente constantes, embora haja síntese e degradação contínuas reguladas por ação hormonal. Enquanto a insulina e os glicocorticóides favorecem o acúmulo de glicogênio, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e o glucagon possuem atividade glicogenolíticas (BEITZ, 1996). Ensaios *in vitro* mostraram que insulina e glicocorticóides aumentam as concentrações de leptina (CHILLIARD et al., 2001).

Já o butirato, é convertido no epitélio ruminal em betahidroxibutirato (β -HBO), e quando adentra a corrente sangüínea, pode ser utilizado como energia ou fonte de AGCL (KANEKO, 2008). Normalmente, o β -HBO plasmático provém da fermentação ruminal (MARUTA, 2005) uma vez que os ruminantes diferem, entre outros aspectos, dos demais monogástricos na medida em que grandes quantidades de corpos cetônicos alimentares são

liberados na veia porta. Segundo Heitmann et al. (1987), os produtos finais da fermentação de carboidratos, acetato e butirato, podem ser convertidos em acetoacetato e β -HBO durante a absorção pelo epitélio ruminal, sendo assim denominada a cetogênese alimentar. Os corpos cetônicos circulantes no ruminante são 4-5 vezes maiores que os encontrados em animais não-ruminantes.

As proteínas que atingem o rúmen também são alvo dos processos fermentativos. Sob ação das proteases, esses compostos carbônicos nitrogenados dão origem a peptídeos, que são absorvidos pelos microrganismos ruminais. Dentro das células microbianas, os peptídeos podem ser usados para a formação de proteína microbiana, ou degradados posteriormente para a produção de energia através das vias dos AGV. Mas para penetrar nesta via, os aminoácidos devem ser primeiramente, e de modo individual, desaminados, formando amônia e um esqueleto de carbono, sendo este último, transformado em algum dos principais AGV (CUNNINGHAM, 1999).

Exceção dessa regra são os aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (AACR) valina, leucina e isoleucina, que darão origem aos respectivos ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR) isobutirato (C4), isovalerato (C5) e 2-metilbutirato (C5). Esses AGVCR são indispensáveis para alguns micróbios ruminais que precisam desses compostos para sintetizar proteína para o crescimento microbiano, como é o caso de algumas bactérias celulolíticas importantes (CUNNINGHAM, 1999).

Dentre os lipídios considerados importantes para o organismo animal devem ser citados e destacados os AGCL, os triglicérides, os fosfolipídios, o colesterol e os corpos cetônicos. Os lipídios exercem muitas funções, tais como estoque e reserva de energia (essencialmente sob forma de triglicérides, tanto visceral quanto subcutaneamente, dependendo da espécie), composição da membrana lipídica (fosfolipídios e colesterol), além de precursor de esteróides e ácidos biliares (colesterol), isolamento térmico (triglicérides), e isolamento elétrico (KANEKO, 2008).

Os primeiros estudos do metabolismo ruminal de lipídios evidenciaram que os lipídios ingeridos na alimentação, durante os processos de fermentação pelos microrganismos ruminais, sofrem duas importantes transformações: lipólise e biohidrogenação (JENKINS, 1993). Logo após a ingestão, os lipídios esterificados (triglicérides) presentes no volumoso são hidrolisados por lipases microbianas, formando AGCL e glicerol. O glicerol formado por meio da lipólise é fermentado rapidamente produzindo como principal produto o AGV propionato. Os AGCL, também denominados de ácidos graxos insaturados possuem meia

vida relativamente curta no conteúdo ruminal, pois rapidamente sofrem biohidrogenação, a qual reduz o número de duplas ligações, determinando um produto final mais saturado. A hidrogenação da dieta por microrganismos do rúmen enriquece o quimo duodenal com ácidos graxos saturados, os quais são então absorvidos e depositados nos tecidos corporais (JENKINS, 1993).

Chegando ao intestino delgado, o conteúdo alimentar é banhado pela bile, secreção formada por micelas compostas de ácidos biliares, fosfolipídios e colesterol. Emulsificadas, as gorduras contidas no bolo alimentar tornam-se parte dessas pequenas micelas, para que então possam sofrer ação das enzimas lipase pancreática e colesterol esterase produzidas no pâncreas. Ácidos graxos, monoacilgliceróis e colesterol, resultados do ataque dessas enzimas, serão incorporados aos lipídios da borda em escova do intestino delgado, onde, intracelularmente, serão usados para resintetizar triacilgliceróis (KANEKO, 2008).

Também chamado de triacilglicerol, o triglicéride é a principal forma de estoque dos AGCL, na qual três moléculas de AGCL são esterificados ao glicerol. Os triglicérides são menos solúveis que os AGCL, e também devem se ligar a proteínas para serem transportados pelo sangue. Em razão da insolubilidade em água, os lipídios não exercem força osmótica no sistema biológico podendo ser estocados em grandes quantidades no tecido adiposo. Ainda que a maioria das células consiga sintetizar triglicérides, o fígado, tecido adiposo, glândula mamária (importante na produção da gordura do leite) e intestino delgado são os mais adaptados para esta síntese. Os AGCL são considerados os tijolos na síntese dos triglicérides, e podem ser encontrados disponíveis tanto ligados a albuminas no plasma, como nos locais de síntese (KANEKO, 2008).

Os insolúveis glóbulos de gordura formados nas células intestinais são então ligados a apolipoproteínas (proteínas contidas nas lipoproteínas), e extrusados pela membrana basolateral até o interstício das células intestinais na forma de lipoproteínas, neste momento, denominadas quilomícrons. Estas moléculas atingem os capilares linfáticos, e não os capilares sanguíneos, portanto, diferentemente da maioria dos outros nutrientes, a maior parte dos lipídios absorvidos passam intactos ao redor do sistema portal e pelo fígado (bypass pelo fígado), alcançando diretamente o átrio direito, e a maioria dos outros tecidos, por conseguinte (KANEKO, 2008).

O quilomícron circulante absorvido no intestino é atacado pela enzima lipoproteína lipase (LPL), que hidrolisa boa parte do triglicéride ligado às apolipoproteínas carreadoras. A maioria do AGCL desesterificado é absorvido pelas células teciduais, e o glicerol é liberado

na circulação. A LPL está presente na superfície das células endoteliais de muitos órgãos e tecidos, mas está em maior quantidade no tecido adiposo, coração, musculatura esquelética e glândula mamária (KANEKO, 2008). As pesquisas desenvolvidas por Hocquette e Bauchart (1999) indicaram que 40% dos NEFA têm origem a partir da mobilização de gordura dos tecidos adiposos e 60% foi originado da hidrólise dos triglicérides circulantes através da ação da LPL. Esta enzima é considerada por esses autores fundamental na regulação do metabolismo lipídico, sendo encontrada em células endoteliais e atuando em triglicérides associados aos quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) presentes no plasma (KANEKO, 2008).

Outro importante hormônio indicador de tecido adiposo parece ser a leptina. Em revisões sobre o assunto, Chilliard et al. (2005) apontaram sua correlação positiva com a gordura corporal e o balanço energético, ou nível de alimentação. E mostraram que das variações nas concentrações de leptina, entre 35-50% seriam explicados pela gordura corporal, e entre 15-20% seriam devido ao nível de alimentação (CHILLIARD et al., 2001).

Após ação da LPL, a molécula remanescente de quilomícron, que agora contém somente parte de seus triglicérides, algumas de suas apolipoproteínas e colesterol, finalmente chega ao fígado, onde é absorvida e hidrolizada pelos hepatócitos, os quais resintetizam estas partículas, tanto para a produção de colesterol e bile, como para a síntese de novas e diferentes lipoproteínas carreadoras de triglicérides, agora chamadas VLDL (KANEKO, 2008). Essa lipoproteína tem sua produção estimulada pela alta ingestão de carboidratos, sendo associada ao aumento nos níveis de insulina, mas sua síntese é comprometida pela presença de maiores concentrações de glucagon (GIBBONS, 1990).

As outras lipoproteínas presentes no plasma dos ruminantes podem ser classificadas em: lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e VLDL, variando de maior densidade, quando têm proporcionalmente grande quantidade de proteínas, até a menor densidade, quando carregam basicamente lipídios, como é o caso dos quilomícrons e do VLDL (KANEKO, 2008).

O HDL é responsável pela captação das partículas livres de colesterol nos tecidos periféricos, graças a lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), uma apolipoproteína que converte o colesterol livre em éster de colesterol. Essa conversão promove gradientes de concentração que facilitam a captação de colesterol livre dos tecidos periféricos. Já o LDL e o IDL são basicamente VLDL remanescentes, semelhantes ao quilomícron após ação da LPL

dos tecidos. Apesar das HDL representarem mais que 80% do total das lipoproteínas circulantes no plasma dos bovinos, observa-se que o transporte dos triglicérides é realizado pelas lipoproteínas de menor densidade, principalmente, quilomícrons e VLDL (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; KANEKO, 2008).

Obtêm-se mais facilmente o colesterol pela ingestão de produtos de origem animal, mas no caso de bovinos desmamados, este precisa ser sintetizado, e o principal órgão de síntese e catabolismo de colesterol é o fígado. O colesterol é o precursor de hormônios esteróides, vitamina D e ácidos biliares, e é constituinte de membranas celulares e micelas biliares. Portanto, também pode ser produzido, em pequenas quantidades, por órgãos esteroideogênicos endócrinos, como a córtex adrenal, testículos, ovário e placenta (KANEKO, 2008).

O principal substrato para a formação do colesterol, como no caso dos AGCL, é a acetil-CoA. Em casos de ingestão de alimento, aumento de insulina, aumento da leptina (CHILLIARD et al., 2001; CHILLIARD et al., 2005), baixo glucagon, e baixo adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, ou seja, quando o organismo está em desfosforilação (menor desdobramento hidrolítico do ATP por ação da adenilciclase), a produção do colesterol é estimulada, podendo também estar aumentado na presença de maiores concentrações de hormônio da tireóide. Em contrapartida, momentos de inanição fisiológica (periparto) ou patológica (doença), jejum ou diabetes, quando se verifica a insulina e a leptina diminuídas, e glucagon e AMPC aumentados, ou seja, momento em que o organismo está em fosforilação, a produção de colesterol fica comprometida, fenômeno que também é observado com aumentos nas quantidades de glicocorticóide, endógenos ou exógenos (KANEKO, 2008).

Dependendo da espécie animal, a síntese dos ácidos graxos pode ocorrer em diversos tecidos, porém, somente o fígado, o tecido adiposo e a glândula mamária o produzem em larga escala, sendo que o fígado desempenha papel fundamental no metabolismo dos lipídios. O glicerol utilizado para a produção de triglicérides pode ser produzido no fígado, ou absorvido do plasma, sendo abundante na corrente sanguínea somente em situações de ativa lipólise, que ocorre no tecido adiposo. Quando a glicose é abundante no plasma, e AGCL está sendo formado a partir de glicose, o glicerol pode ser sintetizado tanto no fígado como também no tecido adiposo e glândula mamária, ou seja, lipogênese hepática a partir da glicose (KANEKO, 2008).

Momentos semelhantes de desfosforilação, quando os substratos alimentares são abundantes, até a musculatura esquelética pode servir como estoque energético. O aumento da insulina promove a captação de glicose e aminoácidos, havendo a formação de glicogênio muscular. No entanto, este glicogênio não está imediatamente disponível para aumentar as concentrações de glicose, sendo destinado primeiramente ao metabolismo do músculo. Em certas ocasiões, como na fosforilação, esta reserva pode indiretamente fornecer substrato para a gliconeogênese hepática, como com o ácido láctico e esqueletos carbônicos de aminoácidos. Mas além do glucagon, os glicocorticóides são um importante hormônio na regulação da gliconeogênese hepática, mas este último o faz a partir dos substratos musculares (CUNNINGHAM, 1999).

Foi discutido até aqui somente sobre os momentos metabólicos favoráveis para os ruminantes, com ingestão de alimento, desfosforilação e balanço energético positivo (BEP). Porém, no decorrer do período de exploração zootécnica desses animais, nos deparamos com verdadeiros gargalos metabólicos, onde sabidamente os ruminantes se deparam com momentos críticos nutricionalmente, como é o caso do desmame para bezerros, final da gestação, principalmente para novilhas, período de parto, ou período de transição, e pico de lactação para grandes produtoras de leite incorretamente alimentadas.

Bezerros recém-nascidos, tanto de corte como de leite, normalmente são alimentados com leite até pelo menos um mês de vida. Mas na pecuária leiteira, quanto menos o bezerro mamar, melhor para o produtor. Portanto, tende-se a desmamar este bezerro o mais cedo possível (ANDERSON et al., 1987), o que com os bezerros búfalos “comedores de mozzarella”¹ não é tão diferente. Naturalmente essa mudança metabólica iria acontecer, mas estes bezerros são forçados a substituir a glicose, seu principal substrato energético básico oriundo do leite, bem mais rápido do que deveriam.

Quigley et al. (1991a), trabalhando com bezerros de leite suplementados com feno e grãos a partir dos 3 dias de vida, e desmamados aos 28 (tratamento 1) e aos 56 dias de experimento (tratamento 2), observaram uma menor concentração de glicose plasmática ($P<0,01$) nos animais do tratamento 1 ($4,33 \times 5,06$ mmol/L), no período entre 28 e 56 dias. No entanto, neste mesmo período, devido a maior ingestão de alimento pós-desmame ($P=0,004$), os mesmos animais apresentaram valores de β -HBO bem maiores ($P<0,01$) que os bezerros não desmamados ($1,11 \times 0,42$ mmol/L), o que caracteriza maior cetogênese alimentar, em substituição ao substrato energético.

¹ Termo coloquial comum à bubalinocultura brasileira, referente aos bezerros búfalos que são mantidos em aleitamento a ponto de prejudicar substancialmente a produção leiteira das búfalas.

Mudanças no “status” endócrino e diminuição no consumo de matéria seca durante o final da gestação levam à mobilização de gordura do tecido adiposo, e de glicogênio do fígado. Durante as últimas três semanas de gestação a demanda por nutrientes pelo feto e placenta atinge o nível máximo (BELL, 1995), no entanto o consumo de matéria seca diminui em 10 a 30% (HAYIRLI et al., 2002). A queda do consumo próximo ao parto é uma característica de várias espécies de mamíferos (FRIGGENS, 2003).

Segundo Grummer (1995), o período de transição, que se estabelece entre três semanas antes do parto e três semanas após o parto, é o período mais crítico na saúde de animais produtores de leite, pois a maioria das doenças infecciosas e alterações metabólicas ocorrem neste período. As concentrações plasmáticas de glicose permanecem estáveis ou diminuem um pouco durante o período de transição pré-parto, aumentam muito durante o parto e diminuem imediatamente no pós-parto (VASQUEZ-ANON et al., 1994). O aumento das concentrações de glicose ao parto pode ser devido ao aumento das concentrações de glucagon e glicocorticóides, que promovem a depleção dos estoques de glicogênio hepático e a gliconeogênese a partir de aminoácidos, respectivamente (GRUMMER, 1995).

Os ácidos graxos não-esterificados aumentam duas vezes ou mais entre 2 e 3 semanas pré-parto e 2 e 3 semanas após o parto (GRUM et al., 1996), e elevam-se rapidamente no dia do parto, provavelmente devido ao estresse decorrente desse momento, e diminui rapidamente após o parto, mas mantendo níveis superiores àqueles antes do parto (NRC, 2001).

Em revisão mais recente sobre metabolismo de ruminantes, Chilliard et al. (2005) descrevem que nesse período do periparto, as concentrações de leptina se mantêm estáveis até 1 mês antes de parto, começam a diminuir até atingir os valores mais baixos 1 semana antes de parto, e só começam a aumentar novamente nas primeiras 3-4 semanas pós-parto, porém só atingem seus valores normais no final da lactação.

A leptina parece funcionar como um maestro para o metabolismo, permitindo gastar quando o animal se alimenta mesmo tendo reservas lipídicas (anabolismo), ou entrando em economia quando o animal entra em fastio (catabolismo). Nesse período de transição da gestação para a lactação, não só a leptina diminui, mas a insulina tem sua sensibilidade diminuída, ou seja, hipoleptinemia gerando nos tecidos um quadro de resistência à insulina. Além disso, aumenta os glicocorticóides (maior lipólise) e diminui os hormônios da tireóide (hipotireoidismo temporário), melhorando assim a eficiência do metabolismo. (CHILLIARD et al., 2005)

No início da lactação, a taxa de aumento na produção de leite excede ao de consumo de matéria seca, resultando em balanço energético e protéico negativo (BEN), tornando viável o aumento do nível de energia na dieta pelo uso de lipídios, importante na fase inicial da lactação, quando o consumo de alimentos é limitado pelo estresse pós-parto (15% em média), evitando, assim, a perda de peso, o balanço negativo de nutrientes e, conseqüentemente, a redução da produção total de leite na lactação (BUTLER; CANFIELD, 1989).

Nesse período, ocorre quase total supressão da lipogênese, devido aos baixos níveis de insulina plasmática e a diminuição da utilização de glicose ou acetato em razão da baixa resposta do tecido adiposo a insulina. Mostrando que o início da lactação é caracterizado por um moderado grau de resistência a insulina no tecido adiposo e muscular, portanto, promovendo a mobilização de NEFA e aminoácidos e evitando o uso de glicose (VERNON; TAYLOR, 1988).

Semelhante ao bovino leiteiro, na primeira fase de lactação (cerca dos primeiros 50 dias), na búfala também se registra uma menor ingestão de matéria seca que resulta numa perda de peso. Vale lembrar que tal fenômeno é resultante de um comportamento ancestral da vida selvagem que se observa, de forma mais ou menos intensa, em todos os animais domésticos. Graças a isto as espécies puderam sobreviver: para poder proteger sua prole dos predadores; a fêmea limitava seu deslocamento e, portanto, a busca de alimentos, apesar das exigências nutricionais no pós-parto aumentarem dia-a-dia. Este comportamento favoreceu a sobrevivência dos indivíduos que tinham uma maior eficiência de utilizar processos catabólicos que maximizavam a utilização das reservas corpóreas. Ao selecionar os indivíduos com maior predisposição para galactopoiese, o homem acabou também por escolher os indivíduos que melhor utilizavam as reservas acumuladas durante o período seco (ZICARELLI, 2001).

Quando a oferta de precursores de glicose, incluindo o ácido propiônico e aminoácidos, é grande, a produção de glicose pode exceder as demandas metabólicas, sendo este excesso de glicose estocado no fígado como glicogênio. Durante períodos nos quais as necessidades metabólicas de glicose sejam grandes, o fígado pode mobilizar glicose a partir do glicogênio suprimindo as necessidades corporais. Porém, a quantidade de glicogênio estocado no fígado é relativamente pequena para suprir as demandas metabólicas da vaca (HERDT, 2000).

Particularmente, durante a lactação as exigências de glicose para a síntese de lactose do leite são grandes. Segundo Kronfeld et al. (1968), são necessárias 72 gramas de glicose

para que a glândula mamária sintetize 1 litro de leite, podendo, em certas circunstâncias, 70 a 90% do total de glicose disponível serem utilizados para a síntese da lactose do leite. Nestas condições existe um sério risco do animal entrar em hipoglicemia e, a seguir, em cetose que pode ser inclusive fatal (PAYNE; PAYNE, 1987; HERDT, 2000).

Para vacas em lactação, o volume de leite produzido é quase que totalmente dependente da quantidade de lactose sintetizada pela glândula mamária. O volume de leite formado é um fenômeno osmótico, e a lactose é a partícula molecular predominante no leite. O precursor básico da lactose é a glicose, no entanto, fêmeas grandes produtoras de leite drenam grande quantidade de glicose plasmática, que vem quase que integralmente da gliconeogênese (KANEKO, 2008).

Nessas condições, rapidamente as reservas de glicogênio se esgotam, sendo a gordura corporal mobilizada através do processo de lipólise para suprir o metabolismo energético. Este processo envolve a quebra de triglicérides das reservas de gordura corporal em glicerol e ácidos graxos não esterificados, que são transportados para o fígado e servem como fonte de energia (PAYNE; PAYNE, 1987). Após a lipólise, o glicerol assume papel importante na gliconeogênese (LOMAX; BAIRD, 1983).

Cerca de 90% da glicose circulante em ruminantes é originária da gliconeogênese hepática, a qual é realizada a partir de substratos glicogênicos como o ácido propiônico, aminoácidos, lactato e glicerol. Menos de 10% da glicose utilizada no metabolismo é absorvida do intestino (KANEKO, 2008).

A síntese a partir de precursores como o ácido propiônico produz 50% do total da glicose (PAYNE; PAYNE, 1987) e em algumas condições pode ser responsável por até 65% desse total (HERDT, 2000), se tornando a principal via para a síntese deste composto energético. Os aminoácidos glicogênicos (aspartato, alanina, glutamina, etc.) contribuem entre 25% e 30% da glicose neoformada (BERGMAN, 1973) e o ácido láctico com 15% dessa glicose (PAYNE; PAYNE, 1987). O glicerol proveniente da lipólise e o lactato oriundo da fermentação anaeróbica ou de fonte digestiva, também podem gerar glicose, porém em menores proporções (MARUTA, 2005). O metabolismo dentro dos tecidos corporais tais como o músculo, produz grandes quantidades de ácido láctico, especialmente durante exercícios e este é resintetizado para glicose no fígado. De maneira semelhante, a quebra de proteínas musculares produz aminoácidos glicogênicos, os quais servem como substrato para a síntese de glicose no fígado (PAYNE; PAYNE, 1987).

A síntese e o catabolismo dos triglicérides é sensivelmente regulada por hormônios, especialmente glucagon, catecolaminas, insulina (KANEKO, 2008) e leptina (CHILLIARD, et al., 2001). Os dois primeiros aumentam o AMPc intracelular, e a insulina tende a diminuí-lo, apesar desta ter um efeito independente da presença do AMPc. Em condições de alto glucagon e baixa insulina, como no fastio, a enzima lipase hormônio-sensível (LHS) está ativa, promovendo lipólise. O que faz com que não haja síntese de gordura, evitando o desperdício (KANEKO, 2008).

Ácidos graxos de cadeia longa liberados do tecido adiposo durante a lipólise circulam como NEFA, sendo a principal fonte de energia para a vaca durante esse período. A concentração de NEFA no sangue reflete a magnitude da mobilização do tecido adiposo (PULLEN et al., 1989), portanto com o aumento do balanço energético negativo, mais NEFA é liberado do tecido adiposo, aumentando a sua concentração no sangue.

Durante a lipólise, NEFA e glicerol atingem o fígado pela circulação sangüínea e, dependendo do comportamento hormonal do organismo em reflexo ao balanço energético, podem, dentro dos hepatócitos, ser recombinados à triglicérides novamente, para então serem exportados via VLDL (KANEKO, 2008). Os triglicérides produzidos no intestino representam 65% do total dos triglicérides circulantes, enquanto que os produzidos no fígado responderam com 35% do total (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

O fígado secreta lipídios em várias formas incluindo corpos cetônicos e lipoproteínas, sendo a disponibilidade das VLDL fundamental para o transporte eficiente desses triglicérides formados no fígado. O fato deste grupo de lipoproteínas produzidas nos bovinos ser muito menor do que a encontrada em primatas e roedores explica porquê o fígado de bovinos, especialmente àquele de bezerros alimentados com dietas altamente lipídicas, vacas em final de gestação ou em lactação, não conseguir transportar os triglicérides, ou seja, em última análise, não conseguir reciclar de forma eficiente grandes quantidades de NEFA. Nestes casos, tais animais acumularão vesículas de triglicérides nos hepatócitos, e desenvolverão esteatose hepática, ou fígado gordo (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

No fígado, a enzima determinante na formação de triglicérides parece ser a fosfatidato fosfohidrolase. Esta enzima é estimulada pela simples passagem de NEFA ligado a albumina pelo fígado, mas pode ser inibida pelo aumento das quantidades de AMPc intracelular, quando o glucagon está aumentado, ou quando a insulina diminuída. Isso elucida um pouco mais da etiopatogenia da esteatose neste órgão, pois após um momento de fastio ou anorexia fisiológica, como no período de transição, haverá grande quantidade de NEFA no fígado para

suprir as necessidades energéticas daquele momento. E quando essa vaca voltar a se alimentar normalmente, e a concentração de insulina voltar a aumentar, dependendo da severidade do BEN, teremos a formação de gordura nos hepatócitos desenvolvendo o fígado gordo. Animais com deficiência da vitamina colina também tendem a desenvolver esteatose hepática mais facilmente (KANEKO, 2008).

Em condições de lipólise, quando as concentrações de glucagon estão altas e as de insulina baixas, o NEFA liberado atinge o fígado, passa pelo citoplasma dos hepatócitos e entra nas mitocôndrias, sendo oxidado para formar acetil-CoA. Nessas condições, está presente no citoplasma a enzima carnitina aciltransferase I (CAT I), que catalisa a entrada do NEFA na mitocôndria para sua oxidação. Essa enzima é inativada pelo metilmalonil-CoA, um metabólito do propionato, que está presente somente durante a lipogênese (KANEKO, 2008).

Após a entrada do acetil-CoA na mitocôndria, permitida somente na presença da CAT I, o mesmo é condensado ao oxaloacetato, um composto do Ciclo de Krebs (Ciclo do Ácido Cítrico ou Ácido Tricarboxílico), formando citrato. Somente como citrato os produtos da lipólise podem ingressar no Ciclo de Krebs e colaborar com a formação de energia na forma de glicose. Porém, o acetil-CoA formado gera somente CO₂, não tendo capacidade, sozinho, de produzir glicose. O oxaloacetato não pode ser produzido em situação de ausência de propionato, precursor da glicose, portanto, precisa ser devolvido ao ciclo de Krebs (CUNNINGHAM, 1999).

A partir do momento em que a quantidade de acetil-CoA produzida pela presença de NEFA sobrepujar a quantidade de oxaloacetato das mitocôndrias hepáticas, o acetil-CoA é então direcionado para a Via da β -Oxidação, sendo recondensado em acetoacetato, precursor dos corpos cetônicos β -HBO e acetona (CUNNINGHAM, 1999), onde cerca de 65% do acetoacetato produzido acaba se transformando em β -HBO (MARUTA, 2005). Vale ressaltar que em condições normais, cerca de 70% dos corpos cetônicos circulantes são produzidos no rúmen (cetogênese alimentar), e somente 30% produzido pelo fígado (cetogênese metabólica; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

O aumento de corpos cetônicos, que pode ser induzido pela infusão de acetoacetato ou β -HBO, inibe a gliconeogênese, causando aumento nas concentrações de insulina e conseqüente diminuição nas concentrações de glicose plasmáticas. Essa maior disponibilidade de energia alternativa inibe o catabolismo muscular para esta formação de glicose a partir de aminoácidos. Efeito semelhante também é visto nos menores níveis de NEFA, pois com o aumento da insulina, as taxas de lipólise tendem a diminuir (KANEKO, 2008).

Apesar de os corpos cetônicos serem um dos indicadores para o BEN, estes são muito bem utilizados pelo organismo dos ruminantes. Em torno de 3 a 4% do dióxido de carbono expirado por vacas alimentadas é oriundo de queima de corpos cetônicos, enquanto que em ovelhas prenhes anoréxicas essa taxa pode atingir os 30%. O β -HBO pode ser um precursor da gordura do leite. E o coração e o rim têm grande capacidade de utilizar corpos cetônicos como fonte de energia. Sendo este último a principal via de excreção quando estão aumentados na circulação, podendo atingir concentrações maiores que do plasma em situações de cetogênese metabólica severa, sendo também eliminadas pela respiração (KANEKO, 2008).

A demanda do feto por glicose é alta, e a placenta se encarrega de transportar glicose da mãe para o feto, podendo ocorrer hipoglicemia, dependendo da quantidade de glicose materna. A produção de corpos cetônicos decorrentes da lipólise equilibra a demanda energética da mãe. Além disso, a permeabilidade da placenta ao acetoacetato e ao β -HBO materno é baixa, não podendo estes, servir como principal fonte de energia do feto. Ovelhas com gestação gemelar tendem a sofrer mais dessa hipoglicemia, devido a maior proporção de massa corporal cordeiros:ovelha (KANEKO, 2008).

Atualmente, as vacas leiteiras são selecionadas para permanecer no rebanho, mais pela produção de leite do que qualquer outro motivo. Assim, por muitas gerações, as vacas de leite foram selecionadas para ter uma glândula mamária agressiva metabolicamente. Esta seleção dá prioridade para a glândula mamária que produzir a maior quantidade de leite, com preocupações secundárias para as conseqüências metabólicas ao resto do organismo animal. Não é surpresa, portanto, que esta glândula mamária consiga retirar glicose do sangue mais rápido do que o fígado consiga repô-la, o que leva um animal supostamente bem alimentado à hipoglicemia. As baixas concentrações de glicose desencadearão a produção de corpos cetônicos, o que poderá levar esta vaca a um quadro de cetose (BAIRD, 1982).

A vaca leiteira de alta produção tem a capacidade de ativar eficientemente seus mecanismos catabólicos. Sabe-se que durante o período no qual a capacidade de ingestão diária é reduzida, o animal pode consumir suas reservas perdendo até 1 kg de peso por dia, o que lhe permite atender a um déficit de até 20-30% de suas necessidades sem comprometer a produção. A búfala possui um hábito catabólico que é menos pronunciado que nas bovinas de alta produção. Seu metabolismo lipídico direcionado a acumular reservas para eventuais períodos de escassa disponibilidade forrageira (típico de animais com origem em climas excessivamente quentes ou excessivamente frios) favorece seu bem estar em prejuízo da

produção leiteira (ZICARELLI, 2001), o que ainda faz com que o búfalo seja visto como animal de dupla aptidão (VERDURICO, 2010).

Vale dizer, porém, que a búfala que produz mais de 4.000 kg possui uma capacidade catabólica mais acentuada e, com uma mesma dieta, se destaca no grupo por valores mais baixos de condição corporal (ZICARELLI, 2001).

2.3 VALORES DE REFERÊNCIA PARA O LIPIDOGRAMA DE BÚFALOS

A revisão de literatura compilada a seguir, tem como principal objetivo descrever os valores numéricos já descritos nacional e internacionalmente sobre metabolismo lipídico de búfalos, nas suas diversas fases de produção. Essa compilação consiste em sintetizar as publicações utilizadas para os parâmetros metabólicos que relevamos nessa dissertação, dando enfoque às influências da idade, sexo, gestação, puerpério, lactação, e sistema de criação em búfalos.

Avaliando a influência da utilização de suplemento vitamínico e mineral (aditivo) acrescido ao leite e a ração, na bioquímica sanguínea de bezerros búfalos, Verdurico (2010) realizou experimento com animais recém-nascidos, até 4 meses de idade, como parte de sua dissertação. No grupo controle e no grupo que recebeu aditivo, observou valores de 2,76 e 3,09 mmol/L de colesterol, 0,24 e 0,25 mmol/L de β -HBO, e 6,16 e 6,28 mmol/L de glicose, respectivamente, sem diferenças significativas entre os grupos.

Mondal e Prakash (2004) acompanharam o comportamento de metabólitos sanguíneos de fêmeas em crescimento, dos 6 aos 20 meses de vida. Fazendo colheitas quinzenais durante um ano, nos mesmos animais, os pesquisadores observaram que os valores de NEFA decresceram de aproximadamente 250 até 100 μ mol/L, e que os valores de glicose de 3,33 para 1,39 mmol/L. Ambos tendo uma correlação significativamente negativa com o peso corporal ($r = -0,995$ e $-0,835$, $P < 0,01$).

Em novilhas pré-púberes de 16 meses suplementadas com ração (grupo vazia), mais promotor de crescimento (grupo hormônio) ou esferas de chumbo no útero (grupo chumbo), Marques et al. (2004) verificaram concentrações de 1,53, 1,62 e 1,65 mmol/L de colesterol, e médias de glicose entre 5,63, 5,49 e 5,88 mmol/L, para os respectivos grupos ($P > 0,05$).

Também trabalhando com novilhas vazias, mas estas entre 24 e 36 meses de idade, Haldar e Prakash (2007) avaliaram o efeito de 9 meses de aplicação de fator liberador de hormônio do crescimento (GRF) nos metabólitos sanguíneos. Durante os 12 meses de avaliação, tanto o grupo tratado como o grupo controle apresentaram valores de glicose entre 2,5-4,0 mmol/L ($P=0,08$). Já os valores de NEFA, que se apresentavam iguais ao início do experimento, variaram ($P<0,01$) entre 75-100 $\mu\text{mol/L}$ para o grupo controle, e entre 100-150 $\mu\text{mol/L}$ para o grupo GRF.

Na mesma faixa etária, El-Deeb e Younis (2009) descreveram o perfil lipídico de animais sadios e de animais doentes naturalmente infectados pelo protozoário *Theileria annulata*, acometidos por anemia e estresse oxidativo. Observou-se que os metabólitos dos animais sadios, e dos parasitados, respectivamente, variaram ($P\leq 0,05$) entre 1,08 e 1,90 mmol/L de B-HBO, 363,6 e 536,0 $\mu\text{mol/L}$ NEFA, e 3,50 e 2,06 mmol/L de glicose.

