

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação de Mestrado

Butafosfan: Diferentes formas farmacêuticas para uso em animais de produção

Thaís Casarin da Silva

Pelotas, 2018

Thaís Casarin da Silva

Butafosfan: Diferentes formas farmacêuticas para uso em animais de produção

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Francisco Augusto Burkert Del Pino

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586b Silva, Thaís Casarin da

Butafosfan: diferentes formas farmacêuticas para uso em animais de produção / Thaís Casarin da Silva ; Francisco Augusto Burkert Del Pino, orientador. — Pelotas, 2018.

39 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Fósforo orgânico. 2. Produção de leite. 3. Balanço energético negativo. I. Pino, Francisco Augusto Burkert Del, orient. II. Título.

CDD : 636.084

Thaís Casarin da Silva

**Avaliações metabólicas e zootécnicas de vacas leiteiras suplementadas com
Butafosfan de liberação sustentada**

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 21 de fevereiro de 2018

Banca Examinadora:

Dr. M.V. Marcio Nunes Corrêa. Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Farmacêutica. Josiane de Oliveira Feijó. Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. M.V. Cássio Cassal Brauner. Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Farmacêutico. Rubens Alves Pereira. Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

**Dedico este trabalho a Deus e a minha
família.**

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me conceder esta oportunidade, de trabalhar com o que amo e por ter concedido amparo quando precisei e força todos os dias para concretizar este desejo profissional.

Aos meus pais, Almiro e Cléia, que sempre me incentivaram a estudar e me esforçar desde pequena para realizar os meus sonhos. Sem medir esforços para me ajudar a chegar até aqui, sem eles, com certeza isso não teria sido possível. Obrigada por todo amor, paciência e apoio incondicional. Vocês são a minha base, meu porto seguro, devo tudo a vocês.

Ao meu irmão Gustavo, que me faz rir constantemente, que faz os meus dias mais leves e com seu amor, me incentiva a ir mais longe.

Ao meu noivo Bruno, que esteve ao meu lado, me ajudando em todos os momentos, sem hesitar. Por me fornecer palavras de segurança e apoio quando eu mais precisei, por vibrar junto comigo a cada conquista, muito obrigada!

Aos meus Sogros, Breno e Marilu e cunhadas Brenda e Maria Eduarda, que sempre se fizeram presente, preocupados com meus estudos e apoiando as minhas decisões.

Aos meus dindos Mariza, Jone e Marcelo que participaram de cada etapa da construção deste trabalho, torcendo por mim e me incentivando a seguir em frente sempre.

A minha amiga Mariana Gallo, que desde a graduação, me presenteia com sua amizade, que é tão importante para mim, uma benção de Deus. Obrigada por se fazer sempre presente, mesmo que por mensagem em todas as fases deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Francisco Augusto Burkert Del Pino e aos professores Marcio Nunes Corrêa e Rubens Alves Pereira por toda orientação, compreensão e ajuda ao longo de 4 anos de convivência, trabalho e amizade.

As minhas amigas Josiane, Claudia, Camila e Jéssica e amigos Joao e Mozer pela parceria de todos os dias, por todos os almoços descontraídos, risadas, memes e também pelas orientações, ajudas e palavras de incentivo e apoio. A amizade de vocês fez toda a diferença.

A minha orientada Milena Bugoni, que do início ao fim se fez presente, sempre preocupada em me auxiliar no que fosse preciso, muito obrigada por toda torcida e amizade.

A todos os amigos da Granja 4 Irmãos, principalmente ao Eduardo Xavier, Alexandre, Angela, Thyago, Fabricio, Kelly, Suelen, Belinha, Vagner, Zé e as meninas da ordenha, que não mediram esforços para me ajudar em uma das etapas mais difíceis desse trabalho. Sem a ajuda de vocês, eu não teria conseguido superar cada obstáculo.

A toda minha família e amigos que participaram da construção deste trabalho, acreditando, apoiando e torcendo por mim.

A todos os colegas do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) que contribuíram de alguma forma, para a minha formação profissional e pessoal.

Muito obrigada!