A influência do sexo em búfalos pré-púberes entre 18 e 24 meses de idade foi estudada por Ban-Tokuda et al. (2007). Para tanto, foram mensurados parâmetros produtivos, hormonais e lipídicos de 5 garrotes e 5 novilhas, no mesmo ambiente e com a mesma alimentação, durante 6 meses, após 1 mês de adaptação ao experimento. Os autores observaram que os valores de machos e fêmeas se apresentaram, respectivamente, entre 1,93-3,22 mmol/L de colesterol ($P>0,05$), 0,28-0,39 e 0,28-0,51 mmol/L de triglicérides ($P<0,01$), e 4,72-5,27 mmol/L de glicose ($P=0,99$).

Utilizando somente novilhas com média de 26 meses de idade, Rendina et al. (2007), testaram o efeito de diferentes quantidades de energia dietética nos metabólitos sanguíneos indicadores do balanço nutricional. Dentre os parâmetros bioquímicos trabalhados, observaram variações aproximadas de 350-700 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA e 4,0-5,0 mmol/L de glicose, durante os 5 meses estudados.

Com o objetivo de correlacionar lipídios séricos e lipoproteínas com os microminerais sanguíneos de búfalos, Tajik e Nazifi (2010) dosaram valores de colesterol total e triglicérides em machos e fêmeas adultas, de 36 a 72 meses. Os valores observados para todos os animais foram 4,15 mmol/L de colesterol e 0,21 mmol/L de triglicérides, não sendo observada diferença estatística entre os valores de machos (4,17 e 0,22 mmol/L) e fêmeas (4,13 e 0,21 mmol/L).

Trabalhando com ovários e sangue colhidos de fêmeas adultas no momento do abate, Tabatabaei e Mamoei (2010) compararam a quantidade de metabólitos lipídicos presentes em folículos de variados tamanhos com as quantidades no plasma sanguíneo. E observaram que

os valores médios no sangue foram de 2,43 mmol/L de colesterol, 0,44 mmol/L de triglicérides e 7,68 mmol/L de glicose.

Liu et al. (2004), em experimento somente com machos adultos submetidos a infusão intravenosa para teste de tolerância a glicose, verificaram as concentrações de glicose plasmática durante o jejum até 420 minutos após a infusão de 1 g/Kg de glicose intravenosa, dos animais tratados e de animais não tratados. Observaram a diferença ($P < 0,05$) na concentração média de 27,22 mmol/L de glicose nos animais tratados e 3,51 mmol/L nos animais não tratados.

O único trabalho por nós encontrado que fazia referência ao metabolismo lipídico durante o momento gestacional de búfalas foi o de Turkar e Uppal (2007). Este artigo trata da comparação clínica e metabólica entre animais acometidos por impactação omasal e animais sadios. Dentre os parâmetros avaliados, a glicose apresentou-se com médias de 3,21 mmol/L para os animais hígidios, e 6,96 mmol/L para animais prenhes entre 3 e 9 meses, diagnosticados com impactação omasal.

Em referência as adaptações metabólicas em búfalas no periparto, Campanile (1998) fez a descrição de alguns metabólitos do lipidograma em diversos momentos, desde o final da gestação, passando pelo puerpério, até o final do pico de lactação. Os resultados aproximados dos momentos 60-30 e 30-1 dias pré-parto, e 0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto foram, respectivamente, 1,5, 1,5, 1,9, 2,5, 3,2 e 2,9 mmol/L de colesterol, 0,26, 0,24, 0,35, 0,34, 0,32 e 0,38 mmol/L de triglicérides, 0,28, 0,30, 0,18, 0,13, 0,14 e 0,16 mmol/L de β -HBO, e 300, 375, 500, 450, 400 e 325 μ mol/L de NEFA.

Avaliando período semelhante (60 dias pré-parto até 60 dias pós-parto), mas com colheitas de sangue a cada 5 dias em um grupo de 8 búfalas, Oliveira et al. (2003) compararam as concentrações de glicose pré e pós-parto. E verificaram médias de 3,70 e 3,62 mmol/L de glicose antes e depois do parto, com observação de concentrações próximas a 4 mmol/L no momento do parto. Durante a discussão, os autores destacam as menores concentrações deste metabólito nas búfalas com mais de 3 partos, quando comparadas com as búfalas menos experientes metabolicamente, tanto no período pré (3,17 x 3,81 mmol/L), quanto no pós-parto (3,25 x 3,75 mmol/L).

Na outra parte de sua dissertação, Verdurico (2010) descreveu, semanalmente, o perfil lipídico de um grupo de búfalas sadias desde os 30 dias pré-parto até 60 dias pós-parto. Mas para comparação, usaremos as médias agrupadas semelhante ao nosso trabalho, ou seja, último mês de gestação (30-1), parto (0-15) e puerpério (16-30), e início de lactação (31-60).

A autora observou valores médios de 1,91, 1,71, 2,03 e 2,23 mmol/L de colesterol, 0,47, 0,41, 0,45 e 0,44 mmol/L de β -HBO, 580, 726, 755 e 810 μ mol/L de NEFA e 3,47, 3,72, 3,33 e 3,73 mmol/L de glicose, cronologicamente.

Também realizando análises semanais, quatro semanas antes e quatro semanas após o parto de 48 búfalas de uma propriedade particular, Ghanem e El-Deeb (2010) objetivaram observar as alterações clínicas e metabólicas de búfalas no periparto. Após o exame clínico e a análise da bioquímica sanguínea, os animais foram separados em animais sadios (11), animais com cetose (23) e animais com hemoglobinúria (14). Foram selecionados aleatoriamente 5 animais de cada grupo (controle, cetose e hemoglobinúria), e depois comparados estatisticamente (diferença quando $P < 0,05$). As médias dos grupos, respectivamente, foram 1,37a, 0,61b e 1,03c mmol/L de colesterol, 0,34a, 0,22b e 0,27c mmol/L de triglicérides, 1,06a, 1,98b e 1,60c mmol/L de β -HBO, 365,6a, 634b e 494c μ mol/L de NEFA e 3,07a, 1,66b e 2,2c mmol/L de glicose.

Youssef et al. (2010) avaliaram clinicamente 91 búfalas recém-paridas, e as agruparam como sadias (30), suspeitas de cetose (19), e cetóticas (42), sendo o primeiro grupo com idade entre 36-72 meses, e os dois últimos entre 72-120 meses. Após realizarem a bioquímica sanguínea das fêmeas que compunham os grupos normal, cetose subclínica e cetose, constataram as respectivas médias (diferença quando $P < 0,05$) de 4,45a, 3,03b e 2,10c mmol/L de colesterol, 0,82a, 1,85b e 5,21c mmol/L de β -HBO e 2,89a, 2,74a e 1,90b mmol/L de glicose.

Em experimento para verificar o efeito das condições de locação dos animais no perfil metabólico de 28 búfalas durante o pós-parto, Grasso et al. (2004) confinaram 14 búfalas em uma área coberta, com piso de concreto e área de 10m²/animal, enquanto as outras 14 búfalas ficaram em área semelhante e com mesmo arraçãoamento, mas com acesso a uma área aberta de terra, com vegetação espontânea, poças e lama para chafurdar, totalizando uma área de 500m²/animal. Apesar de não terem verificado efeito das condições de locação nos parâmetros bioquímicos analisados ($P > 0,05$), constataram efeito do período pós-parto.

Como Grasso et al. (2004) realizaram colheitas com intervalos de 10 dias, iniciando 15 dias após o parto, até 175 dias de lactação, foram estabelecidos 17 momentos. Mas para podermos comparar os valores obtidos com nossos resultados, reagrupamos em 5 novos intervalos de pós-parto, sendo estes 15, 25, 35-55, 65-85 e 95-175. Os resultados relativos aos respectivos grupos foram 2,05, 2,50, 2,88, 2,98 e 2,78 mmol/L de colesterol, 0,09, 0,11, 0,10,

0,10 e 0,10 mmol/L de triglicérides, 270, 300, 384, 370 e 239 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA, e 3,79, 3,71, 3,62, 3,42 e 3,25 mmol/L de glicose.

Para verificar o efeito da lactação no perfil lipídico de búfalas entre 72-120 meses de idade, Tripathi et al. (2010) colheram sangue de 18 búfalas em lactação, estando 6 em início (51-65 dias), 6 em meio (125-160 dias) e 6 em final (198-262 dias) de lactação. Os valores médios encontrados para os metabólitos lipídicos de acordo com os respectivos períodos de lactação foram 3,98, 5,12 e 4,48 mmol/L de colesterol, 0,19, 0,32 e 0,25 mmol/L de triglicérides, e 454,33, 417,41 e 460,15 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA.

Também durante a lactação, Barley e Baghel (2009) testaram o efeito da suplementação com gordura protegida do rúmen (Bypass) ou da não suplementação (controle), na concentração dos triglicérides séricos de búfalos. Após o parto e período de adaptação (15-30 dias de lactação), o experimento começou aos 30 dias de lactação, sendo dosado semanalmente até 60 dias de lactação (4 colheitas). O grupo controle manteve as concentrações de triglicérides semelhantes às do período de adaptação, em torno de 0,35a mmol/L, mas o grupo Bypass atingiu média de 0,45b mmol/L, no mesmo período de 30 a 60 dias de lactação. Pôde-se observar aumento gradativo, para 0,43b mmol/L (30-45 dias), e 0,47b mmol/L (46-60 dias) de acordo com o tempo de suplementação com gordura protegida.

Durante experimento sobre efeito da utilização de somatotropina recombinante bovina (rBST) ou não (controle) no lipidograma de búfalos, Feckinghaus (2009), utilizando 14 búfalas entre 100 e 200 dias de lactação em cada um dos dois grupos, realizou colheitas no dia da aplicação e 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a aplicação de rBST. Os valores verificados para o grupo controle e o grupo rBST foram, respectivamente, 3,08 e 2,99 mmol/L de colesterol, 0,20 e 0,21 mmol/L de triglicérides, 0,21 e 0,25 mmol/L de β -HBO, 518,45 e 518,05 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA, e 3,63 e 3,76 mmol/L de glicose.

Campanile et al. (1998) realizou experimento com vacas no mesmo período de lactação, avaliando o efeito de diferentes quantidades de proteína dietética no metabolismo lipídico de búfalos. Observou valores entre 2,5-3,5 mmol/L de colesterol, 3,0-4,0 mmol/L de β -HBO, 200-300 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA, e 4,0-4,5 mmol/L de glicose.

Trabalhando somente com búfalas múltiparas secas, Anand e Prakash (2008) avaliaram as diferenças nas concentrações de colesterol e triglicérides, durante o inverno ($15\pm 5^\circ\text{C}$) e o verão ($34\pm 3^\circ\text{C}$ e 75% de umidade), colhendo amostras de 6 fêmeas, em dias alternados, durante dois meses de cada estação. Os pesquisadores observaram diferença significativa ($P<0,01$) entre as concentrações destes metabólitos no inverno e no verão,

obtendo as respectivas médias de 3,61 e 1,54 mmol/L de colesterol e 0,56 e 0,34 mmol/L de triglicérides.

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações de proteína (13,5 e 15,5% de proteína bruta - PB) na alimentação de búfalas paridas, Campanile (1998) suplementou dois grupos de vacas durante diferentes momentos (0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto). Os resultados obtidos de acordo com os respectivos momentos foram 0,15, 0,11, 0,13 e 0,16 mmol/L de β -HBO, 500, 475, 425 e 340 μ mol/L de NEFA, e 3,1, 3,3, 3,5 e 3,5 mmol/L de glicose para o grupo que recebeu 13,5% de PB, e 0,50, 0,45, 0,45 e 0,63 mmol/L de B-HBO, 400, 275, 225 e 270 μ mol/L de NEFA, e 3,9, 4,3, 4,2 e 4,1 mmol/L de glicose para o grupo que recebeu 15,5% de PB.

Por fim, Hagawane et al. (2009) realizaram o perfil bioquímico sanguíneo de búfalas atendidas em uma policlínica veterinária, com histórico de queda na produção de leite em várias fases de lactação, e confrontaram com os mesmos parâmetros de búfalas sadias em lactação (controle). Para tanto, as búfalas atendidas foram divididas em 4 períodos de lactação, formando os grupos Início, Meio, e Final de lactação, búfalas Secas prenhes, mais o grupo Controle. E observaram os valores de 0,36a, 1,17b, 0,99b, 0,39a e 2,30c mmol/L de colesterol ($P<0,01$), e 2,08a, 2,67b, 2,86a, 2,92a e 2,78a mmol/L de glicose ($P<0,05$), respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A descrição dos grupos experimentais e colheita das amostras, técnicas utilizadas para realização das provas bioquímicas, avaliação do escore de condição corporal (ECC) e a análise estatística realizada está disposta a seguir.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS E COLHEITA DAS AMOSTRAS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas seis propriedades de bubalinos de exploração leiteira das raças Murrah, Mediterrâneo, e mestiços, todas localizadas no Estado de São Paulo. Metade das propriedades situava-se na Região do Vale do Ribeira, Litoral do Estado, sendo duas localizadas no município de Registro e uma em Pariquera-Açu. A outra metade das fazendas pertencia à Região Centro-Oeste do Estado, sendo uma localizada no município de Sarapuí, outra em Alambari, e a última em Dourado.

As fazendas localizadas no Vale do Ribeira, todas caracterizadas por sistema extensivo de manejo, eram formadas com pastos não adubados de braquiárias (*Brachiaria sp.*). Aguada era observada em todos os pastos, mas com disponibilidade de mistura mineral somente para as búfalas de leite, que eram ordenhadas somente uma vez ao dia. Já as fazendas localizadas na região Centro-Oeste do Estado, caracterizadas por sistema semi-intensivo de manejo, eram formadas por pastos adubados de braquiárias e pânticuns (*Panicum sp.*). Água e mistura mineral eram fornecidas *ad libitum*, além de suplementação protéico-energética em qualidade e quantidades variáveis, fornecidas somente às búfalas de leite e seus respectivos bezerros, antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

No total, foram colhidas amostras de soro e plasma de 635 animais, entre novembro de 2009 e julho de 2010. Estas colheitas foram realizadas entre 2-6 horas após a última alimentação dos animais, quer tenha sido à base de forragem pastejada, ou suplementação alimentar no cocho. Para as búfalas em lactação, as colheitas só começavam a partir das 9:00 da manhã, após arraçoamento (sistema semi-intensivo) e primeira ordenha do dia, cronologicamente.

Os bubalinos utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos de acordo com as necessidades para a formação dos grupos experimentais, sendo que

previamente a colheita, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, quando foram excluídos da pesquisa aqueles considerados doentes. Após esta seleção, as amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer®.

As amostras para avaliação do colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (β -HBO) foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 mL sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 mL contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

No laboratório as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sangüíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

Para os capítulos sobre influências do puerpério, da lactação e do sistema de criação, foram descritas as médias de produção de leite para cada grupo estudado, de acordo com as pesagens mensais realizadas nas fazendas utilizadas.

3.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA REALIZAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS

As técnicas para determinação dos teores séricos de colesterol, triglicérides, β -HBO e NEFA e plasmáticos de glicose estão descritas a seguir.

3.2.1 Determinação dos teores séricos de colesterol

A determinação dos teores séricos de colesterol foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda., utilizando-se kit comercial da Biosystems - Espanha (número de artigo 11505).

Por esse método, o colesterol sofre a ação da colesterol-esterase e posteriormente da colesterol-oxidase, originando um produto intermediário e água oxigenada. A água oxigenada formada reage com a 4-amino antipirina e fenol, na presença de peroxidase, dando origem a um complexo colorido, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente na amostra, em 500 nm (ALLAIN et al., 1974). Os resultados estão expressos em mmol/L.

3.2.2 Determinação dos teores séricos de triglicérides

A determinação dos teores séricos de triglicérides foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda., utilizando-se kit comercial da Biosystems - Espanha (número de artigo 11528).

Por este método, os triglicérides são hidrolisados pela lipase presente no reagente, liberando glicerol, que é catalisado pela glicerol-quinase e glicerol fosfato oxidase, havendo geração de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio sofre a ação da peroxidase concomitantemente à produção de um complexo colorido, a quinolaimina, devido a um sistema reagente existente composto de clorofenol e antipirina. A coloração desenvolvida é proporcional à concentração de triglicérides da amostra, em 500 nm (FOSSATI; PRENCIPE, 1982). Os resultados estão expressos em mmol/L.

3.2.3 Determinação dos teores séricos de β -hidroxibutirato (β -HBO)

A determinação dos teores séricos de β -hidroxibutirato foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda., utilizando-se kit comercial da Ranbut, (D-3-Hydroxybutyrate), Randox, Laboratories Ltd, Reino Unido.

O princípio da prova está baseado na reação desencadeada pela β -hidroxibutirato desidrogenase presente no reagente e que catalisa o β -HBO formando o acetoacetato.

Concomitantemente, o NAD presente é reduzido a NADH, sendo a absorbância do NADH em 340 nm diretamente proporcional à concentração de β -HBO presente na amostra (WILLIAMSON et al., 1962). Os resultados estão expressos em mmol/L.

3.2.4 Determinação dos teores séricos de ácidos graxos livres não esterificados (NEFA)

A determinação dos teores séricos de ácidos graxos livres não esterificados (NEFA) foi quantificada por metodologia enzimática colorimétrica, em Analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda., utilizando-se kit comercial da WAKO – USA (número de artigo ° 994-75409-E).

O princípio da prova está baseado na ação da acil CoA sintetase, na presença de ATP e cofatores, sobre os ácidos graxos livres não esterificados (NEFA) dando origem a acil CoA, AMP e Ppi. Essa Acil-CoA é então oxidada, produzindo peróxido de hidrogênio, que foi auxiliar na reação de condensação de uma hidroxianilina com a aminoantipirina, ambos presentes no reagente, havendo a formação de um complexo de coloração púrpura, cuja intensidade de coloração em 550 nm é diretamente proporcional à quantidade de NEFA presente na amostra (método desenvolvido pelo fabricante do kit, ainda não publicado), sendo a reação de coloração baseada em Elphick (1968). Os resultados estão expressos em μ mol/L.

3.2.5 Determinação dos teores plasmáticos de glicose

Para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foi utilizado o método descrito por Barham et al. (1972), em Analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda., utilizando-se kit comercial da marca Diasys® (código de produto 10.250.021).

O princípio do método está baseado na oxidação da glicose em ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio pela enzima glicose-oxidase; na presença de peroxidase o peróxido de hidrogênio formado na reação anterior, reage com a 4-aminofenazona e com o 2,4-diclofenol, produzindo antipirilcloroquinonimina que desenvolve coloração rósea, cuja intensidade

mantém relação direta com a quantidade de glicose presente na amostra. Os resultados estão expressos em mmol/L.

3.3 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ECC).

Para a avaliação da condição do estado geral dos animais, utilizamos a avaliação do escore de condição corporal (ECC) preconizado por Houghton et al. (1990), e modificada para a espécie bubalina por Baruselli et al. (2001), que trabalharam com fêmeas bubalinas da raça Murrah, na região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo (Quadro 1). Foram atribuídas as notas de 1 a 5, conforme o estado de carne do animal, com escala de 0,5 entre as referidas notas. Contabilizando, portanto, as notas 1; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0. Somente foram avaliados animais adultos, ou seja, acima de 24 meses.

Escore	Descrição
1	Extremamente magra , com perda de massa muscular grave podendo apresentar-se corcunda, com os pés juntos; e geralmente fraca. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e costelas extremamente proeminentes.
2	Magra , com pouca ou nenhuma perda de estrutura muscular; vigorosa; pouca ou nenhuma gordura na garupa, costelas ou peito. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e as costelas proeminentes, mas com aparecimento normal de estruturas musculares.
3	Condição moderada , com estrutura muscular normal; alguma evidência de gordura depositada nas costelas dianteiras e peito, mas limitado ao redor da base da cauda. Alguma maciez sobre o ombro, costelas, coluna vertebral, tuberosidades e pontas.
4	Gorda , mas ainda firme e vigorosa. Considerável depósito de gordura sobre as costelas dianteira, peito saliente, base da cauda completa (abaulada), muito boa maciez sobre a espinha dorsal sem ossos visíveis, exceto as tuberosidades.
5	Muito gorda , com maciez considerável. Grande depósito de gordura sobre as costelas dianteiras e ombro, grande e proeminente peito, ampla superfície de dorso, grandes depósitos irregulares de gordura ao redor da base da cauda; curvatura corporal torna-se quadrada na aparência.

Quadro 1 - Escala de avaliação para a determinação do escore de condição corporal (ECC) para búfalos

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analise* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformadas em conformidade. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Idade; Gestação; Lactação; Número de Crias; Sexo; Puerpério; Sistema de Criação), Fazenda; Categoria; e ECC, assim como suas interações, foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo final foram removidas as variáveis por *Backward Elimination* baseado no critério de Wald para $P > 0,20$.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means (LSMeans)* do SAS, onde consideramos diferença para $P \leq 0,05$, ou seja, provável repetitividade $\geq 95\%$.

CAPÍTULO 1

LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS LEITEIROS: INFLUÊNCIA DA IDADE E VALORES DE REFERÊNCIA

4 INTRODUÇÃO

No Brasil, o crescimento acumulado do rebanho bubalino, entre 1961 e 2005, foi de surpreendentes 1.806%, destacando-se ainda que, no mundo, segundo a FAO, o rebanho bubalino cresceu nos períodos de 1961-1980 e 1980-2005, respectivamente 38% e 43% e o bovino, 29% e 11%. Hoje o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009) estima que o rebanho nacional esteja em torno de 1.131.986 de búfalos.

A intensificação das criações de búfalo determinou a prática de modernas técnicas de criação já usadas em gado de leite, como arraçamento artificial, redução da utilização de pastos, ordenha mecânica e a introdução da segunda ordenha (GRASSO et al., 2004). Associado a essas modificações ocorreram o aumento na produção de leite e a necessidade de alimentar essas fêmeas, em quantidade, qualidade e frequência adequadas a fim de suprir as exigências produtivas e garantir que não houvesse desequilíbrio metabólico e energético (THOMAS et al., 2005).

O desbalanço energético é um dos fatores que mais impactam nutricionalmente o crescimento, saúde, lactação, e em especial, o desempenho reprodutivo (MONDAL; PRAKASH, 2004), pois os requerimentos energéticos são aumentados para a fecundação e manutenção da gestação (VAN SOEST, 1994), principalmente em animais de alta produção. As mudanças no balanço energético podem ser monitoradas pela avaliação do escore de condição corporal (ECC) dos animais (MONDAL; PRAKASH, 2004). Porém, segundo Van Saun (2000), esse procedimento pode não ser uma ferramenta sensível o suficiente para avaliar todas as categorias animais, sendo recomendado o estudo dos metabólitos sanguíneos para ajudar a entender as peculiaridades do balanço metabólico e energético do búfalo, nas mais diversas condições de criação, a fim de que se possa ajustar o manejo e a alimentação que os búfalos precisam (LEE et al., 1978; CAMPANILE, 1998; RENDINA et al., 2007; HAGAWANE, et al., 2009).

Ao analisar a literatura existente sobre metabolismo energético de bovinos e búfalos, nota-se que aquela fase denominada de “período de transição” foi a que suscitou maior interesse dos pesquisadores (VERNON; TAYLOR, 1988; BUTLER; CANFIELD, 1989; VASQUEZ-ANON et al., 1994; BELL, 1995; GRUMMER, 1995; GRUM et al., 1996; CAMPANILE, 1998; NRC, 2001; HAYIRLI et al., 2002; FRIGGENS, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; GRASSO et al., 2004; GHANEM; EL-DEEB, 2010; VERDURICO, 2010; YOUSSEF et al., 2010). No entanto, verificou-se que boa parte dos trabalhos o fez com a

única intenção de estabelecer um grupo controle dos experimentos conduzidos, e o estudo da influência de fatores indutores da variação no lipidograma de búfalos praticamente não foi alvo de estudos.

Além disso, pesquisas desenvolvidas precisam de uma adequada avaliação para serem utilizadas fora de sua região de origem, pois os animais criados sob diferentes condições ambientais, com diferentes alimentos e subprodutos disponíveis, e diferentes tipos de manejo, podem influenciar diretamente nos constituintes sangüíneos. Portanto, diante da existência de poucas informações na literatura brasileira relativa ao metabolismo energético em búfalos, surgiu-se a elaboração da presente pesquisa que visa estabelecer os valores de referência e a influência dos fatores etários nos teores séricos de colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA), β -hidroxibutirato (β -HBO) e teores plasmáticos de glicose de búfalos criados no Estado de São Paulo.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas seis propriedades de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, e mestiços, todas localizadas no Estado de São Paulo. Três delas situavam-se na Região do Vale do Ribeira, sendo duas localizadas no município de Registro e uma em Pariquera-Açu. As outras três, pertenciam à Região Centro-Oeste do Estado, sendo uma localizada no município de Sarapuí, outra em Alambari, e a última em Dourado.

As fazendas localizadas no Vale do Ribeira, todas caracterizadas por sistema extensivo de manejo, eram formadas com pastos não adubados de braquiárias (*Brachiaria sp.*). Água era observada em todos os pastos, mas com disponibilidade de mistura mineral somente para as búfalas de leite, que eram ordenhadas somente uma vez ao dia. Já as fazendas localizadas na região Centro-Oeste do Estado, caracterizadas por sistema semi-intensivo de manejo, eram formadas por pastos adubados de braquiárias e pântanos (*Panicum sp.*). Água e mistura mineral eram fornecidas *ad libitum*, além de suplementação protéico-energética em qualidade e quantidades variáveis, fornecidas somente às búfalas de leite e seus respectivos bezerras, antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Para avaliar a influência da idade sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo, foram colhidas 307 amostras de soro e plasma sangüíneo de búfalos, distribuídos conforme apresentado no quadro 2. Estas colheitas foram realizadas entre 2-6 horas após a

última alimentação dos animais, quer tenha sido à base de forragem pastejada, ou suplementação alimentar no cocho. Para as búfalas em lactação, as colheitas só começavam a partir das 9:00 da manhã, após arraçoamento (sistema semi-intensivo) e primeira ordenha do dia, cronologicamente.

Os bubalinos utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos de acordo com as necessidades para a formação dos grupos experimentais, sendo que previamente a colheita, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, quando foram excluídos da pesquisa aqueles considerados doentes. Após esta seleção, as amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer®.

As amostras para avaliação do colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (β -HBO) foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 mL sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 mL contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

Grupos	Constituição	Amostras Colhidas
1 - 3	Bezerros lactentes, com até 3 meses de idade, sendo 21 machos e 18 fêmeas.	39
4 - 6	Bezerros desmamadas, com idades variando entre 4 e 6 meses, sendo 7 machos e 17 fêmeas.	24
7 - 12	Bezerros com idade variando entre 7 e 12 meses, sendo 16 machos e 10 fêmeas.	26
13 - 24	Bezerras pré-púberes ou algumas poucas púberes, com idade variando entre 13 e 24 meses.	30
25 - 36	Novilhas púberes, prenhes até 9 meses de gestação, com idades variando entre 25 e 36 meses.	39
37 - 48	Primíparas e multíparas, em lactação, gestantes até 9 meses de gestação ou paridas a mais de 60 dias, com idades variando entre 37 e 48 meses.	52
49 - 72	Primíparas e multíparas, em lactação, gestantes até 9 meses de gestação ou paridas a mais de 60 dias, com idades variando de 49 e 72 meses.	28
73 - 120	Multíparas, em lactação, gestantes até 9 meses de gestação ou paridas a mais de 60 dias, com idades variando de 73 e 120 meses.	41
>120	Multíparas, em lactação, gestantes até 9 meses de gestação ou paridas a mais de 60 dias, com mais de 120 meses.	28

Quadro 2 - Constituição dos grupos experimentais para estabelecer os valores de referência e avaliar a influência da idade sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo

No laboratório as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sangüíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

Os teores séricos de colesterol, triglicérides, β -HBO e NEFA, foram quantificados por metodologia enzimática colorimétrica, segundo as técnicas de Williamson et al. (1962); Elphick (1968); Allain et al. (1974) e Fossati e Prencipe (1982), e os resultados dos três primeiros foram expressos em mmol/L, e do último em μ mol/L. Os teores plasmáticos de glicose foram quantificados pelo método descrito por Barham et al. (1972), sendo os resultados expressos em mmol/L. Todas as amostras foram determinadas em um analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda.

Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analyse* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformadas em conformidade. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Idade) e Fazenda foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo final foram removidas as variáveis por *Backward Elimination* baseado no critério de Wald para $P > 0,20$.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means (LSMeans)* do SAS, onde consideramos diferença para $P \leq 0,05$, ou seja, provável repetitividade $\geq 95\%$.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das concentrações de colesterol nos diferentes grupos de idade estão expressos na tabela 1 e figura 1. Observam-se valores semelhantes entre animais de 1-24

meses de idade. Havendo uma diminuição destas concentrações na faixa etária entre 25-36 meses, e um aumento progressivo até as categorias de maior idade, onde atingem estabilidade.

Segundo Kaneko (2008), as quantidades de colesterol presentes refletem o acetil-CoA disponível para a geração de energia, oriundo basicamente da ingestão de comida. No primeiro momento os valores se mantiveram entre 2,5-3,0 mmol/L, mas caíram para média de 2,0 mmol/L na faixa etária de 25-36 meses. Esse fenômeno coincide com uma observação prática de campo, pois após serem selecionadas para cobertura, as novilhas, que já ocupam bem mais hectares que quando bezerras, agora são mantidas em pastos secundários das fazendas até começarem a produzir leite.

E depois, os valores voltam a subir para o intervalo de 2,5 e 3,5 mmol/L, a partir do momento em que as fêmeas efetivamente começam a produzir leite, sendo mais expressivo nas fêmeas acima de 49 meses, pois esta faixa etária não só é a que mais produz, mas também a que mais come. Este achado está de acordo com Arave et al. (1975); Shaffer et al. (1981) e Pogliani (2006) que também determinaram que os teores séricos de colesterol aumentam com o evoluir da idade para animais de exploração leiteira.

Tabela 1 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 3	39	2,47 ^{bc}	0,81	0,13	32,79	2,21	2,73	1,20	4,70
4 - 6	24	2,92 ^{bc}	0,75	0,15	25,68	2,60	3,23	1,90	4,50
7 - 12	26	2,43 ^{cd}	0,78	0,15	32,10	2,12	2,75	1,00	4,30
13 - 24	30	2,53 ^{cd}	0,58	0,10	22,92	2,32	2,75	1,60	3,80
25 - 36	39	2,05 ^{de}	0,36	0,06	17,56	1,93	2,16	1,40	2,80
37 - 48	52	2,55 ^{bc}	0,74	0,10	29,02	2,35	2,76	1,50	4,40
49 - 72	28	3,62 ^a	0,67	0,13	18,51	3,36	3,88	2,00	5,00
73 - 120	41	3,42 ^a	0,78	0,12	22,81	3,18	3,66	2,00	4,90
>120	28	3,52 ^a	0,48	0,09	13,64	3,34	3,71	2,10	4,30

Letras diferentes (a, b, c e d) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Para bezerros búfalos até 4 meses, nossos resultados ficaram semelhantes aos de Verdurico (2010), tanto para os animais controle como os que receberam aditivo (2,76 e 3,09 mmol/L).

Para bezerras de 16 meses, nossos valores ficaram bem acima dos encontrados por Marques et al. (2004), independente do manejo de confinamento (1,53, 1,62 e 1,65 mmol/L). Diferente do nosso trabalho que utilizou soro, as amostras de sangue do trabalho de Marques et al. (2004) foram colhidas em tubos com heparina.

Para búfalas entre 18 e 24 meses, os valores achados por Ban-Tokuda et al. (2007) se assemelharam aos nossos. Porém, tiveram um intervalo com valores mais altos, provavelmente devido à alimentação de engorda dos animais (2,58-3,22 mmol/L), que foram abatidos após o experimento.

Figura 1 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c e d) diferiu ($P < 0,0001$)

Para búfalas entre 36 e 72 meses, Youssef et al. (2010) acharam concentrações de 4,45, mmol/L de colesterol, Tajik e Nazifi (2010) verificaram média de 4,13 mmol/L, e Tripathi et al. (2010), para início (51-65 dias), meio (125-160 dias) e final (198-262 dias) de lactação, verificaram os valores de 3,98, 5,12 e 4,48 mmol/L de colesterol.

Nos três últimos trabalhos egípcio, iraniano e indiano, não são relatados qualidade e quantidade da alimentação consumida pelos animais, mas é provável que seja a típica base alimentar utilizada nos trabalhos indianos, que utilizam produtos e subprodutos de arroz, trigo, algodão, aveia e amendoim, e um tipo de leguminosa pouco utilizada no Brasil, o trevo alexandrino ou egípcio (*Trifolium alexandrinum*), o que caracterizaria a disponibilidade regional de alimentos. Essa típica dieta seguramente gera diferenças nos metabólitos sanguíneos dos búfalos criados aqui, talvez por isso, tenham comportamentos semelhantes de colesterol, porém, com valores um pouco diferentes, e para concentrações de colesterol, um pouco maiores. Acrescido a isso, relevamos que neste trabalho utilizamos animais criados nos mais diversos sistemas de criação, sendo todos de exploração leiteira, mas com enormes variações de alimentação, e não somente recebendo concentrados, como no caso dos três trabalhos citados.

As concentrações de triglicérides nos diferentes grupos de idade encontram-se na tabela 2 e figura 2. Podemos verificar maiores valores nos animais até os 24 meses de vida, quando comparamos com as fêmeas em vida produtiva, e essa distancia atinge o máximo quando confrontamos bezerros com búfalas acima de 49 meses.

Tabela 2 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 3	39	0,39 ^{bc}	0,11	0,02	28,21	0,35	0,43	0,10	0,70
4 - 6	24	0,50 ^a	0,18	0,04	36,00	0,42	0,57	0,20	0,90
7 - 12	26	0,49 ^{ab}	0,20	0,04	40,82	0,41	0,57	0,20	0,90
13 - 24	30	0,55 ^{cd}	0,16	0,03	29,09	0,49	0,61	0,30	1,00
25 - 36	39	0,35 ^{de}	0,09	0,01	25,71	0,32	0,38	0,10	0,60
37 - 48	52	0,32 ^e	0,14	0,02	43,75	0,28	0,35	0,10	0,70
49 - 72	28	0,24 ^f	0,14	0,02	58,33	0,19	0,29	0,10	0,80
73 - 120	41	0,23 ^f	0,12	0,02	52,17	0,19	0,26	0,10	0,50
>120	28	0,24 ^f	0,11	0,02	45,83	0,20	0,29	0,10	0,40

Letras diferentes (a, b, c, d, e, e f) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Os triglicérides detectados no soro são aqueles disponíveis ao organismo, tanto os contidos nas lipoproteínas quilomícrons, resultado da absorção de lipídios pelo intestino

delgado, como em VLDL, oriundos da síntese de triglicérides pelos hepatócitos (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

A quantidade de triglicérides encontrada no sangue sempre segue a relação do que é ingerido pelo animal, menos o que é utilizado pelo organismo. Até o desmame, os bezerros se mantêm basicamente com o açúcar do leite, a lactose. Essa alimentação mantém altas quantidades de insulina, a qual restringe a utilização de gordura pelo fígado e músculos, graças a sua ação anti-lipolítica. Mesmo após o desmame, este organismo pré-ruminante ainda está adaptado a utilizar glicose, que começa a ter origem do propionato absorvido no rúmen, e que de certa forma, poupa a utilização dos triglicérides circulantes (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999). Talvez por isso possamos observar que os triglicérides se mantêm em valores acima de 0,4 mmol/L até os 12 meses, mesmo após o desmame ocorrido aos 3 meses.

Figura 2- Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c, d, e, e f) diferiu ($P < 0,0001$)

A partir dos 13 meses, as quantidades deste metabólito já decrescem estatisticamente, e seguem em queda até as fases mais adiantadas em idade, onde atingem limiares de 0,25

mmol/L. Essa diminuição nas quantidades de triglicérides provavelmente vem dos menores efeitos da insulina, menor dependência e utilização da glicose como fonte energética, e maior utilização dos ácidos graxos pelos animais mais maduros, tanto para funções hepáticas, musculares como para a produção de leite.

Somado a isso, temos as limitadas quantidades de VLDL fisiologicamente produzidas por ruminantes (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; BAN-TOKUDA et al., 2007; KANEKO, 2008), e que ainda podem ser prejudicadas pela maior presença de glucagon (GIBBONS, 1990), baixa ingestão de carboidratos, e condições de subnutrição (BONNET et al., 2004). O que talvez ajude a justificar os valores expressivamente menores das fêmeas acima de 49 meses, que são as maiores produtoras de leite.

Os valores de triglicérides encontrados em todos os trabalhos consultados estão de acordo com os encontrados nesta pesquisa.

Para búfalas entre 18 e 24 meses, Ban-Tokuda et al. (2007) encontraram valores entre 0,28-0,51 mmol/L. Já para fêmeas entre 36 e 72 meses, Tajik e Nazifi (2010) observaram 0,21 mmol/L. E em búfalas entre 72-120 meses, Tripathi et al. (2010), registraram, em início (51-65 dias), meio (125-160 dias) e final (198-262 dias) de lactação, valores de 0,19, 0,32 e 0,25 mmol/L de triglicérides, respectivamente.

Os valores de β -HBO estão expressos na tabela 3 e na figura 3, onde podemos notar os menores valores nos animais até 3 meses de idade, com aumento considerável após o desmame, até atingir os maiores teores durante 6-12 meses.

Tabela 3 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 3	39	0,45 ^e	0,27	0,04	60,00	0,36	0,54	0,15	1,40
4 - 6	24	0,93 ^b	0,36	0,07	38,71	0,78	1,09	0,37	1,71
7 - 12	26	1,32 ^a	0,62	0,12	46,97	1,07	1,57	0,44	2,45
13 - 24	30	0,79 ^b	0,34	0,06	43,04	0,67	0,92	0,43	1,58
25 - 36	39	0,78 ^d	0,28	0,04	35,90	0,69	0,87	0,35	1,67
37 - 48	52	0,86 ^{bc}	0,26	0,04	30,23	0,79	0,94	0,47	1,48
49 - 72	28	0,71 ^{cd}	0,24	0,04	33,80	0,62	0,81	0,39	0,13
73 - 120	41	0,74 ^{cd}	0,16	0,03	21,62	0,69	0,79	0,41	0,12
>120	28	0,78 ^{cd}	0,29	0,05	37,18	0,67	0,89	0,52	1,97

Letras diferentes (a, b, c, d, e) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

O β -HBO pode ter origem tanto na cetogênese alimentar quando na metabólica. Onde o butirato ruminal é convertido em β -HBO pelas células da parede ruminal, mas também pode ser formado após a lipólise, quando grande quantidade do NEFA chega ao fígado, ultrapassando as quantidades de oxaloacetato disponíveis para adentrar ao ciclo de Krebs, formando então os corpos cetônicos, através da β -Oxidação. Mas independente de sua origem, pode ser utilizado como fonte de energia pela maioria dos tecidos corporais (HEITMANN et al., 1987; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; MARUTA, 2005; KANEKO, 2008).

Vale ressaltar que em condições normais, cerca de 70% dos corpos cetônicos circulantes são produzidos no rúmen (cetogênese alimentar), e somente 30% produzido pelo fígado (cetogênese metabólica; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999). Este metabólito tem comportamento semelhante aos triglicérides, por também se tratar de um lipídio, com origens alimentar e metabólica. A peculiaridade do β -HBO é que este só começa a ser produzido pelo rúmen com a ingestão de matéria seca (ANDERSON et al., 1987; QUIGLEY et al., 1991a; POGLIANI, 2006).

Figura 3 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média ± EPM) com um expoente (a, b, c, d, e) diferiu ($P < 0,0001$)

Como se observa, as menores quantidades de β -HBO são encontradas em bezerros até 3 meses, e crescem abruptamente até os 12 meses de idade, quando atingem sua plena produção. Porém, sofrem as mesmas restrições da insulina, pois a principal fonte de energia dos animais lactentes e desmamados é a glicose, até a total adaptação orgânica para começar a depender dos compostos lipídicos (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999), como começa a acontecer nos animais entre 13 e 24 meses, até atingirem os valores constantes a partir de 25 meses.

Para bezerros até 4 meses, Verdurico (2010) encontrou valores consideravelmente menores que os encontrados por nós, tanto para seus animais controle como para os que receberam suplemento vitamínico e mineral (0,24 e 0,25 mmol/L). O que pode ser justificado pelo fato de que em nosso experimento, utilizamos animais de diferentes tamanhos, pesos, ganhos de peso, e alimentação, e Verdurico (2010) analisou os animais sob sistema de confinamento em medidas repetidas, que foram criados com leite, volumoso, concentrado e apresentaram ganhos de peso de 0,713 e 0,906 g/dia, ou seja, provavelmente não passaram nenhum tipo de privação nutricional.

Os bezerros avaliados por nós podem ter passado por processos lipolíticos, como a privação de leite e pasto, além da desmama, aumentando nossos valores de β -HBO, principalmente de origem metabólica. Mas foram resultados encontrados em situações reais, não experimentais. O que mostra que mesmo para bezerros búfalos de leite, se alimentados de forma adequada, podem atingir excelentes índices produtivos, e provavelmente valores de β -HBO mais próximos aos nossos limites mínimos.

Por outro lado, em pesquisa com vacas leiteiras que tiveram sangue colhido em jejum, Bonnet et al. (2004) verificaram valores que variaram em torno de 0,15-0,25 mmol/L de β -HBO, chegando a triplicar (0,56-0,71 mmol/L) quando a colheita da sangue é realizada nas mesmas vacas, algumas horas após a refeição. Valores estes bem mais próximos aos nossos, talvez porque nossas colheitas nunca foram realizadas em animais submetidos a jejum, o que mostra o forte efeito prandial nas concentrações de β -HBO circulantes.

Para búfalas entre 24 e 36 meses, El-Deeb e Younis (2009) descreveram média de 1,08 mmol/L. Valor ligeiramente maior que os observados por nós, talvez pela maior cetogênese alimentar, pois estas búfalas receberam suplementação, enquanto que as observadas em nossa pesquisa geralmente ocupavam pastos de qualidade sofrível, sem suplementação. Já para búfalas entre 72 e 120 meses, Youssef et al. (2010) observaram valores em torno de 0,82 mmol/L de β -HBO, valores próximos aos encontrados em nosso trabalho.

Os valores de NEFA estão descritos na tabela 4 e figura 4, onde podemos notar o comportamento altamente variável dentro das faixas etárias analisadas, mas sem diferença significativa entre as categorias ($P>0,05$).

O NEFA reflete basicamente o grau de lipólise do animal, ou seja, o quanto está sendo demandado pelo organismo para suprir as necessidades energéticas (MONDAL; PRAKASH, 2004). Sendo uma variável muito sensível, e indicada para determinar o balanço energético e a condição corporal (VAN SAUN, 2000).

Apesar da igualdade estatística, o que chama atenção pra essa variável lipídica é uma tendência ($P=0,0519$) à pico nos animais entre 4 e 6 meses de idade, período esse que corresponde exatamente com o período pós desmame. Poderíamos inferir, portanto, que os bezerros são submetidos a um trauma nutricional e metabólico com a privação repentina do aleitamento, voltando a valores estáveis a partir dos 7 meses de idade.

Em experimento realizando desmame de bezerros com 1 ou 2 meses de vida, Quigley et al. (1991a) não observaram efeito de tratamento ao longo dos primeiros 4 meses de vida, porém, quando observaram somente o mês entre o desmame do primeiro grupo e o desmame do segundo grupo (entre as semanas 5 e 8 de vida), observaram aumento significativo ($P<0,01$) nos valores de NEFA dos animais que tinham acabado de ser desmamados ($140,4\mu\text{mol/L}$), em relação aos que já estavam desmamados ($116,2\mu\text{mol/L}$). Observando, portanto, efeito de desmame em animais a partir de 2 meses de vida, como é o caso dos búfalos utilizados em nosso experimento.

Tabela 4 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 3	39	210,61	89,36	14,31	42,43	181,64	239,58	30,89	472,48
4 - 6	24	261,36	57,61	11,76	22,04	237,03	285,69	137,40	377,86
7 - 12	26	187,91	50,13	10,03	26,68	167,22	208,61	63,76	315,34
13 - 24	30	211,48	109,62	20,01	51,83	170,55	252,42	57,80	447,29
25 - 36	39	198,97	151,05	24,19	75,92	150,00	247,93	68,01	903,10
37 - 48	52	233,90	132,34	18,35	56,58	197,05	270,74	45,48	585,60
49 - 72	28	179,52	108,97	20,59	60,70	137,27	221,78	67,94	433,36
73 - 120	41	221,35	144,96	22,64	65,49	175,59	267,10	55,32	577,11
>120	28	192,46	140,55	26,56	73,03	137,96	246,95	33,71	536,14

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P = 0,0519$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMIn – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Como o NEFA é um metabólito muito sensível e variável, todos os valores de animais sadios encontrados na literatura se encontravam dentro do espectro de valores observados por nós.

Para bezerras entre 6 e 20 meses, Mondal e Prakash (2004) observaram intervalo de 110 até 250 $\mu\text{mol/L}$. Em búfalas entre 24 e 36 meses, Haldar e Prakash (2007) encontraram valores entre 75-150 $\mu\text{mol/L}$, El-Deeb e Younis (2009), média de 363,6 $\mu\text{mol/L}$, e Rendina et al. (2007), variação aproximada de 350-700 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA.

Já para búfalas entre 72-120 meses de idade, Tripathi et al. (2010) registraram, para início (51-65 dias), meio (125-160 dias) e final (198-262 dias) de lactação, valores de 454,33, 417,41 e 460,15 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA.

Figura 4 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média $\pm$ EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P = 0,0519$)

Os resultados de glicose estão descritos na tabela 5 e na figura 5. Da observação destas, podemos verificar diminuição gradativa nas concentrações de glicose, de acordo com o avançar da idade dos animais.

A glicose é oriunda da alimentação, mas sua absorção vai depender de sua passagem ou não pelo rúmen. Pode se tornar disponível somente por gliconeogênese, como é o caso de ruminantes plenos, ou por meio de simples absorção intestinal, como é o caso de bezerros pré-ruminantes “monogástricos”, que não submetem sua ingesta à processos fermentativos (KANEKO, 2008).

O comportamento da glicemia observada em búfalos segue a clássica curva glicêmica postulada para ruminantes, estando, portanto, de acordo com todas as literaturas consultadas, que há diminuição da glicose de acordo com o avançar da idade (QUIGLEY et al., 1991a; MONDAL; PRAKASH, 2004; POGLIANI, 2006; KANEKO, 2008).

Para Van Soest (1994), o nível da alimentação tem pouca influência nas taxas circulantes de glicemia de ruminantes. Mas analisando as quantidades de glicose encontradas nos trabalhos sobre búfalos, observamos que a glicemia parece ser influenciada pelo tipo de exploração animal. Com diferença considerável entre os animais que estão sendo engordados, sob confinamento ou em experimentos de nutrição, em relação aos animais de exploração leiteira.

Tabela 5 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 3	39	4,70 ^d	1,34	0,21	28,51	4,26	5,13	2,10	10,90
4 - 6	24	4,82 ^d	0,87	0,18	18,05	4,45	5,18	3,90	7,60
7 - 12	26	4,15 ^c	0,57	0,11	13,73	3,92	4,38	2,80	5,20
13 - 24	30	4,12 ^{bc}	0,31	0,06	7,52	4,00	4,24	3,60	4,70
25 - 36	39	3,84 ^b	0,33	0,05	8,59	3,73	3,94	3,20	4,60
37 - 48	52	3,51 ^a	0,39	0,05	11,11	3,40	3,62	2,90	5,20
49 - 72	28	3,48 ^a	0,35	0,06	10,06	3,34	3,61	2,90	4,20
73 - 120	41	3,28 ^a	0,31	0,05	9,45	3,18	3,38	2,80	4,00
>120	28	3,35 ^a	0,37	0,07	11,04	3,20	3,49	2,40	4,00

Letras diferentes (a, b, c, e d) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P = 0,0030$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Para bezerros até 4 meses, sob regime alimentar de confinamento, recebendo ou não suplementação vitamínica e mineral, Verdurico (2010) observaram concentrações de 6,16 e 6,28 mmol/L de glicose. Enquanto que em búfalas em torno de 24 meses, Marques et al. (2004) verificaram médias de glicose entre 5,63, 5,49 e 5,88 mmol/L para fêmeas suplementadas com ração (controle), ou mais promotor de crescimento, ou esferas de chumbo implantadas no útero, enquanto Ban-Tokuda et al. (2007) observaram 4,72-5,27 mmol/L, e Rendina et al. (2007) verificaram intervalo de 4,0-5,0 mmol/L de glicose. Valores estes bem maiores do que os observados em nosso trabalho.

Figura 5 - Efeito dos diferentes grupos de idade (meses) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c, e d) diferiu ($P < 0,0001$)

Já em artigos que relataram a utilização de animais oriundos de propriedades leiteiras, as observações são bem diferentes.

Para bezerras entre 6 e 20 meses, Mondal e Prakash (2004) relataram valores decrescentes de 3,33 para 1,39 mmol/L, com o passar da idade. Ou seja, valores menores que os constatados em nossa pesquisa. E para búfalas entre 24 e 36 meses de idade, Haldar e Prakash (2007) apresentaram valores de glicose entre 2,5-4,0 mmol/L. Enquanto que em búfalas entre 72 e 120 meses, Youssef et al. (2010) verificaram média de 2,89 mmol/L de glicose. Ou seja, valores de acordo com nossos achados.

4.3 CONCLUSÃO

Conclui-se que os metabólitos lipídicos analisados nesta pesquisa variaram de acordo com a idade dos animais, pois com o passar do tempo o organismo ruminante lança mão de substratos energéticos em diferentes qualidades e quantidades. No entanto, essas mudanças no metabolismo energético de búfalos também estão diretamente relacionadas ao momento do desmame, nível de desenvolvimento ruminal, momento da colheita de sangue em relação à alimentação, mas principalmente, ao manejo alimentar a que os animais são submetidos em seus diversos momentos produtivos na fazenda de leite.

Diante dos intervalos de confiança obtidos, propõem-se para búfalos até 24 meses de idade, os seguintes valores de referência para lipidograma: entre 2,12-3,23 mmol/L de colesterol, 0,35-0,61 mmol/L de triglicérides, 0,36-1,57 mmol/L de β -HBO, 167,22-285,69 μ mol/L de NEFA; recomenda-se para glicemia valores entre 3,92-5,18 mmol/L.

Para o lipidograma de búfalas acima de 24 meses de idade, sugere-se a adoção dos seguintes valores de referência para o lipidograma: entre 1,93-3,88 mmol/L de colesterol, 0,19-0,38 mmol/L de triglicérides, 0,62-0,94 mmol/L de β -HBO, 137,27-270,74 μ mol/L de NEFA; recomenda-se para glicemia valores entre 3,18-3,94 mmol/L.

Os valores de referência apresentados anteriormente não devem ser utilizados para búfalas que estejam no último mês de gestação e nos primeiros 60 dias de lactação, recomenda-se para este período a adoção de valores de referência específicos para animais na fase de periparto.

CAPÍTULO 2

LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS LEITEIROS: INFLUÊNCIA DO SEXO E VALORES DE REFERÊNCIA

5 INTRODUÇÃO

Na bubalinocultura leiteira, ao contrario da tradicional bovinocultura de leite, os bezerros machos nascidos não são tratados como descarte, principalmente por seu potencial de engorda, mesmo nas principais raças leiteiras de búfalos (BERNARDES, 2007). Este bezerro é submetido a manejo de aleitamento, desmama e de recria semelhante ao dado às bezerras até o momento da parição.

Os ditos lotes de recria habitualmente se localizam em pastos secundários da fazenda, sendo os machos e fêmeas mantidas sob sistema extensivo de manejo. Com o início da puberdade a partir dos 24 meses (VALE; RIBEIRO, 2005), ocorrem diversas modificações hormonais, inicia-se a atividade reprodutiva, passando a manutenção da gestação, a ser a única diferença entre os lotes de machos e de fêmeas.

Muito pouco se sabe sobre as diferenças entre búfalos machos e fêmeas, e sobre seus respectivos perfis metabólicos, sendo encontrados na literatura somente um artigo científico das Filipinas (BAN-TOKUDA et al., 2007), e um do Iran (TAJIK; NAZIFI, 2010). A influência do sexo em búfalos pré-púberes entre 18 e 24 meses de idade foi estudada por Ban-Tokuda et al. (2007), que mensuraram parâmetros produtivos, hormonais e lipídicos de 5 garrotes e 5 novilhas, no mesmo ambiente e com a mesma alimentação, durante 6 meses, após 1 mês de adaptação ao experimento. E com o objetivo de correlacionar lipídios séricos e lipoproteínas com os microminerais sangüíneos de búfalos, Tajik e Nazifi (2010) determinaram o perfil metabólico e mineral em machos e fêmeas adultas, de 36 a 72 meses.

Não somente pelas peculiaridades de manejo, mas também pelos índices produtivos, as propriedades organolépticas dos produtos oriundos de búfalos (leite mais gorduroso e carne com menos colesterol), e os alimentos disponíveis em outras regiões do planeta, somos levados a crer que os eventos metabólicos dos búfalos criados no Brasil acontecem em diferentes momentos e intensidades em relação aos bovinos e a búfalos sob diferentes condições. Fato este que nos impede de usar valores metabólicos estabelecidos para bovinos, e bubalinos criados em outros países, mesmo na falta de sólidos valores de referência para bubalinos brasileiros. Afora isso, constatou-se que o estudo dos metabólitos sangüíneos pode ajudar a entender as peculiaridades metabólicas do búfalo, nas mais diversas condições de criação, a fim de que se possa ajustar o manejo e a alimentação que os búfalos precisam (LEE et al., 1978; CAMPANILE, 1998; RENDINA et al., 2007; HAGAWANE et al., 2009).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo estabelecer valores de referência para os teores séricos de colesterol, triglicérides, β -hidroxibutirato (β -HBO), ácidos graxos não esterificados (NEFA), e teores plasmáticos de glicose de búfalos machos e fêmeas, criados no Estado de São Paulo.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas cinco propriedades de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, e mestiços, todas localizadas no Estado de São Paulo. Três delas situavam-se na Região do Vale do Ribeira, sendo duas localizadas no município de Registro e uma em Pariquera-Açu. As outras duas, pertenciam à Região Centro-Oeste do Estado, sendo uma localizada no município de Sarapuí, e a outra em Alambari.

As fazendas localizadas no Vale do Ribeira, todas caracterizadas por sistema extensivo de manejo, eram formadas com pastos não adubados de braquiárias (*Brachiaria sp.*). Aguada era observada em todos os pastos, mas com disponibilidade de mistura mineral somente para as búfalas de leite, que eram ordenhadas somente uma vez ao dia. Já as fazendas localizadas na região Centro-Oeste do Estado, caracterizadas por sistema semi-intensivo de manejo, eram formadas por pastos adubados de braquiárias e pântanos (*Panicum sp.*). Água e mistura mineral eram fornecidas *ad libitum*, além de suplementação protéico-energética em qualidade e quantidades variáveis, fornecidas somente às búfalas de leite e seus respectivos bezerros, antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Para avaliar a influência dos fatores sexuais sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo, foram colhidas amostras de soro e plasma sanguíneo de 201 animais, dentre as categorias de bezerros (89 animais), pré-púberes (46 animais) e adultos (67 animais), conforme o quadro 3. Mas como machos adultos não passam por momentos metabólicos equivalentes ao da gestação e lactação, selecionamos fêmeas de mesma idade, mas com gestação de pelo menos 1 mês antes do parto. As colheitas foram realizadas entre 2-6 horas após a última alimentação dos animais, quer tenha sido à base de forragem pastejada, ou suplementação alimentar no cocho.

Os bubalinos utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos de acordo com as necessidades para a formação dos grupos experimentais, sendo que previamente a colheita, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, quando foram

excluídos da pesquisa aqueles considerados doentes. Após esta seleção, as amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer®.

Grupo		Constituição	Amostras Colhidas	
Fêmea	Bezerra	Fêmeas com até 12 meses	45	106
	Pré-púbere	Fêmeas entre 13 e 24 meses	30	
	Adulta	Fêmeas nulíparas até 30 dias pré-parto, entre 25 e 50 meses	31	
Macho	Bezerro	Machos com até 12 meses	44	95
	Pré-púbere	Machos entre 13 e 24 meses	16	
	Adulto	Machos em vida reprodutiva, entre 25 e 50 meses	35	

Quadro 3 - Constituição dos grupos experimentais para estabelecer os valores de referência e avaliar a influência do sexo sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo

As amostras para avaliação do colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (β -HBO) foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 mL sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 mL contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

No laboratório as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sanguíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

Os teores séricos de colesterol, triglicérides, β -HBO e NEFA, foram quantificados por metodologia enzimática colorimétrica, segundo as técnicas de Allain et al. (1974), Fossati e Prencipe (1982), Williamson et al. (1962) e Elphick (1968), e os resultados dos três primeiros foram expressos em mmol/L, e do último em μ mol/L. Os teores plasmáticos de glicose foram quantificados pelo método descrito por Barham et al. (1972), sendo os resultados expressos em mmol/L. Todas as amostras foram determinadas em um analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda.

Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analise* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformadas em conformidade. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Sexo), Categoria, Sexo*Categoria (interação) e Fazenda foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo final foram removidas as variáveis por *Backward Elimination* baseado no critério de Wald para $P > 0,20$.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means (LSMeans)* do SAS, onde consideramos diferença para $P \leq 0,05$, ou seja, provável repetitividade $\geq 95\%$.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das concentrações de colesterol nos diferentes grupos de sexo e categoria estão expressos nas tabelas 6 e 7, e na figura 6. Sem efeito de interação ($P = 0,1070$), observa-se a similaridade entre macho e fêmea. E estabilidade nos valores entre bezerros e animais pré-púberes, com diminuição para animais adultos.

Segundo Kaneko (2008), as quantidades de colesterol presentes refletem o acetil-CoA disponível para a geração de energia, oriundo basicamente da ingestão de comida. E de acordo com Arave et al. (1975); Shaffer et al. (1981) e Pogliani (2006), as concentrações de colesterol tendem a aumentar com o evoluir da idade, achado que vai de encontro com nossas observações.

No entanto, vale ressaltar que diferentemente dos bezerros, que além do leite usualmente recebem algum tipo de suplementação durante o período de aleitamento e apojamento, os animais da recria ocupam as áreas secundárias de pastagem da fazenda, sem suplementação de cocho. Logo, as quantidades de área e alimento disponíveis para animais desmamados que entram com peso em torno de 200 quilos na recria, e saem em torno de 400 quilos, para começar a vida reprodutiva ou a terminação, se tornam significativamente

menores. O que justificaria a diminuição das concentrações de colesterol dos grupos bezerro e pré-púbere para o grupo adulto.

Tabela 6 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Fêmea ⁷	106	2,44 ^a	0,65	0,06	26,64	2,32	2,57	1,40	4,70
Macho ⁸	95	2,37 ^a	0,75	0,08	31,65	2,22	2,52	1,00	4,40

Média com um expoente (a) na mesma coluna diferiu (P = 0,1722)

Efeito Fazenda (P = 0,0011)

Efeito Categoria (P < 0,0001)

Efeito Sexo*Categoria (P = 0,1070)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Fêmea – Búfalas entre 0 e 50 meses de idade; ⁸ Macho – Búfalos entre 0 e 50 meses de idade.

Para búfalos, machos e fêmeas pré-púberes, Ban-Tokuda et al. (2007) observaram que os valores de machos e fêmeas se apresentaram entre 1,93-3,22 mmol/L de colesterol (P>0,05). Valores esses que ficam de acordo com os encontrados em nossa pesquisa, além de também não terem observado diferenças entre machos e fêmeas.

Já em animais adultos, Tajik e Nazifi (2010) observaram concentrações de 4,15 mmol/L de colesterol, não sendo observada diferença estatística entre os valores de machos (4,17 mmol/L) e fêmeas (4,13 mmol/L). Apesar de os autores também não terem encontrado diferenças entre machos e fêmeas, verificaram concentrações de colesterol maiores que as encontradas por nós.

Tabela 7 - Efeito das diferentes categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) de ambos os sexos na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Bezerro ⁷	89	2,58 ^a	0,80	0,08	31,01	2,41	2,75	1,00	4,70
Pré-púbere ⁸	46	2,68 ^{ab}	0,60	0,09	22,39	2,50	2,86	1,60	3,90
Adulto ⁹	66	1,99 ^b	0,33	0,04	16,58	1,91	2,08	1,50	2,80

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P = 0,0011)

Efeito Sexo (P = 0,1722)

Efeito Sexo*Categoria (P = 0,1070)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Bezerro – Bezerros e bezerras entre 0 e 12 meses; ⁸ Pré-púbere – Garrotes e novilhas vazias entre 13 e 24 meses; ⁹ Adulto – Touros e nulpáras, entre 25 e 50 meses.

No trabalho de Tajik e Nazifi (2010) não são relatadas qualidade e quantidade da alimentação consumida pelos animais, mas é provável que seja a mesma base alimentar utilizada nos trabalhos indianos, que utilizam produtos e subprodutos de arroz, trigo, algodão,

aveia e amendoim, e um tipo de leguminosa pouco utilizada no Brasil, o trevo alexandrino ou egípcio (*Trifolium alexandrinum*), o que caracterizaria a disponibilidade regional de alimentos. Essa típica dieta seguramente gera diferenças nos metabólitos sanguíneos dos búfalos, talvez por isso, tenham valores diferentes para as concentrações de colesterol.

Figura 6 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a e b) diferiu ($P < 0,0001$)

As concentrações de triglicérides nos diferentes grupos de sexo e categoria encontram-se na tabela 8 e figura 7. Com efeito da interação ($P = 0,0266$), observa-se, estatisticamente, que as maiores concentrações de triglicérides foram dos bezerros, sem diferença entre os sexos. Intermediariamente, os valores de animais pré-púberes, sem diferença entre os sexos. E os valores mais baixos observados para os animais adultos, sendo os valores de fêmeas maiores que os dos machos.

Os triglicérides detectados no soro são aqueles disponíveis ao organismo, tanto os contidos nas lipoproteínas quilomícrons, resultado da absorção de lipídios pelo intestino

delgado, como em VLDL, oriundos da síntese de triglicérides pelos hepatócitos (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Tabela 8 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos

	Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Fêmea ¹⁰	Bezerro ⁷	45	0,46 ^a	0,17	0,02	36,96	0,41	0,51	0,20	0,90
	Pré-púbere ⁸	30	0,55 ^{bc}	0,16	0,03	29,09	0,49	0,61	0,30	1,00
	Adulto ⁹	31	0,37 ^c	0,09	0,01	24,32	0,34	0,40	0,20	0,60
Macho ¹¹	Bezerro ⁷	44	0,44 ^{ab}	0,17	0,02	38,64	0,38	0,49	0,10	0,80
	Pré-púbere ⁸	16	0,60 ^{bc}	0,20	0,05	33,33	0,49	0,70	0,30	1,20
	Adulto ⁹	35	0,21 ^d	0,06	0,01	28,57	0,19	0,23	0,10	0,40

Letras diferentes (a, b, c e d) na mesma coluna indicam diferença estatística (P = 0,0266)

Efeito Sexo (P = 0,0010)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

Efeito Categoria (P < 0,0001)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Bezerro – Bezerros e bezerras entre 0 e 12 meses; ⁸ Pré-púbere – Garrotes e novilhas vazias entre 13 e 24 meses; ⁹ Adulto – Touros e nulíparas, entre 25 e 50 meses; ¹⁰ Fêmea – Búfalas entre 0 e 50 meses de idade; ¹¹ Macho – Búfalos entre 0 e 50 meses de idade.

A quantidade de triglicérides encontrada no sangue sempre segue a relação do que é ingerido pelo animal, menos o que é utilizado pelo organismo. Até o desmame, os bezerros se mantêm basicamente com o açúcar do leite, a lactose. Essa alimentação mantém altas quantidades de insulina, a qual restringe a utilização de gordura pelo fígado e músculos, graças a sua ação anti-lipolítica. Mesmo após o desmame, este organismo pré-ruminante ainda está adaptado a utilizar glicose, que começa a ter origem do propionato absorvido no rúmen, e que de certa forma, poupa a utilização dos triglicérides circulantes (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999). Talvez por isso possamos observar que os triglicérides se mantêm em valores acima de 0,4 mmol/L até os 12 meses.

A partir dos 13 meses, as quantidades deste metabólito já decrescem estatisticamente, e seguem em queda até a categoria adulta, onde atingem limiares de 0,20 a 0,30 mmol/L. Essa diminuição nas quantidades de triglicérides provavelmente vem dos menores efeitos da insulina, menor dependência e utilização da glicose como fonte energética, e maior utilização dos ácidos graxos pelos animais mais maduros, tanto para funções hepáticas, musculares como para a produção de leite.

Figura 7 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c, e d) diferiu ($P = 0,0266$)

Somado a isso, observa-se as limitadas quantidades de VLDL fisiologicamente produzidas por ruminantes (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; KANEKO, 2008), e que ainda podem ser mais prejudicadas pela maior presença de glucagon (GIBBONS, 1990), baixa ingestão de carboidratos, e condições de subnutrição (BONNET et al., 2004). O que talvez ajude a justificar os valores expressivamente menores nos animais adultos.

Porém, também observamos diferença entre adultos machos e fêmeas, sendo as quantidades de triglicérides maiores para fêmeas. Se fosse somente efeito de alimentação, observaríamos comportamento semelhante no colesterol, mas parece que o metabolismo do macho, de alguma forma diferente ao da fêmea, utiliza as fontes lipídicas circulantes como energia mais eficientemente.