Resumo

DA SILVA, Thaís Casarin. **Butafosfan: Diferentes formas farmacêuticas para uso em animais de produção**. 2018. 39f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O pós-parto recente de vacas leiteiras é um período caracterizado pela diminuição da ingestão de matéria seca e consequentemente, balanço energético negativo mais intenso. Com intuito de amenizar esse balanço, diversas estratégias veem sendo utilizadas, como as suplementações energéticas a base de fósforo orgânico, como o Butafosfan. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes formas farmacêuticas de Butafosfan sobre os parâmetros metabólicos e zootécnicos no pós-parto de vacas leiteiras. Foram utilizadas 37 vacas da raça Holandês, multíparas, provenientes de uma fazenda do sul do Rio Grande do Sul. Os animais foram divididos aleatoriamente, de acordo com a previsão de parto, em três grupos, para receber três doses subcutâneas, na região cervical, de determinada forma farmacêutica. Grupo BUT (n=12) recebeu 90mL de solução de Butafosfan (13,5g); BUTSR (n=12) recebeu 90mL de formulação de liberação sustentada de Butafosfan (13,5g) e Grupo CL (Controle; n=12) recebeu 90mL de água para injetáveis. As aplicações ocorreram no dia do parto (dia 0; em até 12 horas pós-parto) e nos dias 3 e 7 após o parto. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 após o parto, por punção da veia coccígea, para realização das análises de fósforo, cálcio, magnésio, glicose, proteínas totais, albumina, ureia, globulinas, paraoxanase-1, beta-hidroxibutirato, aspartato aminotransferase e gama glutamiltransferase. No dia 0 e 10 pós-parto foram mensurados o escore de condição corporal e peso, além da produção de leite registrada diariamente (do dia 11 aos 60 dias pós-parto). A produção de leite foi maior nos grupos BUTSR e BUT, quando comparados ao grupo CL, porém, quando contrastados entre si, o grupo BUTSR apresentou maior produção que o grupo BUT. Os tratamentos BUTSR e BUT aumentaram os níveis de cálcio e diminuíram a concentração de glicose, em relação ao grupo CL. Os animais do grupo BUTSR apresentaram os níveis de albumina e ureia aumentados em relação aos animais do grupo CL, o qual não diferiu do tratamento BUT. Através deste estudo, notou-se que o Butafosfan independente da forma farmacêutica, pode aumentar os níveis de cálcio dos animais, assim como aumentar a produção de leite e diminuir os níveis de glicose sanguínea, presumivelmente por aumentar sua utilização em comparação aos animais do grupo controle. Porém, os animais tratados com a nova plataforma de liberação sustentada, apresentaram maior produção de leite que os demais grupos, provavelmente por permitir uma suplementação de forma mais lenta e prolongada. Contudo, estudos utilizando maior número de animais e com diferentes doses e dias de aplicação são necessários para desenvolver o protocolo com menor número possível de aplicação e resultados satisfatórios.

Palavras-chave: fósforo orgânico; produção de leite; balanço energético negativo.

Abstract

DA SILVA, Thaís Casarin. **Butafosfan: Diferentes formas farmacêuticas para uso em animais de produção**. 2018. 39f. Dissertation (Master of Science) -Postgraduate Program in Animal Science, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

The recent postpartum of dairy cows is a period characterized by a decrease in dry matter intake and, consequently, a more intense negative energy balance. In order to mitigate this balance, several strategies are being used, such as organic phosphorus-based energy supplements, such as Butafosfan. The objective of this study was to evaluate different pharmaceutical forms of Butafosfan on metabolic and zootechnical parameters in postpartum dairy cows. A total of 37 Holstein cows, multiparous, from a farm in the south of Rio Grande do Sul. The animals were randomly divided into three groups to receive three subcutaneous doses in the cervical region, according to the prediction of delivery, certain pharmaceutical form. Group BUT (n = 12) received 90mL Butafosfan solution (13.5g); BUTSR (n = 12) received 90mL of sustained release formulation of Butafosfan (13.5g) and Group CL (Control; n = 12) received 90mL of water for injectables. The applications occurred on the day of parturition (day 0, within 12 hours postpartum) and on days 3 and 7 postpartum. Blood samples were collected on days 0, 3, 7 and 10 postpartum, by puncture of the coccygeal vein, for the analysis of phosphorus, calcium, magnesium, glucose, total proteins, albumin, urea, globulins, paraoxanase-1, beta-hydroxybutyrate, aspartate aminotransferase and gamma glutamyltransferase. On day 0 and 10 postpartum the body condition score and weight were measured, in addition to daily milk production (from day 11 to 60 days postpartum). Milk production was higher in the BUTSR and BUT groups, when compared to the CL group, but when compared to each other, the BUTSR group presented higher production than the BUT group. The BUTSR and BUT treatments increased calcium levels and decreased glucose concentration, compared to the CL group. The animals in the BUTSR group had increased albumin and urea levels compared to the CL group, which did not differ from the BUT treatment. Through this study, it was noted that Butafosfan, independent of the pharmaceutical form, may increase the calcium levels of the animals, as well as increase milk production and lower blood glucose levels, presumably by increasing its use compared to the animals in the group control. However, the animals treated with the new platform of sustained release presented higher milk production than the other groups, probably because it allows a slower and prolonged supplementation. However, studies using a larger number of animals and with different doses and days of application are necessary to develop the protocol with the lowest possible number of applications and satisfactory results.