Essa hipótese é confirmada em experimento realizado por Ban-Tokuda et al. (2007), onde, sob mesmo arraçãoamento, mesmas ingestão de comida e mesmo ganho de peso ($P=0,70$), búfalos de idades semelhantes (média de 22 meses) demonstraram diferença significativa ($P<0,01$) nas concentrações de triglicérides entre machos e fêmeas, onde as

fêmeas mantiveram maiores quantidades de triglicérides circulantes. E mostram também maiores quantidades de leptina produzida por essas fêmeas ($P < 0,01$), ou seja, mais gordura acumulada, e conseqüentemente menos músculo que os machos.

Para animais pré-púberes Ban-Tokuda et al. (2007) observaram que os valores de machos e fêmeas se apresentaram, respectivamente, entre 0,28-0,39 e 0,28-0,51 mmol/L de triglicérides ($P < 0,01$). Correspondendo aproximadamente aos valores observados em nosso trabalho, tanto para machos como para fêmeas.

Enquanto que em adultos, Tajik e Nazifi (2010) registraram valores em torno de 0,21 mmol/L de triglicérides, não sendo observada diferença estatística entre os valores de machos (0,22 mmol/L) e fêmeas (0,21 mmol/L). Mas apesar de obterem valores semelhantes aos encontrados por nós nos machos, não temos a informação da qualidade alimentar e do nível de ingestão que justifiquem tais valores de triglicérides para as fêmeas.

Os valores de β -HBO para os diferentes sexos e categorias estão expressos na tabela 9 e na figura 8. Com efeito da interação ($P < 0,0001$), observa-se que os valores de β -HBO se mantiveram estáveis em bezerros e animais pré-púberes, machos e fêmeas, até a fase de adultos, onde as quantidades em fêmeas diminuem, e em machos aumentam.

Tabela 9 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Fêmea ¹⁰	Bezerro ⁷	45	0,80 ^b	0,52	0,08	65,00	0,64	0,96	0,15 2,35
	Pré-púbere ⁸	30	0,79 ^b	0,34	0,06	43,04	0,67	0,92	0,43 1,58
	Adulto ⁹	31	0,73 ^c	0,20	0,03	27,40	0,66	0,81	0,20 1,18
Macho ¹¹	Bezerro ⁷	44	0,94 ^b	0,62	0,09	65,96	0,75	1,13	0,20 2,45
	Pré-púbere ⁸	16	0,64 ^b	0,15	0,04	23,44	0,56	0,72	0,51 1,06
	Adulto ⁹	35	0,97 ^a	0,18	0,03	18,56	0,91	1,03	0,74 1,44

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Sexo ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

Efeito Categoria ($P = 0,0535$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Bezerro – Bezerros e bezerras entre 0 e 12 meses; ⁸ Pré-púbere – Garrotes e novilhas vazias entre 13 e 24 meses; ⁹ Adulto – Touros e nulíparas, entre 25 e 50 meses; ¹⁰ Fêmea – Búfalas entre 0 e 50 meses de idade; ¹¹ Macho – Búfalos entre 0 e 50 meses de idade.

O β -HBO pode ter origem tanto na cetogênese alimentar quando na metabólica. Onde o butirato ruminal é convertido em β -HBO pelas células da parede ruminal, mas também pode ser formado após a lipólise, quando grande quantidade do NEFA chega ao fígado,

ultrapassando as quantidades de oxaloacetato disponíveis para adentrar ao ciclo de Krebs, formando então os corpos cetônicos, através da β -Oxidação. Mas independente de sua origem, pode ser utilizado como fonte de energia pela maioria dos tecidos corporais (HEITMANN et al., 1987; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; MARUTA, 2005; KANEKO, 2008).

Figura 8 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média $\pm$ EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

Este metabólito tem comportamento semelhante aos triglicérides, por também se tratar de um lipídio, com origens alimentar e metabólica. A peculiaridade do β -HBO é que este só começa a ser produzido pelo rúmen com a ingestão de matéria seca (ANDERSON et al., 1987; QUIGLEY et al., 1991a; POGLIANI, 2006).

Tanto na categoria de bezerros como na de animais pré-púberes, podemos perceber a produção de β -HBO decorrente da plena cetogênese alimentar. Já nos animais adultos, devido a melhor utilização de gordura como energia em comparação aos animais mais novos, esperaríamos que os valores de β -HBO fossem menores, fato este observado em fêmeas adultas. No entanto, provavelmente ocorrendo fenômeno semelhante aos triglicérides, onde o

macho demanda mais fontes lipídicas para sua manutenção energética, e existindo uma necessidade de manutenção nos valores basais de triglicérides, observamos maiores valores de β -HBO circulantes, que neste caso, provavelmente devem ser originados da cetogênese metabólica conseqüente da maior quebra de gordura armazenada. Mas esta hipótese precisa ser confirmada com a observação de maiores valores de NEFA circulantes para estes machos.

Os valores de NEFA para os diferentes sexos e categorias estão descritos na tabela 10 e figura 9. Com efeito da interação ($P=0,0018$), observa-se valores estáveis em bezerros machos e fêmeas, com leve diminuição em animais pré-púberes machos e fêmeas, mas com significativos aumento para machos e diminuição para fêmeas.

Tabela 10 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Bezerro ⁷	45	218,42 ^b	71,26	10,62	32,63	197,01	239,83	69,07	377,86
Fêmea ¹⁰ Pré-púbere ⁸	30	211,48 ^{bc}	109,62	20,01	51,83	170,55	252,42	57,80	447,29
Adulto ⁹	31	143,30 ^c	67,94	12,40	47,41	117,93	168,67	68,01	291,40
Bezerro ⁷	44	222,00 ^b	78,22	12,07	35,23	197,63	246,38	63,76	472,48
Macho ¹¹ Pré-púbere ⁸	16	260,13 ^{bc}	48,54	12,13	18,66	234,27	286,00	155,72	350,38
Adulto ⁹	35	240,98 ^a	50,43	8,52	20,93	223,65	258,30	150,40	361,81

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P = 0,0018$)

Efeito Sexo ($P = 0,0028$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

Efeito Categoria ($P = 0,3066$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Bezerro – Bezerros e bezerras entre 0 e 12 meses; ⁸ Pré-púbere – Garrotes e novilhas vazias entre 13 e 24 meses; ⁹ Adulto – Touros e nulíparas, entre 25 e 50 meses; ¹⁰ Fêmea – Búfalas entre 0 e 50 meses de idade; ¹¹ Macho – Búfalos entre 0 e 50 meses de idade.

O NEFA basicamente reflete o grau de lipólise do animal, ou seja, o quanto está sendo demandado pelo organismo para suprir as necessidades energéticas (MONDAL; PRAKASH, 2004). Sendo uma variável muito sensível, e indicada para determinar o balanço energético e a condição corporal (VAN SAUN, 2000).

A partir do momento em que a quantidade de acetil-CoA produzida pela presença de NEFA sobrepujar a quantidade de oxaloacetato das mitocôndrias hepáticas, o acetil-CoA é então direcionado para a Via da β -Oxidação, sendo recondensado em acetoacetato, precursor dos corpos cetônicos β -HBO e acetona (CUNNINGHAM, 1999), onde cerca de 65% do acetoacetato produzido acaba se transformando em β -HBO (MARUTA, 2005).

Figura 9 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média $\pm$ EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P = 0,0018$)

O aumento nos valores de NEFA dos machos adultos reforça a hipótese lançada para o β -HBO, pois refletem a maior demanda de lipídios orgânicos para a manutenção das funções energéticas. E isso se reflete no maior grau de lipólise, maior quantidade de NEFA ligado a albuminas chegando ao fígado, e maior quantidade de β -HBO sendo produzido para suprir a maior demanda energética muscular dos machos.

Para fêmeas pré-púberes, Mondal e Prakash (2004) observaram que os valores de NEFA das novilhas variaram entre aproximadamente 100 e 250 $\mu\text{mol/L}$. Enquanto em búfalas adultas, Haldar e Prakash (2007) obtiveram valores de NEFA entre 75-150 $\mu\text{mol/L}$. Nos dois trabalhos foram observados valores próximos aos encontrados por nós para fêmeas das suas respectivas categorias.

As concentrações de glicose para os diferentes sexos e categorias estão descritos nas tabelas 11 e 12, e na figura 10. Sem efeito da interação ($P > 0,20$), não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas. E para categorias, a glicose se mostrou decrescente de acordo com o passar da idade dos animais.

Tabela 11 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Fêmea ⁷	106	4,16 ^a	0,68	0,07	16,35	4,03	4,29	3,10	7,60
Macho ⁸	95	4,05 ^a	0,73	0,07	18,02	3,90	4,20	2,80	6,70

Média com um expoente (a) na mesma coluna diferiu (P = 0,4280)

Efeito Categoria (P < 0,0001)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Fêmea – Búfalas entre 0 e 50 meses de idade; ⁸ Macho – Búfalos entre 0 e 50 meses de idade.

A glicose é oriunda da alimentação, mas sua absorção vai depender de sua passagem ou não pelo rúmen. Pode se tornar disponível somente por gliconeogênese, como é o caso de ruminantes plenos, ou por meio de simples absorção intestinal, como é o caso de bezerros pré-ruminantes “monogástricos”, que não submetem sua ingesta à processos fermentativos (KANEKO, 2008).

O comportamento da glicemia observada em búfalos segue a clássica curva glicêmica postulada para ruminantes, estando, portanto, de acordo com todas as literaturas consultadas, que há diminuição da glicose de acordo com o avançar da idade (QUIGLEY et al., 1991a; MONDAL; PRAKASH, 2004; POGLIANI, 2006; KANEKO, 2008).

Tabela 12 - Efeito das diferentes categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) de ambos os sexos na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Bezerro ⁷	89	4,53 ^c	0,79	0,08	17,44	4,36	4,69	2,80	7,60
Pré-púbere ⁸	46	4,11 ^b	0,27	0,04	6,57	4,03	4,19	3,60	4,70
Adulto ⁹	66	3,56 ^a	0,31	0,04	8,71	3,48	3,63	3,10	4,60

Letras diferentes (a, b e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Sexo (P = 0,4280)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Bezerro – Bezerros e bezerras entre 0 e 12 meses; ⁸ Pré-púbere – Garrotes e novilhas vazias entre 13 e 24 meses; ⁹ Adulto – Touros e nulpáras, entre 25 e 50 meses.

Segundo Van Soest (1994), o nível da alimentação tem pouca influência nas taxas circulantes de glicemia de ruminantes. Mas analisando as quantidades de glicose encontradas nos trabalhos sobre búfalos, observamos que a glicemia parece ser influenciada pelo tipo de exploração animal. Com diferença considerável entre os animais que estão sendo engordados, sob confinamento ou em experimentos de nutrição, em relação aos animais de exploração leiteira.

Encontramos 4 trabalhos que relatassem quantidades de glicose para búfalos, dentre as faixas etárias que trabalhamos. Sendo os dois primeiros trabalhos que utilizaram animais em condições de propriedades leiteiras, e os dois últimos trabalhos sobre nutrição, com rigorosas formulações de ração.

Figura 10 - Efeito dos diferentes sexos (fêmea e macho) e categorias (adulto, bezerro e pré-púbere) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

Para fêmeas entre 6 a 20 meses de idade, ou seja, de bezerras para pré-púberes, Mondal e Prakash (2004) relataram o comportamento da glicose que baixou de 3,33 para 1,39 mmol/L, durante o período experimental. Enquanto que para fêmeas adultas, Halder e Prakash (2007) apresentaram valores de glicose entre 2,5-4,0 mmol/L. Valores esses próximos, ou um pouco abaixo dos encontrados por nós.

Já Ban-Tokuda et al. (2007), utilizando machos e fêmeas pré-púberes, apresentaram concentrações entre 4,72-5,27 mmol/L de glicose, sem diferenças entre machos e fêmeas. E Rendina et al. (2007), utilizando fêmeas adultas, observando variações aproximadas de 4,0-5,0 mmol/L de glicose.

5.3 CONCLUSÃO

Conclui-se que a influência dos fatores sexuais no lipidograma e na glicemia é parcial, e observada somente nos animais púberes – com mais de 24 meses de idade, sendo nos machos verificados valores de triglicérides menores e os valores de β -HBO e NEFA maiores do que os observados nas fêmeas.

Para os animais jovens – menos de 24 meses de idade, independente do sexo, recomenda-se, a adoção dos seguintes valores: entre 2,41-2,86 mmol/L de colesterol, 0,38-0,70 mmol/L de triglicérides, 0,56-1,13 mmol/L de β -HBO, 170,553-286,00 μ mol/L de NEFA e 4,03-4,69 mmol/L de glicose.

Para machos púberes, com mais de 24 meses de idade, recomenda-se a adoção de valores de referência diferenciados para os seguintes constituintes do lipidograma: 0,19-0,23 mmol/L de triglicérides, 0,91-1,03 mmol/L de β -HBO, 223,65-258,30 μ mol/L de NEFA. E para fêmeas de mesma idade, a adoção de valores de referência diferenciados para os seguintes constituintes do lipidograma: 0,34-0,40 mmol/L de triglicérides, 0,66-0,81 mmol/L de β -HBO, 117,93-168,67 μ mol/L de NEFA.

Para animais com mais de 24 meses – independentemente do sexo – recomenda-se a adoção de teores séricos de colesterol entre 1,91-2,08 mmol/L de colesterol e de glicemia entre 3,48-3,63 mmol/L.

CAPÍTULO 3

LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS LEITEIROS: INFLUÊNCIA DA GESTAÇÃO E VALORES DE REFERÊNCIA

6 INTRODUÇÃO

Ao final da lactação de uma búfala, o bezerro bubalino que era utilizado para o apoio é definitivamente separado da mãe, e passa para o lote de recria onde começará a se preparar físico e metabolicamente para a puberdade, que nos búfalos acontece entre 20 e 24 meses de idade (VALE; RIBEIRO, 2005).

As novilhas cobertas só terão seus primeiros partos a partir de no mínimo 30 meses de vida (CASSIANO et al., 2003; BERNARDES, 2007), quando finalmente deixam os lotes de recria para repor as matrizes nos lotes de reprodução. Mas além da genética, bezerras podem ter a puberdade prejudicada quando mantidas sob manejo nutricional deficiente durante o período de pré-puberdade, pois segundo Day et al. (1986), a restrição energética na dieta de fêmeas pré-púberes atrasa o momento de maturidade hormonal e a puberdade de novilhas.

Muito pouco se sabe sobre manejo nutricional de bezerras pré-púberes, novilhas, e nulíparas búfalas em diferentes momentos gestacionais, e suas reais situações metabólicas, principalmente quando nos deparamos com lotes de recria que habitualmente se localizam em pastos secundários da fazenda, sem suplementação energética, estando ainda vulneráveis à sazonalidade das pastagens no inverno (MACEDO et al., 2001). Ou seja, um lugar que provavelmente não serve para que estes animais expressem seus potenciais máximos de produtividade e precocidade.

O estudo do perfil metabólico sangüíneos tem sido amplamente utilizado para identificar distúrbios metabólicos e baixa produtividade (LEE et al., 1978). E é constatado que o estudo dos metabólitos sangüíneos pode ajudar a entender as peculiaridades do búfalo, nas mais diversas condições de criação, a fim de que se possa ajustar o manejo e a alimentação que os búfalos precisam (CAMPANILE, 1998; RENDINA et al., 2007; HAGAWANE et al., 2009).

Não somente pela inexistência de trabalhos sobre perfil metabólico de búfalas prenhes, mas principalmente relacionado às peculiaridades de manejo, índices produtivos e os alimentos disponíveis, somos levados a crer que os eventos metabólicos em búfalos de uma determinada região do planeta acontecem em diferentes momentos e intensidades em relação aos bovinos (PAUL; LAL, 2010). Fato este que nos impede de usar valores metabólicos estabelecidos para bovinos criados no Brasil ou em outros países, mesmo na falta de sólidos valores de referência para bubalinos brasileiros.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivos analisar a influência da gestação nos teores séricos de colesterol, triglicérides, β -hidroxibutirato (β -HBO), ácidos graxos não esterificados (NEFA), e teores plasmáticos de glicose, bem como estabelecer os valores de referência destes metabólitos para búfalas púberes vazias até o final da gestação, criadas no Estado de São Paulo.

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas cinco propriedades de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, e mestiços, todas localizadas no Estado de São Paulo. Duas delas situavam-se na Região do Vale do Ribeira, sendo uma localizada no município de Registro e uma em Pariquera-Açu. As outras três, pertenciam à Região Centro-Oeste do Estado, sendo uma localizada no município de Sarapuí, outra em Alambari, e a última em Dourado.

As fazendas localizadas no Vale do Ribeira, todas caracterizadas por sistema extensivo de manejo, eram formadas com pastos não adubados de braquiárias (*Brachiaria sp.*). Água era observada em todos os pastos, mas com disponibilidade de mistura mineral somente para as búfalas de leite, que eram ordenhadas somente uma vez ao dia. Já as fazendas localizadas na região Centro-Oeste do Estado, caracterizadas por sistema semi-intensivo de manejo, eram formadas por pastos adubados de braquiárias e pântanos (*Panicum sp.*). Água e mistura mineral eram fornecidas *ad libitum*, além de suplementação protéico-energética em qualidade e quantidades variáveis, fornecidas somente às búfalas de leite e seus respectivos bezerros, antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Para avaliar a influência da gestação e sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo, foram colhidas 127 amostras de soro e plasma sanguíneo de búfalos, distribuídos conforme apresentado no quadro 4. Estas colheitas foram realizadas entre 2-6 horas após a última alimentação dos animais, quer tenha sido à base de forragem pastejada, ou suplementação alimentar no cocho.

Os bubalinos utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos de acordo com as necessidades para a formação dos grupos experimentais, sendo que previamente a colheita, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, quando foram excluídos da pesquisa aqueles considerados doentes. Após esta seleção, as amostras de sangue

foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer®.

Grupos	Constituição	Amostras Colhidas
Vazia	Novilhas não prenhes.	23
1 - 3	Novilhas prenhes, com até 3 meses de gestação.	27
4 - 6	Novilhas prenhes, cujo período de gestação variando entre 4 e 6 meses.	22
7 - 9	Novilhas prenhes, cujo período de gestação variava entre 7 e 9 meses.	25
> 9	Novilhas na fase final da gestação, com mais de 9 meses.	30

Quadro 4 - Constituição dos grupos experimentais para avaliar a influência da gestação sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo

As amostras para avaliação do colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (β -HBO) foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 mL sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 mL contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

No laboratório as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sangüíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

Os teores séricos de colesterol, triglicérides, β -HBO e NEFA, foram quantificados por metodologia enzimática colorimétrica, segundo as técnicas de Williamson et al. (1962); Elphick (1968); Allain et al. (1974) e Fossati e Prencipe (1982), e os resultados dos três primeiros foram expressos em mmol/L, e do último em μ mol/L. Os teores plasmáticos de glicose foram quantificados pelo método descrito por Barham et al. (1972), sendo os resultados expressos em mmol/L. Todas as amostras foram determinadas em um analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda.

Para a avaliação da condição do estado geral dos animais, utilizamos a avaliação do escore de condição corporal (ECC) preconizado por Houghton et al. (1990), e modificada para

a espécie bubalina por Baruselli et al. (2001), que trabalharam com fêmeas bubalinas da raça Murrah, na região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo (Quadro 5). Foram atribuídas as notas de 1 a 5, conforme o estado de carne do animal, com escala de 0,5 entre as referidas notas. Contabilizando, portanto, as notas 1; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0. Somente foram avaliados animais adultos, ou seja, acima de 24 meses.

Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analyse* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformadas em conformidade. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Gestação), Fazenda; Idade e ECC foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo final foram removidas as variáveis por *Backward Elimination* baseado no critério de Wald para $P > 0,20$.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means (LSMeans)* do SAS, onde consideramos diferença para $P \leq 0,05$, ou seja, provável repetitividade $\geq 95\%$.

Escore	Descrição
1	Extremamente magra , com perda de massa muscular grave podendo apresentar-se corcunda, com os pés juntos; e geralmente fraca. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e costelas extremamente proeminentes.
2	Magra , com pouca ou nenhuma perda de estrutura muscular; vigorosa; pouca ou nenhuma gordura na garupa, costelas ou peito. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e as costelas proeminentes, mas com aparecimento normal de estruturas musculares.
3	Condição moderada , com estrutura muscular normal; alguma evidência de gordura depositada nas costelas dianteiras e peito, mas limitado ao redor da base da cauda. Alguma maciez sobre o ombro, costelas, coluna vertebral, tuberosidades e pontas.
4	Gorda , mas ainda firme e vigorosa. Considerável depósito de gordura sobre as costelas dianteira, peito saliente, base da cauda completa (abaulada), muito boa maciez sobre a espinha dorsal sem ossos visíveis, exceto as tuberosidades.
5	Muito gorda , com maciez considerável. Grande depósito de gordura sobre as costelas dianteiras e ombro, grande e proeminente peito, ampla superfície de dorso, grandes depósitos irregulares de gordura ao redor da base da cauda; curvatura corporal torna-se quadrada na aparência.

Quadro 5 - Escala de avaliação para a determinação do escore de condição corporal (ECC) para búfalos

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das concentrações de colesterol estão expressos na tabela 13 e figura 11. Onde observa-se que este metabólito se mantém estável ($P>0,05$) desde novilhas vazias até o final da gestação.

Segundo Kaneko (2008), as quantidades de colesterol presentes refletem o acetil-CoA disponível para a geração de energia, oriundo basicamente da ingestão de comida. Em casos de aumento na ingestão, há aumento de insulina (BAN-TOKUDA et al., 2007), aumento da leptina (CHILLIARD et al., 2005), e redução de glucagon e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, ou seja, quando o organismo está em desfosforilação (menor desdobramento hidrolítico do ATP por ação da adenilciclase), a produção do colesterol é estimulada (KANEKO, 2008).

Tabela 13 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Vazia ⁷	23	2,06	0,37	0,08	17,78	1,90	2,22	1,50	2,80
1 - 3	27	2,10	0,27	0,05	12,88	2,00	2,21	1,70	2,60
4 - 6	22	2,14	0,37	0,08	17,29	1,98	2,30	1,50	3,00
7 - 9	25	2,06	0,39	0,08	18,93	1,90	2,22	1,40	3,20
> 9	30	1,89	0,36	0,06	19,05	1,75	2,02	1,20	2,60

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P = 0,0826$)

Efeito Fazenda ($P = 0,0257$)

Efeito Idade ($P = 0,0840$)

Efeito ECC ($P = 0,0476$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Vazia – Novilhas com mais de 24 meses de idade, diagnosticadas ultra-sonograficamente como não prenhes.

Apesar de não haver diferença a 95% de provável repetitividade, há uma tendência ($P=0,0826$; 91,74%) a queda nas concentrações de colesterol para novilhas em final de gestação, quando observamos valores abaixo de 2,00 mmol/L. A queda do consumo próximo ao parto é uma característica de várias espécies de mamíferos (ZICARELLI, 2001; FRIGGENS, 2003). Durante as últimas três semanas de gestação o consumo de matéria seca diminui em 10 a 30% (HAYIRLI et al., 2002), comportamento este que gera queda nos valores de insulina, e conseqüentemente, no colesterol.

Figura 11 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a e b) diferiu ($P = 0,0826$)

Os resultados dos triglicérides estão descritos na tabela 14 e figura 12. Onde também se observa estabilidade ($P > 0,05$) nas concentrações deste metabólito em todas as fases avaliadas.

Tabela 14 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Vazia ⁷	23	0,38	0,08	0,02	21,05	0,34	0,41	0,30	0,60
1 - 3	27	0,33	0,08	0,01	24,24	0,30	0,36	0,10	0,50
4 - 6	22	0,34	0,07	0,02	20,59	0,31	0,38	0,20	0,50
7 - 9	25	0,35	0,17	0,03	48,57	0,28	0,42	0,10	0,70
> 9	30	0,27	0,09	0,02	33,33	0,24	0,30	0,20	0,50

Média com um expoente (a) na mesma coluna diferiu ($P = 0,6765$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

Efeito ECC ($P = 0,1608$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMIn – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Vazia – Novilhas com mais de 24 meses de idade, diagnosticadas ultra-sonograficamente como não prenhes.

Os triglicérides detectados no soro são aqueles disponíveis ao organismo, tanto os contidos nas lipoproteínas quilomícrons, resultado da absorção de lipídios pelo intestino delgado, como em VLDL, oriundos da síntese de triglicérides pelos hepatócitos (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999). E nos animais observados, essa disponibilidade se manteve em torno de 0,30-0,35 mmol/L de triglicérides, sem variações relevantes em qualquer momento gestacional.

Figura 12 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a) diferiu ($P = 0,6765$)

Os resultados do β -HBO estão expressos na tabela 15 e figura 13. Observa-se que há um crescimento substancial deste metabólito em novilhas prenhes entre 1 e 6 meses de gestação, mas que os valores voltam aos patamares de novilhas vazias, dos 7 meses ao final da gestação.

O β -HBO pode ter origem tanto na cetogênese alimentar quando na metabólica. Onde o butirato ruminal é convertido em β -HBO pelas células da parede ruminal, mas também pode ser formado após a lipólise, quando grande quantidade do NEFA chega ao fígado,

ultrapassando as quantidades de oxaloacetato disponíveis para adentrar ao ciclo de Krebs, formando então os corpos cetônicos, através da β -Oxidação. Mas independente de sua origem, pode ser utilizado como fonte de energia pela maioria dos tecidos corporais (HEITMANN et al., 1987; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; MARUTA, 2005; KANEKO, 2008).

Vale ressaltar que em condições normais, cerca de 70% dos corpos cetônicos circulantes são produzidos no rúmen (cetogênese alimentar), e somente 30% produzido pelo fígado (cetogênese metabólica; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Tabela 15 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Vazia ⁷	23	0,71 ^c	0,14	0,03	19,72	0,65	0,77	0,46	1,06
1 - 3	27	0,92 ^b	0,16	0,03	17,39	0,85	0,98	0,62	1,12
4 - 6	22	1,18 ^a	0,30	0,07	25,42	1,04	1,32	0,67	1,67
7 - 9	25	0,69 ^c	0,11	0,02	15,94	0,64	0,73	0,47	0,96
> 9	30	0,74 ^c	0,17	0,03	22,97	0,67	0,80	0,43	1,22

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P = 0,0818$)

Efeito ECC ($P = 0,0864$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Vazia – Novilhas com mais de 24 meses de idade, diagnosticadas ultra-sonograficamente como não prenhes.

A partir do momento em que a quantidade de acetil-CoA produzida pela presença de NEFA sobrepujar a quantidade de oxaloacetato das mitocôndrias hepáticas, o acetil-CoA é então direcionado para a Via da β -Oxidação, sendo recondensado em acetoacetato, precursor dos corpos cetônicos β -HBO e acetona (CUNNINGHAM, 1999), onde cerca de 65% do acetoacetato produzido acaba se transformando em β -HBO (MARUTA, 2005).

Conforme observado nas fazendas visitadas, as novilhas normalmente são mantidas nos lotes de recria até momentos próximos ao parto. Os lotes de recria são geralmente locados em pastos secundários em relação aos das búfalas do leite, além da ausência de suplementação protéica e energética, o que deixa as novilhas mais suscetíveis às intempéries climáticas. Esse efeito de manejo foi claramente notado nas novilhas prenhes entre 1 e 6 meses de gestação, que foram cobertas entre os meses de dezembro e março (verão-outono), momento de sazonalidade reprodutiva favorável pelo início dos dias mais curtos (MACEDO et al., 2001; ZICARELLI, 2001; VALE; RIBEIRO, 2005).

As colheitas de sangue das novilhas entre 1 e 6 meses de gestação foram realizadas entre abril e julho (outono-inverno). Em consulta a registros meteorológicos (CPTEC-INPE

2010), observa-se que a intensidade das chuvas diminui a partir de fevereiro, o que nos leva a crer que, por mais que não houvesse comprometimento na quantidade de forragem disponível para essas novilhas criadas exclusivamente a pasto, seguramente se observaria comprometimento na qualidade da forragem.

Achados de disponibilidade de matéria seca estes que corroboram aos do sudeste e sul do Brasil (MACEDO et al., 2001; ZICARELLI, 2001), quando são descritas piores condições nutricionais para búfalos criados a pasto no período compreendido entre o outono e o inverno.

Se todas as novilhas são mantidas a pasto, a produção extra de β -HBO produzida em relação a búfalas vazias só pode ser compensatória a deficiência energética da forragem, através da lipólise das reservas de gordura, efeito esse que deve ser ratificado pelas quantidades de NEFA e pelo ECC.

Portanto, nota-se que após as novilhas vazias, a produção de β -HBO que se mantinha em patamares de 0,70 mmol/L, aumenta para 0,90, e se agrava quando a estação seca se instala, atingindo média acima de 1,00 mmol/L. Esse processo é amenizado para as novilhas entre 7 e 9 meses de gestação, pois as primeiras chuvas voltam a cair a partir de setembro (primavera).

Figura 13 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média $\pm$ EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

As concentrações de NEFA estão descritas na tabela 16 e figura 14. Onde observa-se que não há variação estatística ($P>0,05$) para esta variável, apesar da grande oscilação nos valores absolutos.

O NEFA basicamente reflete o grau de lipólise do animal, ou seja, o quanto está sendo demandado pelo organismo para suprir as necessidades energéticas (BONNET et al., 2004; MONDAL; PRAKASH, 2004). Sendo uma variável muito sensível, e indicada para determinar o balanço energético e a condição corporal (VAN SAUN, 2000).

Tabela 16 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Vazia ⁷	23	132,01	61,67	12,86	46,72	105,34	158,68	68,01	291,40
1 - 3	27	231,06	42,09	8,59	18,22	213,29	248,83	141,44	334,83
4 - 6	22	245,00	99,46	21,20	40,60	200,91	289,10	129,06	559,63
7 - 9	25	256,65	165,19	33,04	64,36	188,46	324,84	80,99	585,60
> 9	30	406,86	154,89	28,28	38,07	349,02	464,69	174,05	713,34

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P = 0,1180$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

Efeito Idade ($P = 0,0499$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Vazia – Novilhas com mais de 24 meses de idade, diagnosticadas ultra-sonograficamente como não prenhes.

Em nosso trabalho, não foi possível ratificar a hipótese de lipólise durante o período de inverno utilizando os valores de NEFA. E atribuímos o fato de se observar altos valores de β -HBO sem aumentos de NEFA a três aspectos descritos a seguir.

Este metabólito lipídico oriundo da lipólise normalmente apresenta alto coeficiente de variação ($CV>30\%$), provavelmente por sua rápida metabolização. Além disso, por dificuldades de se encontrar o mesmo número de novilhas prenhes em todos os momentos gestacionais, em todas as fazendas estudadas, acabamos perdendo a confiabilidade probabilística deste parâmetro ($P=0,1180$). Mas principalmente, atribuímos o observado ao fato de que o NEFA também pode ser utilizado para produção de energia, mesmo que sua eficiência gire em torno de somente 40% da energia produzida pelo ATP (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

É importante destacar que após a oxidação do NEFA para acetil-CoA na mitocôndria dos hepatócitos, o mesmo é condensado ao oxaloacetato, um composto do Ciclo de Krebs, formando citrato. Somente como citrato os produtos da lipólise podem ingressar no Ciclo de

Krebs e colaborar com a formação de energia na forma de glicose. Porém, o acetil-CoA formado gera somente CO₂, não tendo capacidade, sozinho, de produzir glicose. O oxaloacetato não pode ser produzido em situações de ausência de propionato, precursor da glicose, portanto, precisa ser devolvido ao ciclo de Krebs (CUNNINGHAM, 1999; KANEKO, 2008).

Figura 14 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de NEFA sérico (μmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a e b) diferiu (P = 0,1180)

Por mais que o processo de produção de energia a partir de ácidos graxos seja ineficiente, é necessário para animais com deficiência energética alimentar de propionato, os quais possuem menor eficiência hepática na formação de oxaloacetato, como provavelmente é o caso de novilhas prenhes criadas exclusivamente a pasto. Esperar-se-ia menor utilização de NEFA no Ciclo de Krebs, e maior desvio deste ácido graxo para a β-Oxidação, com maior formação de β-HBO, como foi constatado nas búfalas prenhes entre 1 e 6 meses de gestação, durante o outono-inverno.

As concentrações de glicose estão descritas na tabela 17 e figura 15. Onde observa-se que a glicemia se mantém estável (P>0,05) durante todas as fases observadas.

Tabela 17 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Vazia ⁷	23	3,80	0,32	0,07	8,42	3,66	3,94	3,20	4,60
1 - 3	27	3,61	0,36	0,07	9,97	3,50	3,75	3,00	4,40
4 - 6	22	3,54	0,36	0,08	10,17	3,38	3,70	2,90	4,50
7 - 9	25	3,41	0,28	0,06	8,21	3,29	3,53	2,90	4,00
> 9	30	3,60	0,36	0,07	10,00	3,46	3,73	2,90	4,20

Média com um expoente (a) na mesma coluna diferiu (P = 0,6004)

Efeito Fazenda (P = 0,0011)

Efeito Idade (P < 0,0001)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Vazia – Novilhas com mais de 24 meses de idade, diagnosticadas ultra-sonograficamente como não prenhes.

Figura 15 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a) diferiu (P = 0,6004)

Nos ruminantes, grande parte da energia utilizada no seu metabolismo é obtida de ácidos graxos voláteis provenientes da fermentação ruminal, sendo que a síntese de glicose a partir dos ácidos graxos voláteis é dependente do perfeito funcionamento do fígado, uma vez

que este órgão é o regulador da concentração de glicose no sangue e da oferta de glicose aos tecidos, sendo essencialmente o único local para a gliconeogênese (formação de glicose a partir de compostos carbônicos), ainda que exista uma pequena contribuição do córtex renal (HERDT, 2000).

Segundo Van Soest (1994), o nível da alimentação tem pouca influência nas taxas circulantes de glicemia de ruminantes. O que é confirmado por nossas observações, pois mesmo com variação de disponibilidade de forragem e as alterações em alguns metabólitos lipídicos, a glicemia se mantém em torno de 3,50 mmol/L.

Os valores obtidos de ECC estão dispostos na tabela 18 e figura 16. Onde observa-se que o ECC se matem estável desde as novilhas vazias até as prenhes de 6 meses, mas melhora consideravelmente nas novilhas entre 7 e 9 meses de gestação, piorando antes do parto.

Tabela 18 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, no escore de condição corporal (ECC) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Vazia ⁷	23	3,24 ^c	0,33	0,07	10,19	3,09	3,38	2,50	4,00
1 - 3	27	3,07 ^{bc}	0,36	0,07	11,73	2,93	3,21	2,50	4,00
4 - 6	22	3,02 ^c	0,24	0,05	7,95	2,91	3,13	2,50	3,50
7 - 9	25	3,70 ^a	0,58	0,11	15,68	3,46	3,94	2,50	4,50
> 9	30	3,28 ^b	0,47	0,08	14,33	3,11	3,46	2,50	4,50

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

Efeito Idade (P = 0,1077)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Vazia – Novilhas com mais de 24 meses de idade, diagnosticadas ultra-sonograficamente como não prenhes.

O ECC é um método subjetivo para estimar a quantidade de energia metabolizável estocada na gordura e nos músculos (reservas corporais) de um animal vivo (EDMONSON et al., 1989; HOUGHTON et al., 1990). Servindo, portanto, para quantificar a habilidade que a fêmea possui de utilizar ou preservar as reservas corporais, de acordo com o desafio metabólico a que é submetida.

Se cruzarmos os valores de ECC com os dos metabólitos mensurados neste trabalho, verificaremos que a estimativa da condição corporal traduziu bem os desafios metabólicos os quais as novilhas avaliadas foram submetidas. Pois menores valores de ECC coincidiram com os achados de β -HBO aumentados durante a menor disponibilidade de forragem de boa qualidade durante o inverno, e com a diminuição destes quando o ECC melhora nas búfalas entre 7 e 9 meses de gestação. Já a partir do momento em que as novilhas diminuem a

ingestão de comida nos meses mais próximos ao parto, vemos a piora no ECC paralelamente as diminuições nas concentrações de colesterol.

Figura 16 - Efeito dos diferentes grupos de gestação (meses) em novilhas, no escore de condição corporal (ECC) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

6.4. CONCLUSÃO

Conclui-se que, sob influência da gestação, os metabólitos lipídicos analisados nesta pesquisa sofreram poucas influências, e tiveram seu maior desafio aproximadamente um mês antes do parto. Porém, outras alterações no perfil metabólico das novilhas estudadas apontam para a suscetibilidade alimentar a que as futuras búfalas leiteiras normalmente são submetidas, pois estando vulneráveis as restrições ambientais de alimento, estas fêmeas podem estar sendo impedidas de expressar fidedignamente suas potencialidades produtivas.

Diante dos intervalos de confiança obtidos, propomos que os valores de referência para o lipidograma e glicemia de novilhas prenhes até 9 meses de gestação, criadas

extensivamente, se encontrem entre 1,90-2,30 mmol/L de colesterol, 0,28-0,42 mmol/L de triglicérides, 0,64-1,32 mmol/L de β -HBO, 188,46-324,84 μ mol/L de NEFA e 3,29-3,75 mmol/L de glicose.

Os valores de referência apresentados anteriormente não devem ser utilizados para novilhas vazias sem o desafio da gestação, ou aquelas que estejam no último mês de gestação. Recomenda-se para estes dois outros períodos, a adoção de valores de referência específicos para fêmeas nas fases de puberdade, e periparto, respectivamente.

CAPÍTULO 4

LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS LEITEIROS: INFLUÊNCIA DO PUERPÉRIO E VALORES DE REFERÊNCIA

7 INTRODUÇÃO

O período que compreende a transição entre o final da gestação e o início da lactação, passando por um parto e puerpério saudáveis, é um dos momentos mais importantes na vida de uma fêmea leiteira adulta, pois abrange a fase de acabamento e preparação para o nascimento do neonato, e adaptação orgânica e metabólica para o início de uma lactação longa e produtiva. Além disso, a parturiente precisa realizar todas essas etapas em harmonia tal, que permita recuperação de seu aparelho reprodutivo e retomada da ciclicidade em tempo hábil para conceber e manter uma lactação plena a cada ano.

Este “período de transição” é de tamanha complexidade, que se torna alvo de pesquisas das mais diversas áreas do conhecimento (VERNON; TAYLOR, 1988; BUTLER; CANFIELD, 1989; VASQUEZ-ANON et al., 1994; BELL, 1995; GRUMMER, 1995; GRUM et al., 1996; CAMPANILE, 1998; NRC, 2001; ZICARELLI, 2001; HAYIRLI et al., 2002; FRIGGENS, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; GRASSO et al., 2004; CHILLIARD et al., 2005; GHANEM; EL-DEEB, 2010; PAUL; LAL, 2010; VERDURICO, 2010; YOUSSEF et al., 2010), onde a grande maioria destas se dedica ao estudo do metabolismo energético, mensurado através da bioquímica sangüínea.

O perfil metabólico sangüíneos tem sido amplamente utilizado para identificar e indicar distúrbios metabólicos e baixa produtividade (LEE et al., 1978). E é constatado que o estudo dos metabólitos sangüíneos pode ajudar a entender as peculiaridades do búfalo, nas mais diversas condições de criação, a fim de que se possa ajustar o manejo e a alimentação que os búfalos precisam (CAMPANILE, 1998; RENDINA et al., 2007; HAGAWANE et al., 2009).

Porém, não somente pelas peculiaridades de manejo, mas também pelos índices produtivos, as propriedades organolépticas dos produtos oriundos de búfalos (leite mais gorduroso e carne com menos colesterol), e os alimentos disponíveis, somos levados a crer que os eventos metabólicos em búfalos de uma determinada região do planeta acontecem em diferentes momentos e intensidades em relação aos bovinos e a búfalos sob diferentes condições (PAUL; LAL, 2010). Fato este que nos impede de usar valores metabólicos estabelecidos para bovinos, e bubalinos criados em outros países, mesmo na falta de sólidos valores de referência para bubalinos brasileiros.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivos analisar a influência do puerpério nos teores séricos de colesterol, triglicérides, β -hidroxibutirato (β -HBO), ácidos graxos não

esterificados (NEFA), e teores plasmáticos de glicose de búfalas, bem como estabelecer os valores de referência destes metabólitos para búfalas no periparto, criadas no Estado de São Paulo.

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas quatro propriedades de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, e mestiços, todas localizadas no Estado de São Paulo. Duas delas situavam-se na Região do Vale do Ribeira, sendo uma localizada no município de Registro e uma em Pariquera-Açu. As outras duas, pertenciam à Região Centro-Oeste do Estado, sendo uma localizada no município de Sarapuí, e a última em Dourado.

As fazendas localizadas no Vale do Ribeira, todas caracterizadas por sistema extensivo de manejo, eram formadas com pastos não adubados de braquiárias (*Brachiaria sp.*). Aguada era observada em todos os pastos, mas com disponibilidade de mistura mineral somente para as búfalas de leite, que eram ordenhadas somente uma vez ao dia. Já as fazendas localizadas na região Centro-Oeste do Estado, caracterizadas por sistema semi-intensivo de manejo, eram formadas por pastos adubados de braquiárias e pânícuns (*Panicum sp.*). Água e mistura mineral eram fornecidas *ad libitum*, além de suplementação protéico-energética em qualidade e quantidades variáveis, fornecidas somente às búfalas de leite e seus respectivos bezerros, antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Para avaliar a influência do puerpério de búfalos criados no Estado de São Paulo, foram colhidas 252 amostras de soro e plasma sangüíneo de búfalas, distribuídas conforme apresentado no quadro 6. Estas colheitas foram realizadas entre 2-6 horas após a última alimentação dos animais, quer tenha sido à base de forragem pastejada, ou suplementação alimentar no cocho. Para as búfalas em lactação, as colheitas só começavam a partir das 9:00 da manhã, após arraçoamento (sistema semi-intensivo) e primeira ordenha do dia, cronologicamente.

Os bubalinos utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos de acordo com as necessidades para a formação dos grupos experimentais, sendo que previamente a colheita, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, quando foram excluídos da pesquisa aqueles considerados doentes. Após esta seleção, as amostras de sangue

foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer®.

Grupos	Constituição	Amostras Colhidas
60 - 31	Vacas prenhes, entre 60 e 31 dias pré-parto	21
30 - 1	Vacas prenhes, entre 30 e 1 dias pré-parto	41
0 - 15	Vacas com até 15 dias pós-parto	54
16 - 30	Vacas entre 16 e 30 dias pós-parto	38
31 - 60	Vacas entre 31 e 60 dias pós-parto	52
61 - 90	Vacas entre 61 e 90 dias pós-parto	46

Quadro 6 - Constituição dos grupos experimentais para avaliar a influência do puerpério sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo

As amostras para avaliação do colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (β -HBO) foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 mL sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 mL contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

No laboratório as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sanguíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

Os teores séricos de colesterol, triglicérides, β -HBO e NEFA, foram quantificados por metodologia enzimática colorimétrica, segundo as técnicas de Allain et al. (1974); Fossati e Prencipe (1982); Williamson et al. (1962) e Elphick (1968), e os resultados dos três primeiros foram expressos em mmol/L, e do último em μ mol/L. Os teores plasmáticos de glicose foram quantificados pelo método descrito por Barham et al. (1972), sendo os resultados expressos em mmol/L. Todas as amostras foram determinadas em um analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda.

Por meio de controle leiteiro de rotina realizado mensalmente nas fazendas, foram obtidas as médias de produção de leite das búfalas para o período correspondente às colheitas

de sangue. Como a pesagem do leite não foi objetivo deste experimento, foi realizada somente a estatística descritiva para produção leiteira.

Para a avaliação da condição do estado geral dos animais, utilizamos a avaliação do escore de condição corporal (ECC) preconizado por Houghton et al. (1990), e modificada para a espécie bubalina por Baruselli et al., (2001), que trabalharam com fêmeas bubalinas da raça Murrah, na região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo (Quadro 7). Foram atribuídas as notas de 1 a 5, conforme o estado de carne do animal, com escala de 0,5 entre as referidas notas. Contabilizando, portanto, as notas 1; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0. Somente foram avaliados animais adultos, ou seja, acima de 24 meses.

Score	Descrição
1	Extremamente magra , com perda de massa muscular grave podendo apresentar-se corcunda, com os pés juntos; e geralmente fraca. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e costelas extremamente proeminentes.
2	Magra , com pouca ou nenhuma perda de estrutura muscular; vigorosa; pouca ou nenhuma gordura na garupa, costelas ou peito. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e as costelas proeminentes, mas com aparecimento normal de estruturas musculares.
3	Condição moderada , com estrutura muscular normal; alguma evidência de gordura depositada nas costelas dianteiras e peito, mas limitado ao redor da base da cauda. Alguma maciez sobre o ombro, costelas, coluna vertebral, tuberosidades e pontas.
4	Gorda , mas ainda firme e vigorosa. Considerável depósito de gordura sobre as costelas dianteira, peito saliente, base da cauda completa (abaulada), muito boa maciez sobre a espinha dorsal sem ossos visíveis, exceto as tuberosidades.
5	Muito gorda , com maciez considerável. Grande depósito de gordura sobre as costelas dianteiras e ombro, grande e proeminente peito, ampla superfície de dorso, grandes depósitos irregulares de gordura ao redor da base da cauda; curvatura corporal torna-se quadrada na aparência.

Quadro 7 - Escala de avaliação para a determinação do escore de condição corporal (ECC) para búfalos

Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analise* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformadas em conformidade. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Puerpério), Fazenda, Número de Crias, e Idade foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo final foram removidas as variáveis por *Backward Elimination* baseado no critério de Wald para $P > 0,20$.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means (LSMeans)* do SAS, onde consideramos diferença para $P \leq 0,05$, ou seja, provável repetitividade $\geq 95\%$.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de não termos usado os valores de produção de leite, a descrição desses dados pode ser útil para entendermos alguns efeitos observados no lipidograma das búfalas estudadas. As médias de produção de leite para os períodos avaliados foram de 7,8 litros para as búfalas entre 0-15 dias de lactação, 8,8 litros para as búfalas entre 16-30 dias, 8,8 litros para as búfalas entre 31-60 dias de lactação e 9,8 litros para as búfalas entre 61-90 dias de lactação.

Os resultados das concentrações de colesterol estão dispostos na tabela 19 e figura 17. Verifica-se que os valores de colesterol obtidos entre 60 dias antes do parto até 15 dias pós-parto são significativamente menores do que os observados em animais entre 15 e 60 dias pós-parto. Observa-se que nessa fase final da gestação e início do puerpério há momento de menores valores de colesterol (valores variando entre 1,86 e 1,50 mmol/L). Somente após 15 dias de parição as concentrações deste metabólito começaram a aumentar, mas alcançando agora valores bem maiores aos anteriores ao parto, em torno de 3,50 mmol/L a partir dos 60 dias de lactação.

Segundo Kaneko (2008), as quantidades de colesterol presentes refletem o acetil-CoA disponível para a geração de energia, oriundo basicamente da ingestão de comida. Em casos de aumento na ingestão, há aumento de insulina (BAN-TOKUDA et al., 2007), aumento da leptina (CHILLIARD et al., 2005), e redução de glucagon e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, ou seja, quando o organismo está em desfosforilação (menor desdobramento hidrolítico do ATP por ação da adenilciclase), a produção do colesterol é estimulada (KANEKO, 2008). A curva do colesterol observada nesse trabalho reflete bem o comportamento de diminuição da ingestão de alimentos no final da gestação e imediatamente após o parto.

Tabela 19 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
60 - 31	21	1,86 ^{de}	0,38	0,08	20,43	1,68	2,03	1,20	2,60
30 - 1	41	1,62 ^d	0,41	0,06	25,31	1,49	1,75	0,80	2,50
0 - 15	54	1,54 ^e	0,52	0,07	33,77	1,39	1,68	0,60	2,70
16 - 30	38	2,60 ^c	0,52	0,08	20,00	2,43	2,77	1,60	3,60
31 - 60	52	3,34 ^b	0,69	0,09	20,66	3,15	3,53	1,80	5,30
61 - 90	46	3,55 ^a	0,62	0,09	17,46	3,38	3,74	2,30	4,70

Letras diferentes (a, b, c, d, e e) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

Efeito Número de Crias ($P = 0,0106$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Figura 17 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c, d, e e) diferiu ($P < 0,0001$)

A queda do consumo próximo ao parto é uma característica de várias espécies de mamíferos (FRIGGENS, 2003). Durante as últimas três semanas de gestação o consumo de matéria seca diminui em 10 a 30% (HAYIRLI et al., 2002). Comportamento que perdura até

cerca dos primeiros 50 dias de lactação, quando também se registra uma menor ingestão de matéria seca que resulta numa perda de peso (ZICARELLI, 2001).

Os maiores valores de colesterol obtidos em animais com mais de 60 dias de pós-parto, demonstrariam efeito da maior ingestão de alimentos em decorrência ao maior potencial para produção de leite, ou seja, quanto mais uma búfala produz, mais ela come.

Segundo Zicarelli (2001), este comportamento hiporéxico no periparto favoreceu a sobrevivência dos indivíduos que tinham uma maior eficiência de utilizar processos catabólicos que maximizavam a utilização das reservas corpóreas. Ao selecionar os indivíduos com maior predisposição para galactopoiese, o homem acabou também por escolher os indivíduos que melhor utilizavam as reservas acumuladas durante o período seco, ou seja, utilizavam suas reservas lipídicas e musculares.

Para búfalas no periparto, Campanile (1998) descreveu valores de colesterol nos períodos de 60-30 e 30-1 dias pré-parto, e 0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto, onde verificaram, respectivamente, 1,5, 1,5, 1,9, 2,5, 3,2 e 2,9 mmol/L. Já Verdurico (2010) descreveu, para os momentos de último mês de gestação (30-1), parto (0-15) e puerpério (16-30), e início de lactação (31-60), valores médios de 1,91, 1,71, 2,03 e 2,23 mmol/L. Enquanto que Grasso et al. (2004), para intervalos de 15, 25, 35-55 e 65-85 dias pós-parto, observaram 2,05, 2,50, 2,88 e 2,98 mmol/L de colesterol. Valores absolutos estes muito próximos ou um pouco abaixo dos obtidos por nós, o que reflete a variável ingestão de alimento dos animais, mas com grande semelhança na curva do colesterol em relação aos eventos fisiológicos do periparto.

Porém, foram encontrados valores que se mostraram um pouco mais difíceis de compararmos com os achados nesta pesquisa, como os de Ghanem e El-Deeb (2010), que obtiveram média de 1,37 mmol/L de colesterol para o período de um mês ao redor do parto de búfalas. E o obtido por Youssef et al. (2010), que encontraram 4,45 mmol/L de colesterol para búfalas em período indeterminado do pós-parto, ambos sem especificações de dieta ou quantidades de alimento ingeridas.

Os resultados das concentrações de triglicérides estão dispostos na tabela 20 e figura 18. Verifica-se que os valores de triglicérides obtidos entre 15 e 60 dias após o parto (valores variando entre 0,36 e 0,38 mmol/L) são significativamente maiores do que os observados no final da gestação e nos primeiros 15 dias de puerpério. Também foi observado que nos animais com mais de 60 dias de lactação, este metabólito tem redução drástica, atingindo seus menores valores durante o período avaliado.

Tabela 20 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
60 - 31	21	0,30 ^b	0,10	0,02	33,33	0,25	0,35	0,20	0,50
30 - 1	41	0,24 ^b	0,06	0,01	25,00	0,22	0,26	0,20	0,40
0 - 15	54	0,28 ^b	0,10	0,01	35,71	0,26	0,31	0,10	0,60
16 - 30	38	0,38 ^a	0,09	0,01	23,68	0,35	0,41	0,10	0,60
31 - 60	52	0,36 ^a	0,10	0,01	27,78	0,33	0,39	0,10	0,50
61 - 90	46	0,18 ^c	0,09	0,01	50,00	0,15	0,20	0,10	0,50

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

As variações dos teores séricos de triglicérides durante o puerpério guardam similaridades com aquelas observadas para o colesterol, ou seja, o aumento dos teores de triglicérides durante 15 e 60 dias pós-parto seria reflexo da maior ingestão de comida e de nutrientes que servem de matéria prima para a síntese de ácidos graxos, tanto como gordura no intestino, como de AGV do rúmen no fígado.

Os triglicérides detectados no soro são aqueles disponíveis ao organismo, tanto os contidos nas lipoproteínas quilomícrons, resultado da absorção de lipídios pelo intestino delgado, como em VLDL, oriundos da síntese de triglicérides pelos hepatócitos (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Segundo Kaneko (2008), os lipídios sangüíneos são de fundamental importância na síntese da gordura do leite, e as principais fontes dessa gordura são os triglicérides, fosfolipídios, ésteres de colesterol (parte do colesterol total), e os NEFA circulantes oriundos da lipólise (TRIPATHI et al., 2010).

Essa utilização dos triglicérides para a formação de gordura do leite pode, pelo menos em parte, justificar a drástica diminuição das concentrações deste metabólito, que vinha de médias acima de 0,35 mmol/L até atingir valores menores que 0,20 mmol/L, entre 60 e 90 dias de lactação, quando foram registrados os maiores índices de produção de leite e as maiores quantidades de colesterol.

Além disso, são postuladas as limitadas quantidades de VLDL fisiologicamente produzidas por ruminantes (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; KANEKO, 2008), e que ainda podem ser mais prejudicadas pela maior presença de glucagon (GIBBONS, 1990), baixa ingestão de carboidratos (KANEKO, 2008), e condições de subnutrição (BONNET et al., 2004), como em casos de final de gestação, puerpério, e pico de lactação.

Figura 18 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

E foi exatamente o que observamos nas búfalas em torno do seu pico de lactação, e em menor intensidade nos momentos próximos ao parto. O resgate de triglicérides circulantes para a máxima produção do tão gorduroso leite de búfala (8% de gordura em média) levou as concentrações deste metabólito aos limites mínimos. Por mais que sua ingestão seja máxima, como vimos nas concentrações de colesterol, a qualidade nutricional passa por um momento de limitações lipídicas, sendo necessário lançar mão das reservas corporais para suprir as menores quantidades de lipídios circulantes, refletindo-se nos maiores valores de β -HBO disponíveis no sangue, como discutiremos a frente.

Para búfalas no periparto, Campanile (1998) descreve valores de triglicérides nos períodos de 60-30 e 30-1 dias pré-parto, e 0-15, 15-30, 30-70 e >70, onde obteve as respectivas médias de 0,26, 0,24, 0,35, 0,34, 0,32 e 0,38 mmol/L. E, para intervalo de um mês ao redor do parto, Ghanem e El-Deeb (2010) obtiveram 0,34 mmol/L de triglicérides.

Estes valores ficaram de acordo com os encontrados em nosso trabalho, com exceção da média encontrada por Campanile (1998) no período acima de 70 dias de lactação. Como

discutido anteriormente, a brusca queda em nossos valores de triglicérides pode refletir as deficiências nutricionais encontradas na realidade das fazendas brasileiras.

Já Grasso et al. (2004) realizaram colheitas nos momentos de 15, 25, 35-55 e 65-85 dias após o parto, e obtiveram, respectivamente, valores de 0,09, 0,11, 0,10 e 0,10 mmol/L de triglicérides. Esses valores se mantiveram bem abaixo dos encontrados por nós, no entanto, houve diferenças relevantes nas curvas de lactação dos dois trabalhos. Enquanto observamos uma crescente produção de leite do parto até 60-90 dias de lactação, Grasso et al. (2004) obtiveram início de lactação com sua produção máxima, e além dessa não aumentar em momento algum, começa a diminuir já a partir do segundo mês de lactação.

As concentrações de β -HBO estão descritas na tabela 21 e figura 19. Onde podemos observar que os valores entre 60 e 31 dias antes do parto são menores que os observados nos outros períodos. Sofrem aumento significativo deste metabólito no último mês de gestação, e se mantém estáveis até 60 dias de lactação, quando entre 61 e 90 dias pós-parto voltam a aumentar significativamente, atingindo os maiores valores no período estudado.

Tabela 21 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
60 - 31	21	0,63 ^a	0,22	0,04	34,92	0,53	0,73	0,43	1,22
30 - 1	41	0,85 ^{bc}	0,33	0,05	38,82	0,74	0,95	0,46	2,31
0 - 15	54	0,81 ^b	0,35	0,05	43,21	0,72	0,91	0,37	2,46
16 - 30	38	0,79 ^b	0,24	0,04	30,38	0,71	0,87	0,48	1,53
31 - 60	52	0,77 ^{ab}	0,29	0,04	37,66	0,69	0,85	0,37	1,79
61 - 90	46	0,85 ^c	0,28	0,04	32,94	0,77	0,93	0,43	1,97

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P = 0,0004)

Efeito Fazenda (P = 0,0003)

Efeito Idade (P = 0,1604)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

O β -HBO pode ter origem tanto na cetogênese alimentar quando na metabólica. Onde o butirato ruminal é convertido em β -HBO pelas células da parede ruminal, mas também pode ser formado após a lipólise, quando grande quantidade do NEFA chega ao fígado, ultrapassando as quantidades de oxaloacetato disponíveis para adentrar ao ciclo de Krebs, formando então os corpos cetônicos, através da β -Oxidação. Mas independente de sua origem, pode ser utilizado como fonte de energia pela maioria dos tecidos corporais (HEITMANN et al., 1987; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; MARUTA, 2005; KANEKO, 2008).

Vale ressaltar que em condições normais, cerca de 70% dos corpos cetônicos circulantes são produzidos no rúmen (cetogênese alimentar), e somente 30% produzido pelo fígado (cetogênese metabólica; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Figura 19 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P = 0,0004$)

As maiores quantidades de β -HBO circulantes, tanto no último mês de gestação, como no pico de lactação, de certa forma ratificam as observações feitas para triglicérides, talvez por também se tratar de um lipídio, com origens alimentar e metabólica. A diferença entre os valores atingidos nos referidos picos seguem uma relação aproximada 70:30, entre a cetogênese alimentar e metabólica, quando os comparamos aos valores obtidos entre 60 e 31 dias antes do parto. Mostrando a produção extra de β -HBO nos momentos de maior utilização das reservas energéticas por meio da lipólise.

Para búfalas no periparto, Campanile (1998) acompanhou a bioquímica dos momentos 60-30 e 30-1 dias pré-parto, e 0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto, observando médias, respectivamente, de 0,28, 0,30, 0,18, 0,13, 0,14 e 0,16 mmol/L de β -HBO. Enquanto que Verdurico (2010) colheu amostras no último mês de gestação (30-1), parto (0-15) e puerpério

(16-30), e início de lactação (31-60), obtendo médias, respectivamente, de 0,47, 0,41, 0,45 e 0,44 mmol/L de β -HBO.

Em ambos os trabalhos foram relatadas curvas de β -HBO no periparto com comportamentos muito semelhantes à observada em nossa pesquisa, onde maiores valores no final da gestação são seguidos por diminuição no pós-parto imediato, e manutenção desses valores até 60 dias de lactação. Com exceção dos valores obtidos por Campanile (1998) acima de 70 dias de lactação, que se mantiveram estáveis, enquanto que os nossos apresentaram um pico, provavelmente pela lipólise em reflexo a hipotrigliceridemia para a produção de gordura do leite.

Porém, os valores absolutos observados pelos referidos pesquisadores foram bem menores aos encontrados em nossa pesquisa. Dentro da literatura pesquisada sobre búfalos, esta magnitude de valores só foi compatível com bezerros lactentes (0,24 e 0,25 mmol/L), que normalmente têm sua produção de β -HBO comprometida devido ao incompleto amadurecimento ruminal (VERDURICO, 2010). Em pesquisa com vacas leiteiras que tiveram sangue colhido em jejum, Bonnet et al. (2004) verificaram valores que variaram em torno de 0,15-0,25 mmol/L de β -HBO, chegando a triplicar (0,56-0,71 mmol/L) quando a colheita da sangue é realizada nas mesmas vacas, algumas horas após a refeição. Valores bem mais próximos dos nossos, talvez porque nossas colheitas nunca foram realizadas em animais submetidos a jejum.

Já os relatos de Ghanem e El-Deeb (2010) e Youssef et al. (2010) em búfalas recém-paridas, descreveram valores bem mais próximos aos nossos, quando acharam médias de 1,06 e 0,82 mmol/L de β -HBO, respectivamente.

As concentrações de NEFA estão apresentadas na tabela 22 e figura 20. Onde se observa que a partir dos 60 dias antes do parto, este metabólito aumenta gradativamente até atingir seu pico no pós-parto imediato. Depois de 15 dias da parição, as concentrações de NEFA diminuem, e se mantém estáveis até 90 dias de lactação.

O NEFA basicamente reflete o grau de lipólise do animal, ou seja, o quanto está sendo demandado pelo organismo para suprir as necessidades energéticas (BONNET et al., 2004; MONDAL; PRAKASH, 2004). É considerada uma variável muito sensível, e indicada para determinar o balanço energético e a condição corporal (VAN SAUN, 2000).

Na fase de periparto, a quantidade de NEFA encontra-se alterada entre 393,91 e 579,57 μ mol/L, corroborando a hipótese de deficiência energética.

Tabela 22 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
60 - 31	21	178,74 ^c	102,32	22,33	57,25	132,17	225,32	36,02	404,05
30 - 1	41	393,91 ^b	165,15	25,79	41,93	341,78	446,03	85,87	860,64
0 - 15	54	579,57 ^a	445,80	60,67	76,92	457,89	701,25	86,46	1704,06
16 - 30	38	253,38 ^c	127,24	21,51	50,22	209,68	297,09	58,40	550,36
31 - 60	52	210,21 ^c	115,63	16,19	55,01	177,69	242,73	47,82	458,05
61 - 90	46	268,55 ^c	128,44	18,94	47,83	230,41	306,70	45,48	577,11

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Figura 20 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média $\pm$ EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

Para búfalas no periparto, Campanile (1998) mensuraram concentrações de NEFA nos momentos 60-30 e 30-1 dias pré-parto, e 0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto, e obtiveram as respectivas médias de 300, 375, 500, 450, 400 e 325 $\mu\text{mol/L}$. Valores esses semelhantes aos verificados por nós, tanto em valores como em comportamento diante do período de periparto. Ghanem e El-Deeb (2010) também encontraram valores de magnitude semelhante,

no entanto, disponibilizou somente uma média de 365,6 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA para todo o período do parto.

Para o pós-parto, Grasso et al. (2004) obtiveram valores de NEFA abaixo dos nossos, e com comportamento diferente, pois nos momentos 15, 25, 35-55 e 65-85 dias após o parto, obtiveram os respectivos valores de 270, 300, 384 e 370 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA. Pudemos notar que semelhantemente às menores quantidades de triglicérides durante todo o pós-parto, somadas a decrescente média de produção leiteira apresentadas no artigo, observamos que essas búfalas tiveram aumento do NEFA logo um mês após o parto, enquanto que o observado em nosso trabalho somente aconteceu no momento do parto, nos levando a crer que um pico de NEFA durante a lactação pode indicar um momento de balanço energético negativo intensificado, que desencadeia a queda na produção de leite.

Já Verdurico (2010) descreve um terceiro tipo de curva para o NEFA, pois ao mensurar este metabólito nos momentos de último mês de gestação (30-1), parto (0-15) e puerpério (16-30), e no início de lactação (31-60), a autora observa valores médios de 580, 726, 755 e 810 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA, distinguindo-se do que observamos tanto pelos maiores valores de NEFA, quanto pela curva crescente deste metabólito até 60 dias de lactação. Lucy et al. (2001) descrevem para bovinos esse tipo de curva de NEFA como período de transição anormal, quando as vacas não aumentam sua ingestão de alimento como deveriam, o que prejudica o aumento da insulina e do colesterol, e não diminuindo as quantidades de hormônio do crescimento (GH) para as quantidades adequadas, o que não interrompe a lipólise iniciada no momento do parto.

As concentrações de glicose estão descritas na tabela 23 e figura 21. Onde observa-se que as menores médias, registradas entre 60 e 31 dias antes da parição, aumentam gradativamente até o momento do parto, quando atingem os maiores valores. E depois a glicemia diminui paulatinamente até atingir 61-90 dias de lactação.

Segundo Vasquez-Anon et al. (1994), as concentrações plasmáticas de glicose permanecem estáveis ou diminuem um pouco durante o período de transição pré-parto, aumentam muito durante o parto e diminuem imediatamente no pós-parto. O aumento das concentrações de glicose ao parto pode ser devido ao aumento das concentrações de glucagon e glicocorticóides, que promovem a depleção dos estoques de glicogênio hepático e a gliconeogênese a partir de aminoácidos, respectivamente (GRUMMER, 1995; CUNNINGHAM, 1999; KANEKO, 2008).

Apesar de não termos dosado hormônios, observa-se comportamento muito semelhante na glicemia das búfalas estudadas. Os valores médios de glicose antes do parto se

mantiveram abaixo de 3,50 mmol/L, atingindo valores acima de 4 mmol/L no momento do parto, e decresceram gradativamente até atingir patamares de 3,50 mmol/L novamente.

Tabela 23 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
60 - 31	21	3,33 ^a	0,25	0,05	7,51	3,22	3,45	2,90	4,00
30 - 1	41	3,43 ^b	0,38	0,06	11,08	3,31	3,55	2,80	4,70
0 - 15	54	4,19 ^f	0,78	0,11	18,62	3,97	4,40	2,90	6,60
16 - 30	38	3,73 ^e	0,40	0,06	10,72	3,60	3,86	3,00	4,60
31 - 60	52	3,52 ^d	0,31	0,04	8,81	3,43	3,60	3,10	4,40
61 - 90	46	3,39 ^c	0,34	0,05	10,03	3,29	3,49	2,80	4,10

Letras diferentes (a, b, c, d, e, e f) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

Efeito Idade (P < 0,0001)

Efeito Número de Crias (P < 0,0001)

¹N – Número de animais por grupo; ²DP – Desvio padrão; ³EPM – Erro padrão da média; ⁴CV% – Coeficiente de variação; ⁵ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Figura 21 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c, d, e, e f) diferiu (P < 0,0001)

Para búfalas no periparto, Oliveira et al. (2003) mensuraram as concentrações de glicose no pré e pós-parto, onde obtiveram médias de 3,70 e 3,62 mmol/L, com observação de concentrações próximas a 4 mmol/L no momento do parto. Enquanto Ghanem e El-Deeb (2010), para o mesmo período, obtiveram média de 3,07 mmol/L de glicose.