Keywords: organic phosphorus; milk production; negative energy balance.

Lista de Figuras

- Figura 1** Produção de leite (L) de vacas da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan com diferentes formulações nos dias 0 (parto), 3 e 7 pós-parto, por via subcutânea. 23
- Figura 2** Concentrações sanguíneas de a) cálcio (mg/dL), b) albumina (g/dL), c) ureia (mg/dL) e d) glicose (mg/dL) em vacas leiteiras da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan com diferentes formulações nos dias 0 (parto), 3 e 7 pós-parto, por via subcutânea. 24

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Frequência de doenças, nos primeiros quinze dias pós-parto, de vacas da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan com diferentes formulações nos dias 0 (parto) 3 e 7 pós-parto, por via subcutânea. 25
- Tabela 2** Médias e erro médio padrão (EMP) dos parâmetros bioquímicos de vacas leiteiras da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan através de plataforma de liberação sustentada ou solução, por via subcutânea, no pós-parto recente. 26
- Tabela 3** Médias e erro médio padrão (EMP) dos parâmetros zootécnicos de vacas leiteiras da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan através de plataforma de liberação sustentada ou solução, por via subcutânea, no pós-parto recente. 27

Sumário

1 Introdução Geral.....	11
1.1 Objetivo	13
1.2 Objetivos Específicos	15
2. Artigo	16
4. Considerações Finais	35
Referências	36
Anexo	38

1 Introdução Geral

O periparto da vaca leiteira é um período caracterizado por importantes mudanças metabólicas e nutricionais, essas podem ser caracterizadas pela diminuição da ingestão de matéria seca (IMS) e pela alta demanda de energia para o desenvolvimento fetal no terço final da gestação e após o parto, com a produção de colostro e leite (Chapinal et al., 2011).

Além da demanda energética, os requerimentos de macrominerais, como fósforo e cálcio são aumentados neste período. Em até 190 dias de gestação, as concentrações ideais de acréscimo de fósforo na dieta estão em torno de 1,9g/dia e no terço final, passam a ser em média 5,4g/dia, por ser o período que o esqueleto fetal começa a ser calcificado. Já no início da lactação a demanda de fósforo é de 0,7 a 1,3g/L de leite produzido (Council, 2001).

Estas altas exigências de fósforo após o parto, corroboram com elevada incidência de hipofosfatemia em vacas leiteiras, podendo afetar a produção de adenosina trifosfato (ATP), contração muscular, hemólise intravascular, dificuldade na liberação de oxigênio para os tecidos periféricos e assim, prejudicar o funcionamento ruminal e predispor a outras doenças, como síndrome da vaca caída e hemoglobinúria pós-parto (Eisenberg et al., 2014; Grunberg et al., 2015).

Neste sentido, na tentativa de amenizar a carência de energia causada pela diminuição de IMS, o organismo começa a utilizar seus mecanismos de reserva, através da mobilização de tecido adiposo e desmineralização óssea (Rollin et al., 2010; Elizondo Salazar et al., 2013).

A mobilização de tecido adiposo é utilizada para satisfazer as necessidades energéticas do animal, através da oxidação completa dos ácidos graxos, fornecendo substrato para o ciclo de Krebs, principalmente através do Acetil-coa. Porém, quando essa mobilização é intensa, ela se torna prejudicial ao organismo pela incompleta oxidação de parte dos ácidos graxos, resultando na formação demasiada de corpos cetônicos (CC), representados pelo β -hidroxibutirato (BHB), acetoacetato e acetona (Kreipe et al., 2011; Pereira, R. A. et al., 2013).

Já a desmineralização óssea é regulada pelos hormônios paratormônio, calcitonina e vitamina D3, que regulam a ação dos osteoclastos, a fim de elevar as concentrações fósforo e cálcio nos fluidos extracelulares (Elizondo Salazar et al., 2013). A partir destas mudanças metabólicas, ocorre um desbalanço fisiológico, resultando em enfermidades como a hipofosfatemia e a hipocalcemia (Dukes e Reece, 2006; Ingvarsen, 2006).

Sabendo disto, é constante na pecuária leiteira, a busca por estratégias eficazes em atenuar a diminuição da IMS, o déficit energético e o estresse eminente no período de transição de vacas leiteiras. As taxas de gliconeogênese e glicólise são reguladas pela disponibilidade de fósforo, pois todos os intermediários na gliconeogênese precisam ser fosforilados. Além disso, esse mineral é importante no metabolismo de energia celular, substrato para o ciclo de adenosina difosfato (ADP) e ATP, na síntese do fosfato de creatina e nucleotídeos (Pereira, R. A. et al., 2013).