Verdurico (2010) avaliou búfalas no último mês de gestação (30-1), parto (0-15) e puerpério (16-30), e início de lactação (31-60), obtendo valores médios de 3,47, 3,72, 3,33 e 3,73 mmol/L. Já Grasso et al. (2004), com búfalas entre 15, 25, 35-55 e 65-85 dias pós-parto, obteve médias de 3,79, 3,71, 3,62 e 3,42 mmol/L de glicose.

Todos os artigos acima citados se mostraram de acordo com nossos achados, tanto em quantidades de glicose como a hiperglicemia no momento do parto. No entanto, Youssef et al. (2010) relataram 2,89 mmol/L de glicose búfalas no puerpério. Exatamente o mesmo trabalho que descreveu as maiores concentrações de colesterol que achamos. Como já discutido, maiores quantidades de colesterol são reflexo de aumentos na insulina, hormônio este causador de hipoglicemia (BAN-TOKUDA et al., 2007; KANEKO, 2008), o que talvez justifique seus menores valores de glicemia.

Os valores médios de ECC encontrados estão descritos na tabela 24 e na figura 22. Onde podemos observar um decréscimo contínuo no ECC desde o final da gestação, até os 30 dias de lactação, quando se mantiveram baixos até os 90 dias.

Tabela 24 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) no escore de condição corporal (ECC) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
60 - 31	21	3,69 ^a	0,37	0,08	10,03	3,52	3,86	3,50	4,50
30 - 1	41	3,51 ^a	0,63	0,10	17,95	3,31	3,70	2,50	4,50
0 - 15	54	3,23 ^b	0,45	0,06	13,93	3,11	3,35	2,50	4,00
16 - 30	38	3,13 ^c	0,47	0,08	15,02	2,97	3,29	2,00	4,00
31 - 60	52	3,11 ^c	0,43	0,06	13,83	3,00	3,23	2,00	4,00
61 - 90	46	3,09 ^{bc}	0,44	0,06	14,24	2,96	3,22	2,50	4,00

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

Efeito Idade (P = 0,0416)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

O ECC é um método subjetivo para estimar a quantidade de energia metabolizável estocada na gordura e nos músculos (reservas corporais) de um animal vivo (EDMONSON et al., 1989; HOUGHTON et al., 1990). Servindo, portanto, para quantificar a habilidade que a

fêmea possui de utilizar ou preservar as reservas corporais, de acordo com o desafio metabólico a que é submetida.

A evolução do ECC observada neste trabalho descreveu bem o comportamento alimentar e das reservas corporais durante esse período que compreendeu o final da gestação, parto e início da lactação. Pois mostrou a significativa diminuição na condição corporal das búfalas no momento do parto, se mantendo decrescente até o início da lactação.

Figura 22 - Efeito dos diferentes grupos de puerpério (dias) no escore de condição corporal (ECC) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

6.3 CONCLUSÃO

Podemos concluir que os metabólitos lipídicos analisados nesta pesquisa traduziram muito bem os eventos metabólicos das búfalas leiteiras estudadas, pois foram capazes de qualificar as respostas orgânicas frente ao desafio do final da gestação, momento do parto e

puerpério. E o ECC se mostrou uma ferramenta útil e barata para estimar a intensidade do balanço energético em búfalas no período do periparto.

Diante dos intervalos de confiança obtidos, propomos que os valores de referência para o lipidograma de búfalas entre 60 dias pré-parto e 90 dias após pós-parto se encontrem entre 1,39-3,74 mmol/L de colesterol, 0,15-0,41 mmol/L de triglicérides, 0,53-0,95 mmol/L de β -HBO, 132,17-701,25 μ mol/L de NEFA e 3,22-4,40 mmol/L de glicose.

CAPÍTULO 5

LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS LEITEIROS: INFLUÊNCIA DA LACTAÇÃO E VALORES DE REFERÊNCIA

8 INTRODUÇÃO

Os lipídios sangüíneos exercem um importante papel na síntese dos ácidos graxos (gordura) do leite em animais de exploração leiteira (KANEKO, 2008). E as principais fontes desses ácidos graxos do leite são os triglicérides, fosfolipídios, ésteres de colesterol e os NEFA circulantes (IVERSON et al., 1995; TRIPATHI et al., 2010).

Diante deste fato, deduz-se que os lipídios sangüíneos de búfalos tenham uma importância ainda maior, pois, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), enquanto vacas bovinas produzem leite com média de 3,5% de gordura, búfalas produzem leite com 8,0% de gordura, com variações entre 5,5 e 13% (ZICARELLI, 2001).

É constatado que o estudo dos metabólitos sangüíneos pode ajudar a entender as peculiaridades metabólicas do búfalo, nas mais diversas condições de criação, a fim de que se possa ajustar o manejo e a alimentação que os búfalos precisam (LEE et al., 1978; CAMPANILE, 1998; RENDINA et al., 2007; HAGAWANE et al., 2009).

Porém, não somente pelas peculiaridades de manejo, mas também pelos índices produtivos, as propriedades organolépticas dos produtos oriundos de búfalos (leite mais gorduroso e carne com menos colesterol), e os alimentos disponíveis, somos levados a crer que os eventos metabólicos em búfalos de uma determinada região do planeta acontecem em diferentes momentos e intensidades em relação aos bovinos e a búfalos sob diferentes condições (PAUL; LAL, 2010). Fato este que nos impede de usar valores metabólicos estabelecidos para bovinos, e bubalinos criados em outros países, mesmo na falta de sólidos valores de referência para bubalinos brasileiros.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivos analisar a influência da lactação nos teores séricos de colesterol, triglicérides, β -hidroxibutirato (β -HBO), ácidos graxos não esterificados (NEFA), e teores plasmáticos de glicose de búfalas, bem como estabelecer os valores de referência destes metabólitos para búfalas em lactação, criadas no Estado de São Paulo.

8.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas três propriedades de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo, e mestiços, todas localizadas no Estado de São Paulo. Duas delas situavam-se na Região do Vale do Ribeira, sendo uma localizada no município de Registro e uma em Pariquera-Açu. A outra pertencia à Região Centro-Oeste do Estado, localizada no município de Sarapuí.

As fazendas localizadas no Vale do Ribeira, todas caracterizadas por sistema extensivo de manejo, eram formadas com pastos não adubados de braquiárias (*Brachiaria sp.*). Água era observada em todos os pastos, mas com disponibilidade de mistura mineral somente para as búfalas de leite, que eram ordenhadas somente uma vez ao dia. Já as fazendas localizadas na região Centro-Oeste do Estado, caracterizadas por sistema semi-intensivo de manejo, eram formadas por pastos adubados de braquiárias e pântanos (*Panicum sp.*). Água e mistura mineral eram fornecidas *ad libitum*, além de suplementação protéico-energética em qualidade e quantidades variáveis, fornecidas somente às búfalas de leite e seus respectivos bezerros, antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Para avaliar a influência da lactação sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo, foram colhidas 147 amostras de soro e plasma sanguíneo de búfalas, distribuídas conforme apresentado no quadro 8. Búfalas com até 60 dias pós-parto foram retiradas do experimento, pois quisemos excluir qualquer fator que interferisse no lipidograma além da lactação, como por exemplo, o parto e o puerpério das parturientes.

Grupos	Constituição	Amostras Colhidas
61 - 90	Vacas entre 61 e 90 dias de lactação	46
91 - 200	Vacas entre 91 e 200 dias de lactação	38
> 200	Vacas com mais de 200 dias de lactação	27
Seca	Vacas prenhes, do início do período de secagem até 30 dias pré-parto	36

Quadro 8 - Constituição dos grupos experimentais para avaliar a influência da lactação sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo

As colheitas foram realizadas entre 2-6 horas após a última alimentação dos animais, quer tenha sido à base de forragem pastejada, ou suplementação alimentar no cocho. Para as

búfalas em lactação, as colheitas só começavam a partir das 9:00 da manhã, após arraçãoamento (sistema semi-intensivo) e primeira ordenha do dia, cronologicamente.

Os bubalinos utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos de acordo com as necessidades para a formação dos grupos experimentais, sendo que previamente a colheita, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, quando foram excluídos da pesquisa aqueles considerados doentes. Após esta seleção, as amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer®.

As amostras para avaliação do colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (β -HBO) foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 mL sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 mL contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

No laboratório as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sanguíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

Os teores séricos de colesterol, triglicérides, β -HBO e NEFA, foram quantificados por metodologia enzimática colorimétrica, segundo as técnicas de Williamson et al. (1962); Elphick (1968); Allain et al. (1974) e Fossati e Prencipe (1982); , e os resultados dos três primeiros foram expressos em mmol/L, e do último em μ mol/L. Os teores plasmáticos de glicose foram quantificados pelo método descrito por Barham et al. (1972), sendo os resultados expressos em mmol/L. Todas as amostras foram determinadas em um analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda.

Por meio de controle leiteiro de rotina realizado mensalmente nas fazendas, foram obtidas as médias de produção de leite das búfalas para o período correspondente às colheitas de sangue. Como a pesagem do leite não foi objetivo deste experimento, foi realizada somente a estatística descritiva para produção leiteira.

Para a avaliação da condição do estado geral dos animais, utilizamos a avaliação do escore de condição corporal (ECC) preconizado por Houghton et al. (1990), e modificada para a espécie bubalina por Baruselli et al., (2001), que trabalharam com fêmeas bubalinas da raça

Murrah, na região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo (Quadro 9). Foram atribuídas as notas de 1 a 5, conforme o estado de carne do animal, com escala de 0,5 entre as referidas notas. Contabilizando, portanto, as notas 1; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0. Somente foram avaliados animais adultos, ou seja, acima de 24 meses.

Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analise* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformadas em conformidade. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Lactação), Idade e Fazenda foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo final foram removidas as variáveis por *Backward Elimination* baseado no critério de Wald para $P > 0,20$.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means (LSMeans)* do SAS, onde consideramos diferença para $P \leq 0,05$, ou seja, provável repetitividade $\geq 95\%$.

Escore	Descrição
1	Extremamente magra , com perda de massa muscular grave podendo apresentar-se corcunda, com os pés juntos; e geralmente fraca. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e costelas extremamente proeminentes.
2	Magra , com pouca ou nenhuma perda de estrutura muscular; vigorosa; pouca ou nenhuma gordura na garupa, costelas ou peito. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e as costelas proeminentes, mas com aparecimento normal de estruturas musculares.
3	Condição moderada , com estrutura muscular normal; alguma evidência de gordura depositada nas costelas dianteiras e peito, mas limitado ao redor da base da cauda. Alguma maciez sobre o ombro, costelas, coluna vertebral, tuberosidades e pontas.
4	Gorda , mas ainda firme e vigorosa. Considerável depósito de gordura sobre as costelas dianteira, peito saliente, base da cauda completa (abaulada), muito boa maciez sobre a espinha dorsal sem ossos visíveis, exceto as tuberosidades.
5	Muito gorda , com maciez considerável. Grande depósito de gordura sobre as costelas dianteiras e ombro, grande e proeminente peito, ampla superfície de dorso, grandes depósitos irregulares de gordura ao redor da base da cauda; curvatura corporal torna-se quadrada na aparência.

Quadro 9 - Escala de avaliação para a determinação do escore de condição corporal (ECC) para búfalos

8.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de não termos usado os valores de produção de leite, a descrição desses dados pode ser útil para entendermos alguns efeitos observados no lipidograma das búfalas estudadas. As médias de produção de leite para os períodos avaliados foram de 9,8 litros para as búfalas entre 61-90 dias de lactação, 8,4 litros para as búfalas entre 91-200 dias, e 5,7 litros para as búfalas com mais de 200 dias de lactação.

Os resultados das concentrações de colesterol estão expressos na tabela 25 e na figura 23. Onde se observa que os valores se mantêm de 61 a 200 dias de lactação, e depois decrescem continuamente até as búfalas secas.

Segundo Kaneko (2008), as quantidades de colesterol presentes refletem o acetil-CoA disponível para a geração de energia, oriundo basicamente da ingestão de comida. Em casos de aumento na ingestão, há aumento de insulina (BAN-TOKUDA et al., 2007), aumento da leptina (CHILLIARD et al., 2005), e redução de glucagon e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, ou seja, quando o organismo está em desfosforilação (menor desdobramento hidrolítico do ATP por ação da adenilciclase), a produção do colesterol é estimulada (KANEKO, 2008).

Tabela 25 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
61 - 90	46	3,55 ^a	0,62	0,09	17,46	3,37	3,74	2,30	4,70
91 - 200	38	3,60 ^a	0,69	0,11	19,17	3,37	3,82	2,00	5,00
> 200	27	3,33 ^b	0,63	0,12	18,92	3,08	3,58	2,00	4,60
Seca ⁷	36	1,89 ^c	0,41	0,07	21,69	1,75	2,02	1,20	2,90

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P = 0,0002)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo ⁷ Seca – Fêmeas prenhes com pelo menos uma cria, fora da lactação, entre 272 e 414 dias pós-parto.

Durante a lactação, as concentrações de colesterol atingem seu máximo, ao redor de 3,50 mmol/L, se mantendo estatisticamente até os 200 dias pós-parto, quando começam a diminuir junto com a diminuição da produção de leite, e conseqüentemente, com as exigências nutricionais das búfalas em lactação. E atingem os menores valores de colesterol

em patamares de 2,00 mmol/L, quando as búfalas já estão secas. Comportamento semelhante observado por (BAN-TOKUDA et al., 2007) em búfalas confinadas, que diminuíram as concentrações de colesterol sanguíneo simultaneamente a ingestão de alimento e ao ganho de peso.

Para búfalas em diversos momentos de lactação, Hagawane et al. (2009) observaram valores de 2,30 mmol/L. E para búfalas entre 65-85 e 95-175 dias de lactação, Grasso et al. (2004) encontraram médias de 2,98 e 2,78 mmol/L.

Para búfalas entre 100 e 200 dias de lactação, Feckinghaus (2009), utilizando ou não somatotropina recombinante bovina (rBST), encontrou médias de 2,99 e 3,08 mmol/L, enquanto que Campanile et al. (1998) observaram intervalo aproximado de 2,5-3,5 mmol/L de colesterol.

Figura 23 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

Tripathi et al. (2010) observaram valores de colesterol um pouco acima dos valores obtidos por nós. Em búfalas em lactação, estando início (51-65 dias), meio (125-160 dias) e

final (198-262 dias) de lactação, relataram 3,98, 5,12 e 4,48 mmol/L para os respectivos intervalos.

No trabalho de Tripathi et al. (2010) não são relatadas qualidade e quantidade da alimentação consumida pelos animais, mas é provável que seja a mesma base alimentar utilizada em outros trabalhos indianos, que utilizam produtos e subprodutos de arroz, trigo, algodão, aveia e amendoim, e um tipo de leguminosa pouco utilizada no Brasil, o trevo alexandrino (*Trifolium alexandrinum*), o que caracterizaria a disponibilidade regional de alimentos. Essa típica dieta seguramente gera diferenças nos metabólitos sanguíneos dos búfalos criados aqui, talvez por isso, tenham valores diferentes para as concentrações de colesterol, apesar do semelhante comportamento diante da curva de lactação.

As concentrações de triglicérides se encontram na tabela 26 e figura 24. Onde observa-se os menores valores no pico de lactação (61-90 dias), e que crescem gradativamente de acordo com a diminuição da produção de leite, até atingirem os valores máximos no final da lactação e no período seco.

Os triglicérides detectados no soro são aqueles disponíveis ao organismo, tanto os contidos nas lipoproteínas quilomícrons, resultado da absorção de lipídios pelo intestino delgado, como em VLDL, oriundos da síntese de triglicérides pelos hepatócitos (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Durante o pico de lactação, observamos valores mínimos de triglicérides, que se mantiveram abaixo de 0,20 mmol/L. De acordo com a diminuição na produção de leite, a quantidade de triglicérides aumenta, passando para patamares de 0,25 mmol/L em vacas entre 91 e 200 dias pós-parto, até atingir médias acima de 0,30 mmol/L em búfalas acima de 200 dias de lactação, e em vacas secas.

Tabela 26 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
61 - 90	46	0,18 ^c	0,09	0,01	50,00	0,15	0,20	0,10	0,50
91 - 200	38	0,23 ^b	0,09	0,01	39,13	0,20	0,26	0,10	0,40
> 200	27	0,32 ^a	0,11	0,02	34,38	0,27	0,36	0,10	0,50
Seca ⁷	36	0,31 ^a	0,12	0,02	38,71	0,27	0,35	0,20	0,60

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

Efeito Idade (P = 0,1849)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo ⁷ Seca – Fêmeas prenhes com pelo menos uma cria, fora da lactação, entre 272 e 414 dias pós-parto.

Como foi dito, os lipídios sanguíneos são de fundamental importância na síntese da gordura do leite (KANEKO, 2008), e as principais fontes dessa gordura são os triglicérides, fosfolipídios, ésteres de colesterol (parte do colesterol total), e os NEFA circulantes oriundos da lipólise (IVERSON et al., 1995; TRIPATHI et al., 2010).

Figura 24 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

Além disso, são postuladas as limitadas quantidades de VLDL fisiologicamente produzidas por ruminantes (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; KANEKO, 2008), e que ainda podem ser mais prejudicadas pela maior presença de glucagon (GIBBONS, 1990), baixa ingestão de carboidratos, e condições de subnutrição (BONNET et al., 2004), como em casos de final de gestação, puerpério, e pico de lactação.

E foi exatamente o que observamos nas búfalas em lactação. O resgate de triglicérides circulantes para a máxima produção do tão gorduroso leite de búfala leva as concentrações deste metabólito aos limites mínimos. Por mais que sua ingestão seja máxima, como vimos nas concentrações de colesterol, a qualidade nutricional passa por um momento de limitações, sendo necessário lançar mão das reservas corporais para suprir as menores quantidades de

lipídios circulantes, refletindo-se nos maiores valores de β -HBO e NEFA disponíveis no sangue. Após o pico de lactação, tanto as quantidades de triglicérides voltam ao normal, como as quantidades de β -HBO e NEFA, como discutiremos a frente.

Todos os valores de triglicérides encontrados na literatura ficaram próximos aos encontrados nesta pesquisa.

Para búfalas entre 65-85 e 95-175 dias de lactação, Grasso et al. (2004) encontraram médias de 0,10 e 0,10 mmol/L de triglicérides. Já para búfalas entre 100 e 200 dias de lactação, Feckinghaus (2009), utilizando ou não somatotropina recombinante bovina (rBST), encontrou médias de 0,21 e 0,20 mmol/L.

Em búfalas estando início (51-65 dias), meio (125-160 dias) e final (198-262 dias) de lactação, Tripathi et al. (2010) encontraram 0,19, 0,32 e 0,25 mmol/L de triglicérides para os respectivos grupos.

As quantidades de β -HBO estão descritas na tabela 27 e na figura 25. Onde observa-se maiores quantidades deste metabólito nas búfalas entre 61 e 90 dias pós-parto, e diminuição gradativa de β -HBO com a avançar da lactação, até atingir seus valores mínimos nas vacas já secas.

Tabela 27 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
61 - 90	46	0,85 ^a	0,28	0,04	32,94	0,77	0,93	0,43	1,97
91 - 200	38	0,70 ^b	0,14	0,02	20,00	0,66	0,75	0,47	1,04
> 200	27	0,67 ^{bc}	0,16	0,03	23,88	0,60	0,73	0,39	1,19
Seca ⁷	36	0,64 ^c	0,20	0,03	31,25	0,57	0,71	0,34	1,22

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo ⁷ Seca – Fêmeas prenhes com pelo menos uma cria, fora da lactação, entre 272 e 414 dias pós-parto.

O β -HBO pode ter origem tanto na cetogênese alimentar quando na metabólica. Onde o butirato ruminal é convertido em β -HBO pelas células da parede ruminal, mas também pode ser formado após a lipólise, quando grande quantidade do NEFA chega ao fígado, ultrapassando as quantidades de oxaloacetato disponíveis para adentrar ao ciclo de Krebs, formando então os corpos cetônicos, através da β -Oxidação. Mas independente de sua origem, pode ser utilizado como fonte de energia pela maioria dos tecidos corporais (HEITMANN et al., 1987; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; MARUTA, 2005; KANEKO, 2008).

Vale ressaltar que em condições normais, cerca de 70% dos corpos cetônicos circulantes são produzidos no rúmen (cetogênese alimentar), e somente 30% produzido pelo fígado (cetogênese metabólica; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Figura 25 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média $\pm$ EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P < 0,0001$)

As maiores quantidades de β -HBO circulantes no pico de lactação, de certa forma ratificam as observações feitas para triglicérides, talvez por também se tratar de um lipídio, com origens alimentar e metabólica. A diferença entre o valor atingidos no pico segue uma relação aproximada 70:30, entre a cetogênese alimentar e metabólica, quando o comparamos aos valores obtidos acima de 91 dias de lactação. Mostrando a produção extra de β -HBO no momento de maior utilização das reservas energéticas por meio da lipólise.

Os valores de NEFA estão dispostos na tabela 28 e figura 26. Observa-se maiores valores no grupo de búfalas entre 61-90 dias pós-parto, com diminuição dos valores para os subseqüentes grupos, que mantém estabilidade, estatisticamente.

A partir do momento em que a quantidade de acetil-CoA produzida pela presença de NEFA sobrepular a quantidade de oxaloacetato das mitocôndrias hepáticas, o acetil-CoA é

então direcionado para a Via da β -Oxidação, sendo recondensado em acetoacetato, precursor dos corpos cetônicos β -HBO e acetona (CUNNINGHAM, 1999; KANEKO, 2008), onde cerca de 65% do acetoacetato produzido acaba se transformando em β -HBO (MARUTA, 2005).

Tabela 28 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
61 - 90	46	268,55 ^a	128,44	18,94	47,83	230,41	306,69	45,48	577,11
91 - 200	38	176,64 ^b	120,75	19,59	68,36	136,95	216,33	55,32	536,14
> 200	27	110,76 ^b	63,21	12,40	57,07	85,23	136,29	33,71	321,12
Seca ⁷	36	175,52 ^b	92,03	15,34	52,43	144,38	206,66	36,02	404,05

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Fazenda ($P < 0,0001$)

Efeito Idade ($P = 0,1241$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo ⁷ Seca – Fêmeas prenhes com pelo menos uma cria, fora da lactação, entre 272 e 414 dias pós-parto.

Figura 26 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a e b) diferiu ($P < 0,0001$)

O NEFA basicamente reflete o grau de lipólise do animal, ou seja, o quanto está sendo demandado pelo organismo para suprir as necessidades energéticas (BONNET et al., 2004; MONDAL; PRAKASH, 2004). Sendo uma variável muito sensível, e indicada para determinar o balanço energético e a condição corporal (VAN SAUN, 2000).

Como observado na concentração de triglicérides e β -HBO, a quantidade de NEFA também se encontra alterada no momento de maior produção leiteira dessas búfalas, quando atinge média em torno de 250 $\mu\text{mol/L}$, corroborando a hipótese de deficiência energética no pico de lactação. Com a posterior diminuição da produção leiteira dos animais avaliados, pode-se notar a normalização dos valores destes referidos metabólicos paralelamente, quando o NEFA desce para níveis de 150 $\mu\text{mol/L}$.

Para búfalas entre 65-85 e 95-175 dias de lactação, Grasso et al. (2004) encontraram médias de 370 e 239 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA. E Campanile et al. (1998), valores entre 200-300 $\mu\text{mol/L}$ para búfalas em torno de 100-200 dias de lactação. Ambos os trabalhos com valores próximos aos encontrados por nós.

Porém, os dois próximos trabalhos, o primeiro no Brasil, e o outro na Índia, mostraram valores acima do achados em nossa pesquisa.

Em experimento com búfalas entre 100 e 200 dias de lactação, avaliando o efeito da utilização de somatotropina recombinante bovina (rBST) ou não (controle), Feckinghaus (2009) observou médias de 518,05 e 518,45 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA. Registros meteorológicos realizados no período do experimento mostram que já durante o período de colheitas, as temperaturas baixaram drasticamente. O que pode ter alterados os valores de NEFA, que antes do ocorrido giravam em torno de 300 $\mu\text{mol/L}$, em ambos os grupos experimentais. Recente revisão feita por Marai e Haebe (2010) relata a possibilidade do estresse do frio causar variáveis graus de lipólise, e conseqüentemente, aumento nas concentrações de NEFA.

Para o segundo artigo, no entanto, por falta de algumas informações sobre o manejo nutricional e dados produtivos, não conseguimos lançar nenhuma discussão ou hipótese consistente sobre os altos valores encontrados por Tripathi et al. (2010), que relataram médias de 454,33, 417,41 e 460,15 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA para búfala em início (51-65 dias), meio (125-160 dias) e final (198-262 dias) de lactação, respectivamente.

Os valores médios de glicose sangüínea estão arranjados na tabela 29 e figura 27. Onde se observa diferenças muito discretas nos valores absolutos deste parâmetro, porém com diferenças estatisticamente significativas. Os valores se mantiveram estáveis entre animais com 61 e 200 dias de lactação, mas foram observados aumentos gradativos na concentração deste metabólito até as búfalas secas, quando atingiram seus valores estatisticamente maiores.

Nos ruminantes, grande parte da energia utilizada no seu metabolismo é obtida de ácidos graxos voláteis provenientes da fermentação ruminal, sendo que a síntese de glicose a partir dos ácidos graxos voláteis é dependente do perfeito funcionamento do fígado, uma vez que este órgão é o regulador da concentração de glicose no sangue e da oferta de glicose aos tecidos, sendo essencialmente o único local para a gliconeogênese (formação de glicose a partir de compostos carbônicos), ainda que exista uma pequena contribuição do córtex renal (HERDT, 2000).

Segundo Van Soest (1994), o nível da alimentação tem pouca influência nas taxas circulantes de glicemia de ruminantes. Quando em excesso, a glicose é estocada no organismo sob a forma de glicogênio. Assim, os níveis de glicogênio hepático e muscular são relativamente constantes, embora haja síntese e degradação contínuas reguladas por ação hormonal. Enquanto a insulina e os glicocorticóides favorecem o acúmulo de glicogênio, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e o glucagon possuem atividade glicogenolíticas (BEITZ, 1996).

Tabela 29 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
61 - 90	46	3,39 ^{ab}	0,34	0,05	10,03	3,29	3,49	2,80	4,10
91 - 200	38	3,41 ^a	0,39	0,06	11,44	3,28	3,54	2,80	4,30
> 200	27	3,37 ^{bc}	0,37	0,07	10,98	3,23	3,52	2,40	4,00
Seca ⁷	36	3,45 ^c	0,33	0,05	9,57	3,34	3,57	2,90	4,40

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P = 0,0155)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

Efeito Idade (P = 0,0926)

¹N – Número de animais por grupo; ²DP – Desvio padrão; ³EPM – Erro padrão da média; ⁴CV% – Coeficiente de variação; ⁵ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ICMáx – Intervalo de confiança máximo ⁷Seca – Fêmeas prenhes com pelo menos uma cria, fora da lactação, entre 272 e 414 dias pós-parto.

Ban-Tokuda et al. (2007) observaram os efeitos da insulina em bovinos e bubalinos confinados, constatando que no decorrer do experimento, os níveis de insulina acompanharam as concentrações de colesterol, consequência do aumento na ingestão de ração. E no mesmo período a glicose decresceu, provavelmente em função do efeito das maiores concentrações de insulina circulantes.

O mesmo foi observado por Bonnet et al. (2004), que verificaram o efeito metabólico e hormonal em vacas de leite vazias confinadas, submetendo as mesmas vacas à alimentação controle (130% das necessidades energéticas de manutenção durante 28 dias), depois à privação nutricional (21% das necessidades energéticas de manutenção durante 7 dias), seguida de

realimentação (237% das necessidades energéticas de manutenção durante 21 dias). E observaram que durante o período de privação nutricional, a insulina se mantinha intacta e em seus mais baixos patamares ($P=0,003$), mesmo após as refeições. Enquanto que no mesmo período, a glicose manteve suas maiores concentrações ($P=0,07$) após as refeições, quando comparada com o período controle e o de realimentação. Funcionamento oposto foi observado após a realimentação destas vacas sob privação, que após as refeições, tinham as maiores concentrações de insulina ($P=0,003$), e as menores concentrações de glicose ($P=0,07$).

Vale ressaltar que grande parte das nossas colheitas de sangue foi realizada após os animais terem ingerido algum tipo de alimento, tanto volumoso quanto concentrado. Sendo melhor, portanto, compararmos nossos animais com experimentos mensurados após a alimentação, e não com animais em jejum.

Figura 27 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu ($P = 0,0155$)

Todos os valores de glicose encontrados em búfalos, apesar de variarem um pouco em relação à qualidade alimentar utilizada em cada trabalho, se aproximaram das concentrações constatadas por nós.

Hagawane et al. (2009) observaram os valores de 2,78 mmol/L de glicose para búfalas em várias fases da lactação. Já Grasso et al. (2004), encontraram médias de 3,42 e 3,25 mmol/L para búfalas entre 65-85 e 95-175 dias em lactação. Feckingham (2009), com búfalas entre 100 e 200 dias de lactação verificaram concentrações de 3,76 e 3,63 mmol/L, tratadas ou não com rBST. Enquanto que Campanile et al. (1998), em experimento com búfalas em período equivalente a 91-200 dias de lactação, registraram valores entre 4,0-4,5 mmol/L de glicose.

As médias de ECC para os grupos formados estão apresentadas na tabela 30 e na figura 28. Onde observa-se uma melhora quantitativa do ECC com o passar da lactação, mas essa melhora só passa a ser significativa para as búfalas já secas.

O ECC é um método subjetivo para estimar a quantidade de energia metabolizável estocada na gordura e nos músculos (reservas corporais) de um animal vivo (EDMONSON et al., 1989; HOUGHTON et al., 1990). Servindo, portanto, para quantificar a habilidade que a fêmea possui de utilizar ou preservar as reservas corporais, de acordo com o desafio metabólico a que é submetida.

Tabela 30 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) no escore de condição corporal (ECC) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
61 - 90	46	3,09 ^b	0,44	0,06	14,24	2,96	3,22	2,50	4,00
91 - 200	38	3,17 ^b	0,58	0,09	18,30	2,98	3,36	2,50	4,50
> 200	27	3,31 ^b	0,50	0,10	15,11	3,11	3,51	2,50	4,50
Seca ⁷	36	3,68 ^a	0,42	0,07	11,41	3,54	3,82	2,50	4,50

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Fazenda (P < 0,0001)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo ⁷ Seca – Fêmeas prenhes com pelo menos uma cria, fora da lactação, entre 272 e 414 dias pós-parto.

As médias de ECC refletem bem os momentos que as búfalas passaram no decorrer da lactação e do período seco. Demonstrando menores valores quantitativos no momento de pico de lactação, quando seguramente estão diante de um maior desafio metabólico. E esse parâmetro vai aumentando até atingir seus maiores patamares, no momento em que as búfalas já estão secas.

O ECC ficou de acordo com nossos resultados encontrados de triglicérides, β -HBO e NEFA, o que mostra certa relação entre uma medida subjetiva e metabólitos lipídicos utilizados para quantificar o perfil metabólico energético. Mostrando a importante utilidade dessa simples e barata ferramenta no manejo nutricional de búfalas de leite.

Figura 28 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) no escore de condição corporal (ECC) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a e b) diferiu ($P < 0,0001$)

8.3 CONCLUSÃO

Conclui-se que os metabólitos lipídicos analisados nesta pesquisa traduziram muito bem os eventos metabólicos das búfalas leiteiras estudadas, pois foram capazes de qualificar as respostas orgânicas frente ao desafio da produção de leite e a recuperação metabólica das búfalas após a lactação.

O ECC se mostrou uma ferramenta útil e barata para estimar a intensidade do balanço energético em búfalas durante a lactação. E como a habilidade de utilizar as reservas energéticas se mostra favorável para aumentar a produção de leite, sugere-se que o ECC seja utilizado para a formação dos novos lotes de búfalas após as correntes lactações, agrupando as fêmeas com escores mais próximos, com o objetivo de fornecer uma alimentação mais adequada a produção de leite de cada lote.

Diante dos intervalos de confiança obtidos, propomos que os valores de referência para o lipidograma de búfalas entre 60 dias pós-parto até o final da lactação se encontrem entre 1,75-3,82 mmol/L de colesterol, 0,15-0,36 mmol/L de triglicérides, 0,57-0,93 mmol/L de β -HBO, 85,23-306,69 μ mol/L de NEFA e 3,23-3,57 mmol/L de glicose.

CAPÍTULO 6

LIPIDOGRAMA E GLICEMIA DE BÚFALOS LEITEIROS: INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE CRIAÇÃO

9 INTRODUÇÃO

Os lipídios sangüíneos exercem um importante papel na síntese da gordura do leite em animais de exploração leiteira (KANEKO, 2008). E as principais fontes desses ácidos graxos do leite são os triglicérides, fosfolipídios, ésteres de colesterol e os NEFA circulantes (TRIPATHI et al., 2010).

Diante deste fato, deduz-se que os lipídios sangüíneos de búfalos tenham uma importância ainda maior, pois, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), enquanto vacas bovinas produzem leite com média de 3,5% de gordura, búfalas produzem leite com 8,0% de gordura, com variações entre 5,5 e 13% (ZICARELLI, 2001).

As búfalas freqüentemente apresentam uma carência de energia, que não se traduz com uma produção de leite com menor teor de gorduras, mas sim numa menor produção de leite. Portanto, se as búfalas não dispõem de precursores para sintetizar um leite com determinada característica, reduzem sua produção (ZICARELLI, 2001), principalmente quando ficam vulneráveis as disponibilidades sazonais de pastagens de inverno (MACEDO, et al., 2001).

Búfalas submetidas a duas ordenhas apresentam maior teor lipídico no leite, além de uma maior produção, mas para aumentar a produção deve-se necessariamente aumentar a densidade energética da dieta, mesmo porque existe um limite na capacidade de ingestão de matéria seca (MS) que não pode exceder a quantidade condicionada pelo peso vivo (ZICARELLI, 2001).

O perfil metabólico sangüíneos tem sido amplamente utilizado para identificar e indicar distúrbios metabólicos e baixa produtividade (LEE et al., 1978). E é constatado que o estudo dos metabólitos sangüíneos pode ajudar a entender as peculiaridades do búfalo, nas mais diversas condições de criação, a fim de que se possa ajustar o manejo e a alimentação que os búfalos precisam (CAMPANILE, 1998; GRASSO et al., 2004; RENDINA et al., 2007; HAGAWANE et al., 2009; PAUL; LAL, 2010).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo analisar a influência dos sistemas de criação, extensivo e semi-intensivo, nos teores séricos de colesterol, triglicérides, β -hidroxibutirato (β -HBO), ácidos graxos não esterificados (NEFA), e teores plasmáticos de glicose de búfalas em lactação criadas no Estado de São Paulo.

9.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram utilizadas duas propriedades de bubalinos da raça Murrah, localizadas no Estado de São Paulo. A fazenda que utilizava típico manejo extensivo situava-se na Região do Vale do Ribeira, município de Registro, onde colhemos sangue de búfalas que eram submetidas à pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, onde eram ordenhadas uma vez ao dia. Já a fazenda de manejo semi-intensivo pertencia à Região Centro-Oeste do Estado, localizada no município de Sarapuí, onde colhemos sangue de búfalas criadas sob pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração composta por farelo de soja, fubá de milho, caroço de algodão, polpa cítrica, uréia e silagem de *Panicum maximum*, fornecida antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Para avaliar a influência do sistema de criação sobre o lipidograma de búfalas criadas no Estado de São Paulo foram colhidas amostras de soro e plasma sangüíneo de 178 búfalas paridas até final de lactação, entre 16/11/2009 e 26/03/2010 (Quadro 10). Estas colheitas foram realizadas entre 2-6 horas após a última alimentação dos animais, quer tenha sido à base de forragem pastejada, ou suplementação alimentar no cocho. Para as búfalas em lactação, as colheitas só começavam a partir das 9:00 da manhã, após arraçoamento (sistema semi-intensivo) e primeira ordenha do dia, cronologicamente.

Os bubalinos utilizados na realização deste projeto de pesquisa foram escolhidos de acordo com as necessidades para a formação dos grupos experimentais, sendo que previamente a colheita, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, quando foram excluídos da pesquisa aqueles considerados doentes. Após esta seleção, as amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular externa, utilizando-se o Sistema Vacutainer®.

As amostras para avaliação do colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β -hidroxibutirato (β -HBO) foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 9 mL sem anti-coagulantes, e mantidas em temperatura ambiente para facilitar a retração do coágulo. As amostras para a determinação dos teores plasmáticos de glicose foram colhidas em tubos de vidro siliconados de 4 mL contendo fluoreto de sódio e mantidas refrigeradas durante o transporte.

No laboratório as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 3300g, durante 15 minutos, para a ocorrência da sinérese do coágulo ou sedimentação dos elementos figurados do sangue, sendo, a seguir, o soro e o plasma sangüíneos separados por aspiração em três alíquotas cada, totalizando seis alíquotas de tubos tipo Eppendorf por animal. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

Por meio de controle leiteiro de rotina realizado mensalmente nas fazendas, foram obtidas as médias de produção de leite das búfalas para o período correspondente às colheitas de sangue. Como a pesagem do leite não foi objetivo deste experimento, foi realizada somente a estatística descritiva para produção leiteira.

Grupo		Constituição	Amostras Colhidas
Extensivo	1 - 15	Vacas entre 1 e 15 dias pós-parto	9
	16 - 30	Vacas entre 16 e 30 dias pós-parto	14
	31 - 45	Vacas entre 31 e 45 dias pós-parto	14
	46 - 60	Vacas entre 46 e 60 dias pós-parto	11
	61 - 90	Vacas entre 61 e 90 dias pós-parto	9
	91 - 200	Vacas entre 91 e 200 dias pós-parto	10
	> 200	Vacas com mais de 200 dias pós-parto	10
Semi-intensivo	1 - 15	Vacas entre 1 e 15 dias pós-parto	15
	16 - 30	Vacas entre 16 e 30 dias pós-parto	23
	31 - 45	Vacas entre 31 e 45 dias pós-parto	13
	46 - 60	Vacas entre 46 e 60 dias pós-parto	13
	60 - 90	Vacas entre 61 e 90 dias pós-parto	19
	90 - 200	Vacas entre 91 e 200 dias pós-parto	10
	> 200	Vacas com mais de 200 dias pós-parto	8

Quadro 10 - Constituição dos grupos experimentais para estabelecer os valores de referência e avaliar a influência do sistema de criação sobre o lipidograma de búfalos criados no Estado de São Paulo

Os teores séricos de colesterol, triglicérides, β -HBO e NEFA, foram quantificados por metodologia enzimática colorimétrica, segundo as técnicas de Williamson et al. (1962); Elphick (1968); Allain et al. (1974) e Fossati e Prencipe (1982), e os resultados dos três primeiros foram expressos em mmol/L, e do último em μ mol/L. Os teores plasmáticos de

glicose foram quantificados pelo método descrito por Barham et al. (1972), sendo os resultados expressos em mmol/L. Todas as amostras foram determinadas em um analisador bioquímico automático, Labtest, modelo Labmax 240, Japão - Tokyo Boeki Medical System Ltda.

Para a avaliação da condição do estado geral dos animais, utilizamos a avaliação do escore de condição corporal (ECC) preconizado por Houghton et al. (1990), e modificada para a espécie bubalina por Baruselli et al. (2001), que trabalharam com fêmeas bubalinas da raça Murrah, na região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo (Quadro 11). Foram atribuídas as notas de 1 a 5, conforme o estado de carne do animal, com escala de 0,5 entre as referidas notas. Contabilizando, portanto, as notas 1; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0. Somente foram avaliados animais adultos, ou seja, acima de 24 meses.

Score	Descrição
1	Extremamente magra , com perda de massa muscular grave podendo apresentar-se corcunda, com os pés juntos; e geralmente fraca. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e costelas extremamente proeminentes.
2	Magra , com pouca ou nenhuma perda de estrutura muscular; vigorosa; pouca ou nenhuma gordura na garupa, costelas ou peito. Espinha dorsal, tuberosidades, pontas e as costelas proeminentes, mas com aparecimento normal de estruturas musculares.
3	Condição moderada , com estrutura muscular normal; alguma evidência de gordura depositada nas costelas dianteiras e peito, mas limitado ao redor da base da cauda. Alguma maciez sobre o ombro, costelas, coluna vertebral, tuberosidades e pontas.
4	Gorda , mas ainda firme e vigorosa. Considerável depósito de gordura sobre as costelas dianteira, peito saliente, base da cauda completa (abaulada), muito boa maciez sobre a espinha dorsal sem ossos visíveis, exceto as tuberosidades.
5	Muito gorda , com maciez considerável. Grande depósito de gordura sobre as costelas dianteiras e ombro, grande e proeminente peito, ampla superfície de dorso, grandes depósitos irregulares de gordura ao redor da base da cauda; curvatura corporal torna-se quadrada na aparência.

Quadro 11 - Escala de avaliação para a determinação do escore de condição corporal (ECC) para búfalos

Os valores da média aritmética, desvio padrão, erro padrão da média, coeficiente de variação, intervalo de confiança (95%), e valores mínimo e máximo foram calculados utilizando o procedimento *Means* do SAS versão 9.2 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram realizados utilizando o *Guide Data Analise* do SAS. Dados que não preencheram os pressupostos para a análise de variância (ANOVA) foram transformadas em conformidade. Os dados foram analisados por ANOVA, usando o procedimento *Glimmix* do SAS. As informações de grupo (Lactação), Sistema de Criação, Idade, ECC, Número de Crias e

Lactação*Sistema de Criação foram utilizadas nos modelos estatísticos. No modelo final foram removidas as variáveis por *Backward Elimination* baseado no critério de Wald para $P > 0,20$.

A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias *Least Square Means (LSMeans)* do SAS, onde consideramos diferença para $P \leq 0,05$, ou seja, provável repetitividade $\geq 95\%$.

9.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de leite das propriedades sob sistema extensivo e semi-intensivo está disposta na tabela 31 e figura 29 de forma somente descritiva. Diferentemente da bioquímica sanguínea que se refere ao dia exato em que as amostras de sangue foram colhidas, o controle leiteiro foi estimado de acordo com a pesagem mensal da propriedade, por isso, não foram realizadas provas estatísticas de inferência.

Tabela 31 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na produção de leite (litros) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Extensivo ⁷	1 - 15	9	5,89	2,09	0,70	35,48	4,28	7,49	3,50 9,10
	16 - 30	14	5,06	1,45	0,39	28,66	4,22	5,90	3,50 8,40
	31 - 45	14	4,95	1,51	0,40	30,51	4,11	5,86	3,00 8,70
	46 - 60	11	5,04	1,48	0,44	29,37	4,04	6,03	3,40 7,90
	61 - 90	9	5,63	1,59	0,53	28,24	4,41	6,85	3,00 7,70
	91 - 200	10	6,10	1,81	0,57	29,67	4,80	7,39	3,50 10,10
	>200	10	3,68	1,58	0,50	42,93	2,55	4,81	1,00 6,10
Semi-intensivo ⁸	1 - 15	15	8,93	2,53	0,65	28,33	7,53	10,33	3,50 12,00
	16 - 30	23	11,03	3,08	0,64	27,92	9,69	12,36	5,70 15,90
	31 - 45	13	12,33	3,18	0,88	25,79	10,41	14,25	6,40 16,60
	46 - 60	13	12,65	3,28	0,91	25,93	10,66	14,63	5,90 17,80
	61 - 90	19	11,83	2,62	0,60	22,15	10,56	13,10	6,20 15,40
	91 - 200	10	10,74	2,39	0,75	22,25	9,03	12,45	6,40 15,00
	>200	8	8,26	2,87	1,01	34,75	5,86	10,66	3,10 11,00

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMIn – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Extensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, e ordenhadas uma vez ao dia; ⁸ Semi-intensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração constituída de volumoso, concentrado e mistura mineral antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Podemos notar uma produção de leite relativamente constante para as búfalas criadas exclusivamente a pasto, enquanto que se pode ver uma curva de lactação melhor desenhada para as búfalas submetidas à arração antes de cada uma das duas ordenhas diárias, com pico de lactação em torno dos 60 dias de lactação, e produção de leite que se manteve em torno do dobro (10,82 litros de leite) das búfalas criadas extensivamente (5,19 litros de leite).

Figura 29 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na produção de leite (média em litros $\pm$ EPM) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo

Os resultados das concentrações de colesterol estão descritos nas tabelas 32 e 33, e na figura 30. Sem efeito de interação entre sistemas de criação e momento de lactação ($P>0,20$), observou-se que não houve diferença entre os sistemas de criação, mas havendo mudanças significativas nos valores deste metabólito durante a lactação.

Tabela 32 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação, na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Extensivo ⁷	77	3,12 ^a	0,79	0,09	25,32	2,94	3,30	1,70	4,80
Semi-intensivo ⁸	101	3,17 ^a	0,93	0,09	29,34	2,99	3,36	1,40	5,30

Média com um expoente (a) na mesma coluna diferiu (P = 0,3851)

Efeito Lactação (P < 0,0001)

Efeito Número de Crias (P = 0,0375)

¹N – Número de animais por grupo; ²DP – Desvio padrão; ³EPM – Erro padrão da média; ⁴CV% – Coeficiente de variação; ⁵ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷Extensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, e ordenhadas uma vez ao dia; ⁸Semi-intensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração constituída de volumoso, concentrado e mistura mineral antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Segundo Kaneko (2008), as quantidades de colesterol presentes refletem o acetil-CoA disponível para a geração de energia, oriundo basicamente da ingestão de comida. Em casos de aumento na ingestão, há aumento de insulina (BAN-TOKUDA et al., 2007), aumento da leptina (CHILLIARD et al., 2005), e redução de glucagon e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, ou seja, quando o organismo está em desfosforilação (menor desdobramento hidrolítico do ATP por ação da adenilciclase), a produção do colesterol é estimulada (KANEKO, 2008).

Tabela 33 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) criados em sistemas extensivo e semi-intensivo, na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 15	24	1,91 ^d	0,38	0,08	19,90	1,75	2,07	1,40	2,70
16 - 30	37	2,60 ^c	0,53	0,09	20,38	2,42	2,77	1,60	3,60
31 - 45	27	3,09 ^b	0,58	0,11	18,77	2,86	3,32	1,80	4,00
46 - 60	24	3,62 ^a	0,72	0,15	19,89	3,31	3,92	2,10	5,30
61 - 90	28	3,78 ^a	0,61	0,11	16,14	3,55	4,02	2,40	4,70
91 - 200	20	3,89 ^a	0,61	0,14	15,68	3,60	4,17	2,80	5,00
>200	18	3,59 ^a	0,44	0,10	12,26	3,37	3,81	2,80	4,60

Letras diferentes (a, b, c, e d) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Sistema de Criação (P = 0,3851)

Efeito Número de Crias (P = 0,0375)

¹N – Número de animais por grupo; ²DP – Desvio padrão; ³EPM – Erro padrão da média; ⁴CV% – Coeficiente de variação; ⁵ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

A queda do consumo próximo ao parto é uma característica de várias espécies de mamíferos (FRIGGENS, 2003), o que justificaria as menores concentrações de colesterol mais próximas ao parto, quando observamos valores menores que 2,00 mmol/L.

Comportamento semelhante foi observado por Ban-Tokuda et al. (2007) em búfalas confinadas, que tiveram as concentrações de colesterol sanguíneo diminuídas simultaneamente à diminuição na ingestão de alimento e ao ganho de peso.

Esta restrição alimentar fisiológica perdura até cerca dos primeiros 50 dias de lactação, quando ainda se registra uma menor ingestão de matéria seca que resulta em perda de peso (ZICARELLI, 2001). E foi exatamente a partir dos 45 dias de lactação que observamos os maiores valores encontrados, acima de 3,5 mmol/L de colesterol.

Segundo Zicarelli (2001), este comportamento hiporéxico no periparto favoreceu a sobrevivência dos indivíduos que tinham uma maior eficiência de utilizar processos catabólicos que maximizavam a utilização das reservas corpóreas. Ao selecionar os indivíduos com maior predisposição para galactopoiese, o homem acabou também por escolher os indivíduos que melhor utilizavam as reservas acumuladas durante o período seco, ou seja, utilizavam suas reservas lipídicas e musculares.

Figura 30 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na concentração de colesterol sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c, e d) diferiu ($P < 0,0001$)

Para búfalas em lactação, Campanile (1998) descreveu valores de colesterol nos períodos de 0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto, onde verificaram, respectivamente, 1,9, 2,5, 3,2 e 2,9 mmol/L. Já Verdurico (2010) descreveu, para os momentos de parto (0-15) e puerpério (16-30), e início de lactação (31-60), valores médios de 1,71, 2,03 e 2,23 mmol/L. Enquanto que Grasso et al. (2004), para intervalos de 15, 25, 35-55 e 65-85 dias pós-parto, observaram 2,05, 2,50, 2,88 e 2,98 mmol/L de colesterol. Valores absolutos estes muito próximos ou um pouco abaixo dos obtidos por nós, o que reflete a variável, mas crescente ingestão de alimento dos animais.

As concentrações de triglicérides estão dispostas na tabela 34 e figura 31. Com efeito de interação ($P < 0,0001$), observa-se claramente três momentos distintos. Até os 45 dias pós-parto, as concentrações de triglicérides das búfalas criadas em manejo semi-intensivo se mantiveram crescentes e maiores que nas búfalas de manejo extensivo. Posteriormente observa-se uma queda nos valores deste metabólito em ambos os grupos entre 46 e 90 dias de lactação, sendo muito mais acentuada para os animais sob criação semi-intensiva. Por fim, após esta brusca diminuição, há inversão de comportamento, pois os triglicérides séricos começam a aumentar paulatinamente em ambos os grupos, só que se mantém em maiores quantidades nas fêmeas criadas exclusivamente a pasto.

Os triglicérides detectados no soro são aqueles disponíveis ao organismo, tanto os contidos nas lipoproteínas quilomícrons, resultado da absorção de lipídios pelo intestino delgado, como os em VLDL, oriundos da síntese de triglicérides pelos hepatócitos (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Além disso, são postuladas as limitadas quantidades de VLDL fisiologicamente produzidas por ruminantes (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; KANEKO, 2008), e que ainda podem ser mais prejudicadas pela maior presença de glucagon (GIBBONS, 1990), baixa ingestão de carboidratos (KANEKO, 2008), e condições de subnutrição (BONNET et al., 2004), como em casos de final de gestação, puerpério, e pico de lactação.

Porém, essa teoria explica somente o primeiro terço do fenômeno visto nos resultados de triglicérides, pois supostamente, búfalas criadas exclusivamente a pasto têm inferior densidade energética alimentar em relação às búfalas criadas sob pastagem mais arraçoamento. Talvez por isso se verifiquem diferenças de quase 0,10 mmol/L de triglicérides entre as respectivas fêmeas até 45 dias de lactação.

Sabe-se que os lipídios sangüíneos são de fundamental importância na síntese da gordura do leite (KANEKO, 2008), e as principais fontes dessa gordura são os triglicérides,

fosfolipídios, ésteres de colesterol (parte do colesterol total), e os NEFA circulantes oriundos da lipólise (IVERSON et al., 1995; TRIPATHI et al., 2010).

Tabela 34 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos

	Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Extensivo ⁷	1 - 15	9	0,33 ^{abcd}	0,12	0,04	36,36	0,24	0,43	0,20	0,60
	16 - 30	14	0,33 ^{cde}	0,11	0,03	33,33	0,27	0,40	0,10	0,60
	31 - 45	14	0,35 ^{bcd}	0,08	0,02	22,86	0,30	0,40	0,20	0,50
	46 - 60	11	0,30 ^{cdef}	0,13	0,04	43,33	0,21	0,39	0,10	0,50
	61 - 90	9	0,25 ^{ef}	0,09	0,03	36,00	0,19	0,32	0,20	0,40
	91 - 200	10	0,34 ^{abc}	0,07	0,02	20,59	0,29	0,39	0,20	0,40
	>200	10	0,41 ^a	0,06	0,01	14,63	0,37	0,45	0,30	0,50
Semi-intensivo ⁸	1 - 15	15	0,34 ^{abc}	0,08	0,02	23,53	0,29	0,38	0,20	0,50
	16 - 30	23	0,41 ^a	0,07	0,01	17,07	0,38	0,44	0,30	0,50
	31 - 45	13	0,40 ^a	0,06	0,02	15,00	0,36	0,43	0,30	0,50
	46 - 60	13	0,39 ^{ab}	0,09	0,03	23,08	0,33	0,45	0,20	0,50
	61 - 90	19	0,17 ^g	0,10	0,02	58,82	0,12	0,22	0,10	0,50
	91 - 200	10	0,22 ^{fg}	0,04	0,01	18,18	0,19	0,25	0,20	0,30
	>200	8	0,27 ^{def}	0,10	0,03	37,04	0,19	0,36	0,20	0,50

Letras diferentes (a, b, c, d, e, f, e g) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Lactação (P < 0,0001)

Efeito Sistema de Criação (P = 0,2975)

Efeito ECC (P = 0,0211)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Extensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, e ordenhadas uma vez ao dia; ⁸ Semi-intensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração constituída de volumoso, concentrado e mistura mineral antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

A quantidade de ácidos graxos no leite de mamíferos é de fundamental importância para suprir as necessidades energéticas dos neonatos, principalmente por se tratar de sua exclusiva fonte alimentar (IVERSON et al., 1995). Talvez por sua mais recente seleção genética para alta produção de leite em relação às raças bovinas especializadas, Zicarelli (2001) descreve que búfalas mantêm a proporção na quantidade de gordura do leite, mesmo quando as matrizes passam por privações energéticas, mas ocorre diminuição na produção do leite dessas búfalas (ZICARELLI, 2001).

O que ajuda a entendermos o observado nas búfalas em torno dos 46 a 90 dias após o parto. O resgate de triglicérides circulantes para a produção do tão gorduroso leite de búfala

começa a diminuir as concentrações de triglicérides entre 46 e 60 dias de lactação de ambos os sistemas de criação, mas leva este metabólito aos limites mínimos nas búfalas em manejo semi-intensivo entre 61-90 dias de lactação. Por mais que sua ingestão seja máxima, como vimos nas concentrações de colesterol, a qualidade nutricional passa por um momento de limitações lipídicas diante da quantidade de leite produzida, sendo necessário lançar mão das reservas corporais para suprir as menores quantidades de lipídios circulantes, refletindo-se nos maiores valores de β -HBO e piores ECC, como discutiremos a frente.

Figura 31 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na concentração de triglicérides séricos (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, c, d, e, f, e g) diferiu ($P < 0,0001$)

E por fim, para o fenômeno observado após a queda nos triglicérides circulantes, Bonnet et al. (2000; 2004) descreveram, respectivamente, os perfis metabólicos de ovelhas e vacas cronologicamente submetidas à período de alimentação controle (123 e 130% das necessidades energéticas), depois à período de privação nutricional (22 e 21% das necessidades energéticas), seguida por período de realimentação (190 e 237% das

necessidades energéticas), e observaram que durante a privação energética foram registrados os menores valores de triglicérides (c) e de lipoproteína lipase (LPL). Mas após o período de realimentação as concentrações de LPL atingem seus maiores níveis, enquanto que os triglicérides aumentam em relação ao período de privação (b), mas sem atingir os mesmo níveis de quando alimentadas no período controle (a), mesmo com uma alimentação muito mais calórica ($P<0,05$ para as ovelhas e $P<0,01$ para as vacas).

Somado a isso, Iverson et al. (1995) descreve que quanto maiores as produções de LPL durante a lactação, maiores as concentrações de gordura no leite ($r = +0,881$; $P=0,019$) e menores as quantidades de triglicérides circulantes ($r = -0,783$; $P=0,027$). Pois durante a lactação, a LPL que leva os triglicérides circulantes para a maioria dos tecidos está suprimida pela prolactina, mas a LPL produzida pela glândula mamária está ativa, para manter os níveis ideais de gordura no leite.

O que explica o comportamento discretamente crescente dos triglicérides observado nas búfalas acima de 91 dias de lactação, criadas semi-intensivamente. Por mais que as búfalas criadas sob manejo extensivo tenham um leite proporcionalmente mais gordo, nunca atingiriam as quantidades absolutas de gordura liberadas pela glândula mamária das vacas alimentadas com ração, devido à maior produção de leite das búfalas arraçadas.

Passado o momento crítico entre 46-90 dias de lactação, com o início da queda na produção de leite, aliado a grande ingestão alimentar, e as provavelmente maiores quantidades de insulina e LPL, permite-se que os triglicérides circulantes continuem migrando para o leite, mas agora também para os tecidos. Em face ao exposto, o excesso de triglicérides é agora incorporado ao tecido adiposo o que pode ser evidenciado pelo aumento significativo da condição corporal dos animais a partir dos 91 dias de lactação.

Em trabalho realizado com búfalas na Itália, Zicarelli (2001) descreve que o teor lipídico do leite é inversamente proporcional a quantidade de leite produzido. Entre 90 e 100 dias de lactação, quando a produção de leite atinge seu máximo, o teor lipídico (%) do leite é inferior a média de toda a lactação, pois mesmo com uma dieta de alta qualidade ($>70\%$ de nutrientes digestíveis totais - NDT) os animais não conseguem ingerir nutrientes suficientes para atender suas altíssimas necessidades metabólicas. Somente após os 100 dias de lactação, com a diminuição da produção de leite e o aumento no consumo de matéria seca, é que os teores lipídicos conseguem atingir patamares maiores.

Para búfalas em lactação, Campanile (1998) descreveu valores de triglicérides nos períodos de 0-15, 15-30, 30-70 e >70 , onde obtiveram as respectivas médias de 0,35, 0,34, 0,32 e 0,38 mmol/L. Estes valores ficaram de acordo com os encontrados em nosso trabalho,

com exceção da média encontrada no período acima de 70 dias de lactação. Como discutido anteriormente, a brusca queda em nossos valores de triglicérides pode refletir as deficiências nutricionais encontradas na realidade das fazendas brasileiras.

Já Grasso et al. (2004) realizaram colheitas nos momentos de 15, 25, 35-55 e 65-85 dias após o parto, e obtiveram, respectivamente, valores de 0,09, 0,11, 0,10 e 0,10 mmol/L de triglicérides. Esses valores se mantiveram bem abaixo dos encontrados por nós, no entanto, houve diferenças relevantes nas curvas de lactação dos dois trabalhos. Enquanto observamos uma crescente produção de leite do parto até 45-90 dias de lactação, Grasso et al. (2004) obtiveram início de lactação já com sua produção máxima, e além dessa não aumentar em momento algum, começa a diminuir a partir do segundo mês de lactação.

As quantidades de β -HBO circulantes estão descritas nas tabelas 35 e 36, e figura 32. Sem efeito de interação ($P > 0,20$), observa-se que as quantidades de β -HBO foram maiores nas búfalas criadas em sistema extensivo de pastagens. E que este metabólito diminuiu gradativamente do parto aos 45 dias pós-parto, aumentou bruscamente entre 46 e 90 dias de lactação, mas voltou a diminuir a partir dos 91 dias de lactação.

Tabela 35 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação, na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Extensivo ⁷	77	0,85 ^a	0,30	0,03	35,29	0,78	0,92	0,41	1,97
Semi-intensivo ⁸	101	0,77 ^b	0,22	0,02	28,57	0,73	0,82	0,37	1,59

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P = 0,0066$)

Efeito Lactação ($P < 0,0001$)

Efeito ECC ($P = 0,0071$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Extensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, e ordenhadas uma vez ao dia; ⁸ Semi-intensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração constituída de volumoso, concentrado e mistura mineral antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

O β -HBO é um derivado cetônico que pode ter origem tanto na cetogênese alimentar quanto na metabólica, mas independente de sua origem, pode ser utilizado como fonte de energia pela maioria dos tecidos corporais. O butirato ruminal é convertido em β -HBO pelas células da parede ruminal, mas também pode ser formado após a lipólise, quando grande quantidade do NEFA chega ao fígado, ultrapassando as quantidades de oxaloacetato disponíveis para adentrar ao ciclo de Krebs, formando então os corpos cetônicos, através da β -Oxidação (HEITMANN et al., 1987; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; MARUTA, 2005;

KANEKO, 2008). Vale ressaltar que em condições normais, cerca de 70% dos corpos cetônicos circulantes são produzidos no rúmen, e somente 30% produzido pelo fígado (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999).

Apesar de não termos quantificado a ingestão de matéria seca, partiremos do pressuposto que as búfalas criadas em ambos os sistemas comeram quantidades aproximadas de comida (concentrações semelhantes de colesterol), o que exclui a possibilidade de que as quantidades de β -HBO sejam maiores nas búfalas sob manejo extensivo exclusivamente devido à cetogênese alimentar. Portanto, as maiores concentrações de β -HBO nas fêmeas que se alimentaram somente de pasto devem ter origem nas menores quantidades de oxaloacetato disponíveis no fígado, principalmente devido às limitadas quantidades de propionato de origem ruminal, e conseqüentemente, menores taxas glicêmicas encontradas nestas búfalas, como será exposto, por mais que não sejam constatadas maiores quantidades de NEFA circulantes num momento de lipólise.

Durante a lactação, esperar-se-ia que este metabólito diminuísse um pouco após o estresse do parto, e mantivesse quantidades condizentes com a cetogênese alimentar, acompanhando sutilmente as quantidades de alimento ingerido, como foi visto em animais aos 31-45, 91-200 e mais de 200 dias de lactação. Mas chama atenção o brusco aumento entre 46 e 90 dias após o parto, que coincidem exatamente com o momento de persistência do pico de lactação das búfalas em manejo semi-intensivo, e a diminuição dos triglicérides circulantes.

Tabela 36 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) criados em sistemas extensivo e semi-intensivo, na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 15	24	0,83 ^{bc}	0,24	0,05	28,92	0,73	0,93	0,46	1,36
16 - 30	37	0,80 ^{bc}	0,24	0,04	30,00	0,72	0,88	0,48	1,53
31 - 45	27	0,71 ^{cd}	0,30	0,06	42,25	0,60	0,83	0,37	1,79
46 - 60	24	0,85 ^{ab}	0,27	0,06	31,76	0,74	0,97	0,53	1,59
61 - 90	28	0,98 ^a	0,28	0,05	28,57	0,87	1,09	0,53	1,97
91 - 200	20	0,75 ^{cd}	0,14	0,03	18,67	0,68	0,82	0,52	1,04
>200	18	0,67 ^d	0,18	0,04	26,87	0,58	0,76	0,39	1,19

Letras diferentes (a, b, c, e d) na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,0001)

Efeito Sistema de Criação (P = 0,0066)

Efeito ECC (P = 0,0071)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Figura 32 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na concentração de β -HBO sérico (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média $\pm$ EPM) com um expoente (a, b, c, e d) diferiu ($P < 0,0001$)

Portanto, a limitada quantidade de nutrientes lipídicos, aliada a ineficiência na formação de glicose a partir dos produtos gerados pela lipólise no período de persistência do pico de lactação, fez com que fosse produzido mais β -HBO entre 46-90 dias de lactação, sendo este fenômeno mais intensificado nas búfalas com limitações energéticas, como foi o caso das fêmeas criadas sob sistema extensivo de manejo.

Para búfalas em lactação, Campanile (1998) acompanhou a bioquímica dos momentos 0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto, observando médias, respectivamente, de 0,18, 0,13, 0,14 e 0,16 mmol/L de β -HBO. Enquanto que Verdurico (2010) colheu amostras no parto (0-15) e puerpério (16-30), e início de lactação (31-60), obtendo médias, respectivamente, de 0,41, 0,45 e 0,44 mmol/L de β -HBO.

Em ambos os trabalhos foram relatadas curvas de β -HBO com comportamentos semelhantes à observada em nossa pesquisa, onde houve pouca variação até os 60 dias de lactação. Com exceção dos valores obtidos por Campanile (1998) acima de 70 dias de

lactação, que se mantiveram estáveis, enquanto que os nossos apresentaram um pico, provavelmente pela lipólise em reflexo a hipotrigliceridemia para a produção de gordura do leite.

Porém, os valores absolutos observados pelos referidos pesquisadores foram inferiores aos encontrados em nossa pesquisa. Dentro da literatura pesquisada sobre búfalos, esta magnitude de valores só foi compatível com bezerros lactentes (0,24 e 0,25 mmol/L), que normalmente têm sua produção de β -HBO comprometida devido ao incompleto amadurecimento ruminal (VERDURICO, 2010). Porém, em pesquisa com vacas leiteiras que tiveram sangue colhido em jejum, Bonnet et al. (2004) verificaram valores que variaram em torno de 0,15-0,25 mmol/L de β -HBO, chegando a triplicar (0,56-0,71 mmol/L) quando a colheita do sangue é realizada nas mesmas vacas, algumas horas após a refeição. Valores estes bem mais próximos dos nossos, talvez porque nossas colheitas nunca foram realizadas em animais submetidos a jejum.

As quantidades de NEFA estão descritas nas tabelas 37 e 38, e na figura 33. Sem efeito de interação ($P > 0,20$), observa-se que as maiores quantidades deste metabólito são encontradas nas búfalas criadas semi-intensivamente. E que o NEFA diminui paulatinamente do parto até o final da lactação.

O NEFA basicamente reflete o grau de lipólise do animal, ou seja, o quanto está sendo demandado pelo organismo para suprir as necessidades energéticas (BONNET et al., 2004; MONDAL; PRAKASH, 2004). Sendo uma variável muito sensível, e indicada para determinar o balanço energético e a condição corporal (VAN SAUN, 2000).

Tabela 37 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação, na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Extensivo ⁷	77	143,26 ^b	84,49	9,63	58,98	124,09	162,44	45,48	456,62
Semi-intensivo ⁸	101	355,27 ^a	346,42	34,64	97,51	286,53	424,00	42,83	1701,40

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Lactação ($P < 0,0001$)

Efeito Número de Crias ($P = 0,0011$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Extensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, e ordenhadas uma vez ao dia; ⁸ Semi-intensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração constituída de volumoso, concentrado e mistura mineral antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

A partir do momento em que a quantidade de acetil-CoA produzida pela presença de NEFA sobrepular a quantidade de oxaloacetato das mitocôndrias hepáticas, o acetil-CoA é então direcionado para a Via da β -Oxidação, sendo recondensado em acetoacetato, precursor dos corpos cetônicos β -HBO e acetona (CUNNINGHAM, 1999; KANEKO, 2008), onde cerca de 65% do acetoacetato produzido acaba se transformando em β -HBO (MARUTA, 2005).

Tabela 38 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) criados em sistemas extensivo e semi-intensivo, na concentração de NEFA sérico ($\mu\text{mol/L}$) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 15	24	488,08 ^a	490,08	100,04	100,41	281,14	695,02	86,46	1583,45
16 - 30	37	357,52 ^b	380,65	62,58	106,47	230,60	484,43	58,40	1701,40
31 - 45	27	239,74 ^{bc}	117,67	23,08	49,08	192,21	287,26	47,82	458,05
46 - 60	24	173,11 ^c	104,58	21,35	60,41	128,95	217,27	63,80	434,73
61 - 90	28	237,82 ^c	119,93	22,66	50,43	191,32	284,33	45,48	577,11
91 - 200	20	130,66 ^c	54,39	12,16	41,63	105,20	156,11	55,32	293,54
>200	18	108,66 ^c	51,39	12,11	47,29	83,10	134,21	42,83	276,75

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Sistema de Criação ($P < 0,0001$)

Efeito Número de Crias ($P = 0,0011$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Segundo Lucy et al. (2001) o tipo de curva do NEFA observado em nosso trabalho é considerado como de um “período de transição normal”, pois as vacas aumentam a ingestão de alimento, o que supostamente aumenta os níveis de insulina e colesterol, e diminui as quantidades de hormônio do crescimento (GH) para as quantidades adequadas, interrompendo a lipólise iniciada no momento do parto. Como não houve interação entre os sistemas de criação e o momento de lactação ($P > 0,02$), pode-se inferir que o comportamento de diminuição nos valores de NEFA é semelhante para todas as búfalas, sendo mais bem definido para as fêmeas criadas semi-intensivamente, devido à magnitude das respostas observadas.

Como foi visto entre 1 e 30 dias após o parto, esperaríamos observar maiores concentrações de NEFA no período entre 46-90 dias de lactação, o que seria compatível com os aumentos observados de β -HBO no mesmo período. Mas diferentemente do puerpério, além da manutenção energética corpórea, o momento de 46-90 dias pós-parto é quando as búfalas estão mantendo sua lactação, o que também sequestra NEFA para a produção de

gordura do leite, pois estes nada mais são do que ácidos graxos, tijolos para a formação de triglicérides (IVERSON et al., 1995; HOCQUETTE; BAUCHART, 1999; KANEKO, 2008; TRIPATHI et al., 2010). Talvez por esse motivo encontremos valores estáveis de NEFA enquanto observamos os momentos de pior condição corporal.

É importante destacar que após a oxidação do NEFA para acetil-CoA na mitocôndria dos hepatócitos, o mesmo é condensado ao oxaloacetato, um composto do Ciclo de Krebs, formando citrato. Somente como citrato os ácidos graxos da lipólise podem ingressar no Ciclo de Krebs e colaborar com a formação de energia na forma de glicose. Porém, o acetil-CoA formado gera somente CO₂, não tendo capacidade, sozinho, de produzir glicose. O oxaloacetato não pode ser produzido em situações de ausência de propionato, precursor da glicose, portanto, precisa ser devolvido ao ciclo de Krebs (CUNNINGHAM, 1999; KANEKO, 2008).

Figura 33 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na concentração de NEFA sérico (μmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a e b) diferiu (P < 0,0001)

Por mais que o processo de produção de energia a partir de ácidos graxos não seja tão eficiente (HOCQUETTE; BAUCHART, 1999), é necessário para animais com deficiência energética alimentar de propionato, os quais possuem menor eficiência hepática na formação de oxaloacetato, como provavelmente é o caso de búfalas em lactação criadas exclusivamente a pasto. Em animais com essa disponibilidade alimentar, esperar-se-ia menor eficiência hepática na utilização de NEFA, e maior desvio destes ácidos graxos para a β -Oxidação, com maior formação de β -HBO, como foi constatado nas búfalas sob sistema extensivo de manejo.

Kaneko (2008) enfatiza que o determinante para a maior produção de β -HBO durante a cetogênese metabólica não é a quantidade de NEFA ligado a albumina que chega ao fígado, mas sim, a quantidade de oxaloacetato que está disponível para transformá-lo em acetil-CoA. Portanto, fica claro que o determinante para o aparecimento de possíveis casos de cetose ou ceto-acidose (excesso na produção de corpos cetônicos) não são as quantidades de NEFA presentes nas búfalas criadas sob sistema semi-intensivo de manejo, mas as limitadas quantidades de propionato ruminal e oxaloacetato nas búfalas produtoras de leite criadas exclusivamente a pasto.

A prova cabal dessa estreita relação fisiológica entre a qualidade alimentar e produção de leite com as quantidades de β -HBO e NEFA são os registros de quatro búfalas que estavam entre as maiores produtoras do sistema extensivo de manejo. No momento em que as mesmas produziram 7,6, 7,6, 7,7, 8,7 litros de leite, foram observados, respectivamente, valores de 1,27, 1,27, 1,97 e 1,79 mmol/L de β -HBO, e 70,57, 58,40, 77,18 e 52,88 μ mol/L de NEFA. Onde se pode observar que búfalas boas produtoras de leite mantidas somente a pasto provavelmente passam por lipólise, mas que o NEFA liberado é capturado tanto para a produção da gordura do leite como para a produção de energia corpórea, por meio de excessiva formação de corpos cetônicos.

Na literatura, para búfalas em lactação, Campanile (1998) mensuraram as concentrações de NEFA nos momentos 0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto, e obtiveram as respectivas médias de 500, 450, 400 e 325 μ mol/L. Valores esses semelhantes aos verificados por nós, tanto em valores como em comportamento diante do período de periparto.

Grasso et al. (2004) obtiveram valores de NEFA próximos aos nossos, mas com comportamento diferente, pois nos momentos 15, 25, 35-55 e 65-85 dias após o parto, obtiveram os respectivos valores de 270, 300, 384 e 370 μ mol/L de NEFA. Pudemos notar que semelhantemente às menores quantidades de triglicérides durante todo o pós-parto, somadas a decrescente média de produção leiteira, observamos que as búfalas deste trabalho tiveram aumento do NEFA logo um mês após o parto, enquanto que um quadro semelhante a

este foi observado em nosso trabalho somente entre 61-90 dias de lactação, mas sem aumento significativo de NEFA.

Já Verdurico (2010) descreve um terceiro tipo de curva para o NEFA, pois ao mensurar este metabólito nos momentos de parto (0-15) e puerpério (16-30), e no início de lactação (31-60), a autora observa valores médios de 726, 755 e 810 $\mu\text{mol/L}$ de NEFA, distinguindo-se do que observamos tanto em maiores valores de NEFA, quanto uma curva crescente até 60 dias de lactação. Lucy et al. (2001) descrevem esse tipo de curva para o NEFA como um período de transição anormal, quando as vacas não aumentam sua ingestão de alimento como deveriam, o que prejudica o aumento a insulina e do colesterol, e não diminui as quantidades de hormônio do crescimento (GH) para as quantidades adequadas, o que não interrompe a lipólise iniciada no momento do parto.

As concentrações de glicose estão descritas nas tabelas 39 e 40, e figura 34. Sem efeito de interação ($P > 0,20$), observamos que a glicemia das búfalas criadas sob manejo semi-intensivo foi maior do que as criadas somente a pasto. E que após o parto, a glicemia das fêmeas diminuiu até os 45 dias pós-parto, quando se manteve estável até o final da lactação.

Tabela 39 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação, na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Extensivo ⁷	77	3,33 ^b	0,32	0,04	9,61	3,26	3,40	2,40	4,40
Semi-intensivo ⁸	101	3,79 ^a	0,27	0,03	7,12	3,74	3,84	3,20	4,40

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,0001$)

Efeito Lactação ($P = 0,0037$)

Efeito Idade ($P = 0,0391$)

Efeito ECC ($P = 0,0712$)

Efeito Número de Crias ($P = 0,1431$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMín – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Extensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, e ordenhadas uma vez ao dia; ⁸ Semi-intensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração constituída de volumoso, concentrado e mistura mineral antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

Nos ruminantes, grande parte da energia utilizada no seu metabolismo é obtida de ácidos graxos voláteis provenientes da fermentação ruminal, sendo que a síntese de glicose a partir dos ácidos graxos voláteis é dependente do perfeito funcionamento do fígado, uma vez que este órgão é o regulador da concentração de glicose no sangue e da oferta de glicose aos tecidos, sendo essencialmente o único local para a gliconeogênese (formação de glicose a

partir de compostos carbônicos), ainda que exista uma pequena contribuição do córtex renal (HERDT, 2000).

Segundo Van Soest (1994), o nível da alimentação tem pouca influência nas taxas circulantes de glicemia de ruminantes. E quando em excesso, a glicose é estocada no organismo sob a forma de glicogênio. Assim, os níveis de glicogênio hepático e muscular são relativamente constantes, embora haja síntese e degradação contínuas reguladas por ação hormonal. Enquanto a insulina e os glicocorticóides favorecem o acúmulo de glicogênio, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e o glucagon possuem atividade glicogenolíticas (BEITZ, 1996).

Tabela 40 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) criados em sistemas extensivo e semi-intensivo, na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 15	24	3,79 ^a	0,37	0,07	9,76	3,63	3,94	2,90	4,40
16 - 30	37	3,70 ^{ab}	0,37	0,06	10,00	3,58	3,83	3,00	4,40
31 - 45	27	3,51 ^c	0,29	0,05	8,26	3,39	3,62	3,10	4,00
46 - 60	24	3,53 ^{bc}	0,33	0,07	9,35	3,39	3,67	3,10	4,40
61 - 90	28	3,52 ^c	0,37	0,07	10,51	3,38	3,66	2,80	4,10
91 - 200	20	3,59 ^{abc}	0,37	0,08	10,31	3,42	3,76	2,80	4,30
>200	18	3,42 ^c	0,40	0,09	11,70	3,22	3,62	2,40	4,00

Letras diferentes (a e b) na mesma coluna indicam diferença estatística (P = 0,0037)

Efeito Sistema de Criação (P < 0,0001)

Efeito Idade (P = 0,0391)

Efeito ECC (P = 0,0712)

Efeito Número de Crias (P = 0,1431)

¹N – Número de animais por grupo; ²DP – Desvio padrão; ³EPM – Erro padrão da média; ⁴CV% – Coeficiente de variação; ⁵ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Ban-Tokuda et al. (2007) observou os efeitos da insulina em bovinos e bubalinos confinados, constatando que no decorrer do experimento, os níveis de insulina acompanharam as concentrações de colesterol, consequência do aumento na ingestão de ração. E no mesmo período a glicose decresceu, provavelmente em função do efeito das maiores concentrações de insulina circulantes.

O mesmo foi observado por Bonnet et al. (2004), que verificaram o efeito metabólico e hormonal em vacas de leite submetidas à alimentação controle, privação nutricional e realimentação. E observaram que durante o período de privação nutricional, a insulina se mantinha intacta e em seus mais baixos patamares (P=0,003), mesmo após as refeições. E exatamente o inverso acontecia com a glicose, que mantinha suas maiores concentrações

($P=0,07$) após as refeições, quando comparada com o período controle e o de realimentação. Funcionamento oposto foi observado durante a realimentação, que após as refeições, tinham as maiores concentrações de insulina ($P=0,003$), e as menores concentrações de glicose ($P=0,07$).

Talvez por isso tenhamos observado tão poucas variações numéricas, e níveis decrescentes de glicose até quando o colesterol atingiu níveis acima de 3,00 mmol/L, se mantendo estáveis até o final da lactação, junto ao colesterol.

Figura 34 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), na concentração de glicose plasmática (mmol/L) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a e b) diferiu ($P = 0,0037$)

Verdurico (2010) avaliou búfalas no parto (0-15) e puerpério (16-30), e início de lactação (31-60), obtendo valores médios de 3,72, 3,33 e 3,73 mmol/L. Já Grasso et al. (2004), com búfalas entre 15, 25, 35-55 e 65-85 dias pós-parto, obtiveram médias de 3,79, 3,71, 3,62 e 3,42 mmol/L de glicose. Estando de acordo com os valores obtidos por nós.

E para avaliar o efeito de diferentes concentrações de proteína (13,5 e 15,5% de proteína bruta - PB) na alimentação de búfalas paridas, Campanile (1998) suplementou dois grupos de vacas durante diferentes momentos (0-15, 15-30, 30-70 e >70 dias pós-parto). Os resultados obtidos de acordo com os respectivos momentos foram 3,1, 3,3, 3,5 e 3,5 mmol/L de glicose para o grupo que recebeu 13,5% de PB, e 3,9, 4,3, 4,2 e 4,1 mmol/L de glicose para o grupo que recebeu 15,5% de PB. Mostrando resultados semelhantes aos nossos, tanto para os diferentes momentos da lactação como glicemia para pior e melhor nível alimentar.

Os valores obtidos para o ECC estão descritos nas tabelas 41 e 42, e figura 35. Sem interação ($P>0,02$), foram observados ECC semelhantes para as búfalas criadas em ambos os sistemas de criação. Com ECC decrescendo do parto até atingir seus menores valores aos 31-45 dias de lactação, quando então se mantém até melhorar e atingir os maiores valores entre 91-200 dias de lactação.

Tabela 41 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação, no escore de condição corporal (ECC) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
Extensivo ⁷	77	3,30 ^a	0,57	0,06	17,27	3,17	3,43	2,00	4,50
Semi-intensivo ⁸	101	3,22 ^a	0,43	0,04	13,35	3,13	3,30	2,00	4,00

Média com um expoente (a) na mesma coluna diferiu ($P = 0,3386$)

Efeito Lactação ($P = 0,0210$)

¹ N – Número de animais por grupo; ² DP – Desvio padrão; ³ EPM – Erro padrão da média; ⁴ CV% – Coeficiente de variação; ⁵ ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ ICMáx – Intervalo de confiança máximo; ⁷ Extensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo contínuo de forragem cultivada não adubada, com disponibilidade de água e mistura mineral *ad libitum*, e ordenhadas uma vez ao dia; ⁸ Semi-intensivo – Búfalas recém-paridas, criadas em pastejo rotacionado de forragem cultivada adubada a cada ciclo de lotação, com disponibilidade de água *ad libitum*, e fornecimento de ração constituída de volumoso, concentrado e mistura mineral antes de cada uma das duas ordenhas diárias.

O ECC é um método subjetivo para estimar a quantidade de energia metabolizável estocada na gordura e nos músculos (reservas corporais) de um animal vivo (EDMONSON et al., 1989; HOUGHTON et al., 1990). Servindo, portanto, para quantificar a habilidade que a fêmea possui de utilizar ou preservar as reservas corporais, de acordo com o desafio metabólico a que é submetida.

Por meio da utilização do ECC conseguiu-se detectar os principais momentos de pior e melhor condição metabólica para as búfalas estudadas. Pois o momento de maior produção leiteira, registrado entre 31 e 90 dias de lactação, foi marcado pelo menor ECC, e depois que a produção leiteira diminui, quando os depósitos energéticos voltam a ser formados, a partir dos 90 dias de lactação, são detectadas melhoras consideráveis na condição corporal das búfalas.

Tabela 42 - Efeito dos diferentes grupos de lactação (dias) criados em sistemas extensivo e semi-intensivo, no escore de condição corporal (ECC) de búfalos

Grupo	N ¹	Média	DP ²	EPM ³	CV% ⁴	ICMin ⁵	ICMáx ⁶	Mínimo	Máximo
1 - 15	24	3,33 ^{abc}	0,56	0,11	16,82	3,09	3,57	2,50	4,00
16 - 30	37	3,13 ^{bc}	0,48	0,08	15,34	2,97	3,29	2,00	4,00
31 - 45	27	3,11 ^c	0,44	0,08	14,15	2,93	3,29	2,50	4,00
46 - 60	24	3,12 ^{bc}	0,42	0,09	13,46	2,95	3,30	2,00	4,00
61 - 90	28	3,30 ^{abc}	0,39	0,07	11,82	3,15	3,45	2,50	4,00
91 - 200	20	3,52 ^a	0,55	0,12	15,63	3,27	3,78	2,50	4,50
>200	18	3,42 ^{ab}	0,55	0,13	16,08	3,14	3,69	2,50	4,50

Letras diferentes (a, b, e c) na mesma coluna indicam diferença estatística (P = 0, 0210)

Efeito Sistema de Criação (P = 0, 3386)

¹N – Número de animais por grupo; ²DP – Desvio padrão; ³EPM – Erro padrão da média; ⁴CV% – Coeficiente de variação; ⁵ICMin – Intervalo de confiança mínimo; ⁶ICMáx – Intervalo de confiança máximo.

Figura 35 - Efeito dos diferentes grupos de sistema de criação (extensivo e semi-intensivo) durante a lactação (dias), no escore de condição corporal (ECC) de búfalos. Valores dentro dos quadrados brancos representam o número de animais por grupo. Valores (média±EPM) com um expoente (a, b, e c) diferiu (P = 0, 0210)

Diante do perfil metabólico de búfalas leiteiras sob reais condições de manejo, independente do sistema de criação, percebe-se a real necessidade de mais pesquisas sobre a nutrição de búfalas leiteiras brasileiras, e as relações entre a alimentação, produção de leite, comportamento metabólico e custos de produção.

9.3 CONCLUSÃO

Conclui-se que existem diferenças metabólicas consideráveis entre búfalas leiteiras criadas sob manejo extensivo ou semi-intensivo. Por mais que a quantidade de alimento ingerida pelas búfalas de ambos os sistemas de criação mantenha semelhante relação com o peso vivo, a densidade energética disponível na dieta é determinante para que as búfalas expressem seu potencial produtivo.

Búfalas que possuem genética compatível com produção leiteira, mesmo quando criadas somente a pasto, demonstram habilidades metabólicas para manter bons índices leiteiros. Porém, na mesma magnitude do esforço de produzir sem condições alimentares adequadas, estas fêmeas mantêm-se mais próximas da interface saúde-doença.

10 CONCLUSÕES

Conclui-se que os constituintes metabólicos selecionados para mensurar do lipidograma e a glicemia de búfalos sadios criados no Estado de São Paulo, foram consideravelmente influenciados pela idade, sexo, puerpério, lactação e sistema de criação, não sendo verificada influência relevante pela gestação de novilhas.

Dentre os fatores fisiológicos avaliados, os parâmetros metabólicos foram influenciados de forma determinante pelo nível de desenvolvimento ruminal, momento da colheita de sangue em relação à alimentação, momento em relação ao parto, intensidade da lactação, mas principalmente, pela qualidade do manejo nutricional a que os animais foram submetidos em seus diversos momentos produtivos na propriedade leiteira.

Devido à grande quantidade de amostras estrategicamente colhidas, obtidas de diferentes realidades criatórias, também foi possível sugerir os valores de referência para o lipidograma e glicemia de búfalos em diferentes idades, sexos, momentos gestacionais, fases do parto e períodos de lactação.

REFERÊNCIAS

- ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S. G.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.
- ANAND, L. N.; PRAKASH, B. S. Comparative profiles of different lipoprotein cholesterol parameters and Growth Hormone during hot humid and winter season in Murrah Buffaloes. **Livestock Science**, v. 115, p. 294-300, 2008.
- ANDERSON, K. L.; NAGARAJA, T. G.; MORRILL, J. L. Ruminal Metabolic Development in Calves Weaned Conventionally or Early. **Journal Dairy Science**, v. 70, p. 1000-1005, 1987.
- ARAVE, C. W.; MILLER, R. H.; LAMB, R. C. Genetic and environment effects on serum cholesterol of dairy cattle of various ages. **Journal Dairy Science**, v. 58, p. 423-427, 1975.
- BAIRD, G. D. Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 1-10, 1982.
- BAN-TOKUDA, T.; ORDEN, E. A.; BARRIO, A. N.; LAPITAN, R. M.; DELAVAUD, C.; CHILLIARD, Y.; FUJIHARA, T.; CRUZ, L. C.; HOMMA, H.; KANAI, Y. Effects of species and sex on plasma hormone and metabolite concentrations in crossbred Brahman cattle and crossbred water buffalo. **Livestock Science**, v. 107, p. 244-252, 2007.
- BARHAM, D.; TRINDER, P. An Improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst**, v. 97, p. 142-145, 1972.
- BARLEY, G. G.; BAGHEL, R. P. S. Effect of bypass fat supplementation on milk yield, fat content and serum triglyceride levels of Murrah buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v.28, n. 4, p. , 2009.
- BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; MOLERO-FILHO, J. R.; PORTO FILHO, R. Effect of body condition score at calving on postpartum reproductive performances in buffalo. **Buff J.**, v. 1, p. 53-65, 2001.
- BEITZ, D. C. **Dukes** - Fisiologia dos animais domésticos. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2804-2819, 1995.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.
- BONNET, M.; FAULCONNIER, Y.; HOCQUETTE, J. F.; BOCQUIER, F.; LEROUX, C.; MARTIN, P.; CHILLIARD, Y. Nutritional status induces divergent variations of GLUT4 protein content, but not lipoprotein lipase activity, between adipose tissues and muscles in adult cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 92, p. 617-625, 2004.

BONNET, M.; LEROUX, C.; FAULCONNIER, Y.; HOCQUETTE, J. F.; BOCQUIER, F.; MARTIN, P.; CHILLIARD, Y. Lipoprotein lipase activity and mRNA are up-regulated by refeeding in adipose tissue and cardiac muscle of sheep. **Journal Nutrition**, v. 130, p. 749-756, 2000.

BUTLER, W. R.; CANFIELD, R.W. Interrelationships between energy balance and postpartum reproduction. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 1989, Ithaca. **Proceedings...** 1989, Ithaca, NY: Cornell University, 1989. p. 66-74.

CAMPANILE, G.; DE FILIPPO, C.; DI PALO, R.; TACCONE, W.; ZICARELLI, L. Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. **Livestock Production Science**, v. 55, p. 135-143, 1998.

CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; D'ANGELO, A. Haematological profile in buffalo. In: COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES, 3., 1998, Caserta, Italy. **Proceedings...** 1998. p. 236- 249.

CASSIANO, L. A. P.; MARIANTE, A. S.; MCMANUS, C.; MARQUES, J. R. F.; COSTA, N. A. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1337-1342, 2003.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Review: leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 3-22, 2005.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 21, p. 271-295, 2001.

COCKRILL, W. R. **The husbandry and health of the domestic buffalo**. Rome: FAO, 1974.993 p.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; ZALESKY, D. D.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. **Journal Animal Science**, v. 62, p. 1641-1648. 1986.

DIRKSEN, G.; BREITNER, W. New quick-test for semi quantitative determinations of beta-hydroxybutyric acid in bovine milk. **Journal Veterinary Medical Animal Physiology Pathology Clinical Medical**, v. 40, p. 779-784, 1993.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, v. 72, p. 68-78, 1989.

- EL-DEEB, W. M.; YOUNIS, E. E. Clinical and biochemical studies on *Theileria annulata* in Egyptian buffaloes (*Bubalus bubalis*) with particular orientation to oxidative stress and ketosis relationship. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 301–305, 2009.
- ELPHICK, M. C. Modified colorimetric ultramicro method for estimating NEFA in serum. **Journal of Clinical Pathology**, v. 21, n. 5, p. 567-570, 1968.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The estate of food and agricultura 2009. In: _____. **Livestock in the balance**. Rome:,FAO; Electronic Publishing Policy and Support Branch, Communication Division, 2009. pt. 1, p. 3-7.
- FECKINGHAUS, M. A. **Influência da aplicação da somatotropina recombinante bovina (rBST) no lipidograma e na constituição do leite de búfalos (*Bubalus bubalis*) em lactação**. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – FMVZ, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982.
- FRIGGENS, N. C. Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards a better understanding. **Livestock Production Science**, v. 83, p. 219-236, 2003.
- GHANEM, M. M.; EL-DEEB, W. M. Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) activity as a predictor for ketosis and parturient haemoglobinuria in Egyptian water buffaloes. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 20–25, 2010.
- GIBBONS, G. F. Assembly and secretion of hepatic verylow-density lipoprotein. **Biochem. J.** 268 , 1 – 13, 1990.
- GRASSO, F.; TERZANO, G. M.; ROSA, G. D.; TRIPALDI, C.; NAPOLITANO, F. Influence of housing conditions and calving distance on blood metabolites in water buffalo cows. **Italian Journal Animal Science**, v. 3, p. 275-282, 2004.
- GRUM, D. E.; DRACKLEY, J. K.; YOUNKER, R. S.; LACOUNT, D. W.; VEENHUIZEN, J. J. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1850-1864, 1996.
- GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2820-2833, 1995.
- HAGAWANE, S. D.; SHINDE, S. B.; RAJGURU, D. N. Haematological and Blood Biochemical Profile in Lactating Buffaloes in and around Parbhani city. **Veterinary World**, v. 2, n. 12, p. 467-469.
- HALDAR, A.; PRAKASH, B. S. Effect of exogenous growth-hormone-releasing factor on blood metabolites and minerals in late maturing buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, p. 326–332, 2007.

HAYIRLI, A. R.; GRUMMER, R.R.; NORDHEIM, E.V.; CRUMP, P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3430–3443. 2002.

HEITMANN, R. N.; DAWES, D. J.; SENSENIG, S. C. Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant. **Journal of Nutrition**, v. 177, p. 1174-1180, 1987.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 215-230, 2000.

HOUCQUETTE, J. F.; BAUCHART, D. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, n. 1, p. 27-48, 1999.

HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; HORSTMAN, L. A.; HENDRIX; K. S.; MOSS. G. E. Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. **Journal Animal Science**, v. 68, p. 1438-1446, 1990.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. ed. Rio de Janeiro.: IBGE. v. 37, 55 p, 2009.

IVERSON, S. J.; HAMOSH, M.; BOWEN, W. D. Lipoprotein lipase activity and its relationship to high milk fat transfer during lactation in grey seals. **J Comp Phys B.**, v. 165, p. 384-395, 1995.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

KANEKO. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KRONFELD, D. S.; RAGGI, F.; RAMBERG, C. F. Mammary flow and ketone metabolism in normal, fasted and ketotic cows. **American Journal of Physiology**, v. 215, p. 218, 1968.

LEE, A. J.; TWARDOCK, A. R.; BUBAR, R. H.; HALL, J. E.; DAVIS, C. L. Blood metabolic profile: their use and relation to nutritional status of dairy cows, **Journal Dairy Science**, v. 61, p. 1652-1670, 1978.

LIU, J. G.; PAN, C. L.; LIU, Y. W.; SUN, W. D.; ZHAO, H. J.; LIU, Y. J.; HE, C. H.; WANG, X. L. The intravenous glucose tolerance test in water buffalo. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 23–27, 2004.

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.

- LUCY, M. C.; JIANG, H.; KOBAYASHI, Y. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. E113-E119, 2001. Supplement.
- MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 1084-1088, 2001. Suplemento 1.
- MARAI, I. F. M.; HAEED, A. A. M. Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. **Livestock Science**, v. 127, p. 89-109, 2010.
- MARQUES, J. A.; ALBUQUERQUE, K. P.; PRADO, I. N.; NEGRÃO, J. A.; KUTSUNUGI, E.; SAKUNO, M. L. D. Metabólitos e hormônios plasmáticos de novilhas bubalinas confinadas em função do uso de promotor de crescimento ou esferas de chumbo no útero. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 225-232, 2004.
- MARUTA, C. A. **Perfil metabólico e ruminal de garrotes submetidos às condições de alimentação normal, jejum e realimentação**. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MONDAL, M.; PRAKASH, B. S. Changes in plasma non-esterified fatty acids, glucose and α -amino nitrogen and their relationship with body weight and plasma growth hormone in growing buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, p. 223-228, 2004.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washinton, D. C.: National Academic Press, 2001. 381 p.
- OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D.; PFEIFER, I. B.; CARDOSO, D. P. Parâmetros sanguíneos e urinários, no pré e pós-parto, de búfalas criadas em sistema exclusivo de pastejo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 87-92, 2003.
- PAUL, S. S.; LAL, D. **Nutrient requirements of buffaloes**. Azadpur, Delhi, India: Satish Serial Publishing House, 2010. 138 p.
- PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The metabolic profile**. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- POGLIANI, F. C. **Valores de referência e influência dos fatores etários, sexuais e da gestação do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo**. 2006. 134 f. Dissertação (mestrado clínica veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- PULLEN, D. L.; PALMQUIST, D. L.; EMERY, R. S. Effects on day of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 49-58, 1989.

QUIGLEY, J. D.; CALDWELL, L. A.; SINKS, G. D.; HEITMANN, R. N. Changes in Blood Glucose, Non-esterified Fatty Acids, and Ketones in Response to Weaning and Feed Intake in Young Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 250-257, 1991.

QUIGLEY, J. D.; SMITH, Z. P.; HEITMANN, R. N. Changes in Plasma Volatile Fatty Acids in Response to Weaning and Feed Intake in Young Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 258-263, 1991.

RENDINA, M.; VECCHIO, D.; CARVALHO, N. A. T.; ARIOTA, B.; GAZANE, M. P.; MARCHIELLO, M.; GASPARRINI, B. Metabolic profile in growing buffalo heifers fed diet with different energy content. **Italian Journal Animal Science**, v. 6, p. 544-546, 2007. Supplement 2.

SHAFFER, L.; ROUSSEL, J. D.; KOONCE, K. L. Effects of age, temperature-season, and breed on blood characteristics of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 1, p. 62-70, 1981.

TABATABAEI, S.; MAMOEI, M. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. **Comparative Clinical Pathology**, p. 43-51, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/e0m01478587070g5/fulltext.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

TAJIK, J.; NAZIFI, S. Correlation of serum lipids and lipoproteins with trace elements in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Research Forum**, v. 1, n. 2, p. 91-97, 2010.

THOMAS, C. S.; NORDSTROM, J.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; WIKTORSSON, H. Maintenance and milking behaviours of Murrah buffaloes during two feeding regimes. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 91, p. 261-276, 2005.

TRIPATHI, P. M.; INGOLE, S. D.; DESHMUKH, B. T.; NAGVEKAR, A. S.; BHARUCHA, S. V. Serum lipid profile during lactation in buffalo. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 80, n. 3, p. 217-219, 2010.

TURKAR, S.; UPPAL, S. K. Blood Biochemical and Ruminal Liquor Profile in Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Showing Omasal Impaction. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 967-975, 2007.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 63-73, 2005.

VAN SAUN, R. J. 2000: Blood profiles as indicator of nutritional status. In: ANNUAL WESTERN CANADIAN DAIRY SEMINAR, 18., 2000, Canada. **Proceedings...** Red Deer, Alta, Canada. 2000.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. New York: Cornell University Press, 1994.

- VAZQUEZ-ANON, M.; BERTICS, S. J.; LUCK, M.; GRUMMER, R. R. Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1521-1528, 1994.
- VERDURICO, L. C. **Avaliação de búfalas da raça Mediterrâneo durante o período de transição e início de lactação e de bezerros lactentes até o desmame**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- VERNON, R. G.; TAYLOR, E. Insulin, dexamethasone and their interactions in the control of glucose metabolism in adipose tissue from lactating and nonlactating sheep. **Biochemical Journal**, v. 256, p. 509-519, 1988.
- WIEGLEB, G.; KRAWCZYNSKI, R. Biodiversity Management by Water Buffalos in Restored Wetlands. **Waldökologie, Landschaftsforschung und Naturschutz**, v. 10, p. 17-22, 2010.
- WILLIAMSON, D. H.; MELLANBY, J.; KREBS, H. A. Enzymatic determination of D(-) β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. **Biochemical Journal**, v. 82, p. 90, 1962.
- YOUSSEF, M. A.; EL-KHODERY, S. A.; EL-DEEB W. M.; EL-AMAIEM, W. E. E. A. Ketosis in buffalo (*Bubalus bubalis*): clinical findings and the associated oxidative stress level. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 1771–1777, 2010.
- ZICARELLI, L. Alimentação da búfala leiteira. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 2., 2001, Pirassununga. **Anais...** 2001.