Com isso, suplementações energéticas a base de fósforo, como o Butafosfan, uma fonte de fósforo orgânico derivado do ácido fosfórico, vêm sendo utilizadas não só como fonte de fósforo, mas também como tratamento de desordens metabólicas causadas por estresse ou problemas nutricionais em varias espécies (Van Der Staay et al., 2007), tendo papel vital no metabolismo hepático de carboidratos, estabilização do balanço energético e homeostase mineral (Van Der Staay et al., 2007; Kreipe et al., 2011), através da melhora da ingestão de alimento, sistema imune e digestibilidade (Chapinal et al., 2011).

Entretanto, a administração de Butafosfan requer sucessivas aplicações ao longo de vários dias, tornando o manejo difícil, principalmente quando há um grande número de animais. Os protocolos de administração de um composto que possui Butafosfan em sua fórmula (Catosal®B12 - Bayer Animal Health), muito utilizado na pecuária leiteira, comprova essa afirmação, como os utilizados por Pereira, R. A. et al. (2013), que administrou este composto em 52 vacas leiteiras da raça Holandês, a cada 5 dias, até 20 dias em lactação e em 18 ovelhas prenhas as quais receberam aplicação a cada 2 dias após o parto, totalizando 3 doses (Pereira et al., 2013). Já Kreipe et al. (2011), administrou 3 dias seguidos após ordenha e Tabeleão et al. (2017), aplicou nos dias 7, 12, 17, 22 e 27 pós-parto de vacas leiteiras.

Diante disso, métodos alternativos de aplicação são necessários, principalmente através de formulações farmacêuticas capazes de manter a liberação sustentada de substâncias por mais tempo. Dentre os diversos sistemas de liberação de fármacos (Uhrich et al., 1999) existem os hidrogéis, constituídos por polímeros solúveis em água, que formam redes tridimensionais reticuladas (Hoare e Kohane, 2008) com capacidade de termogeleificar, dependendo da temperatura que são dispostos, sendo que quanto maior a temperatura, maior será a viscosidade e resistência da formulação, passando da forma líquida, para o estado de gel (Determan et al., 2007) possibilitando a liberação do princípio ativo de forma lenta e contínua (Uhrich et al., 1999).

A administração de Butafosfan, através de uma formulação de liberação sustentada (denominado Butafosfan SR) biodegradável, permitirá que a vaca leiteira tenha o mesmo suporte energético dos múltiplos protocolos de Butafosfan utilizados atualmente, devido à liberação sustentada de Butafosfan, reduzindo a intensidade do balanço energético negativo no pós-parto e aumentando a produção de leite.

1.1 Objetivo

Avaliar o efeito de diferentes formas farmacêuticas de Butafosfan sobre os parâmetros metabólicos e zootécnicos no pós-parto de vacas leiteiras;

1.2 Objetivos Específicos

a) Analisar os parâmetros zootécnicos (produção de leite, peso e escore de condição corporal), frente a aplicações de diferentes formas farmacêuticas de Butafosfan, no pós-parto recente de vacas leiteiras;

b) Avaliar os parâmetros bioquímicos (níveis sanguíneos de glicose, fósforo, magnésio, ureia, beta-hidroxibutirato, haptoglobina, albumina, proteínas plasmáticas totais, aspartato aminotransferase, gama-glutamil transferase e cálcio) frente a aplicações de diferentes formas farmacêuticas de Butafosfan, no pós-parto recente de vacas leiteira.

2. Artigo

2.1 Artigo 1 - Butafosfan: Diferentes formas farmacêuticas para uso em animais de produção.

O artigo será submetido na revista *Animal*

T.C. Da Silva¹, A. Bilhalva¹, R. A. Pereira¹, J. de O. Feijó¹, M.N. Corrêa¹, F.A.B. Del Pino^{1,2}.

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pelotas, CEP: 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

Endereço Autor: Thaís Casarin da Silva. E-mail: thais_casarin@hotmail.com

Resumo

Butafosfan: Diferentes formas farmacêuticas para uso em animais de produção

O objetivo deste estudo foi avaliar se diferentes formas farmacêuticas contendo Butafosfan possui efeito positivo sobre os parâmetros metabólicos e zootécnicos de vacas leiteiras no pós-parto recente. Foram utilizadas trinta e sete vacas da raça Holandês, multíparas, sendo divididas aleatoriamente, de acordo com a previsão de parto, em três grupos, para receber três doses subcutâneas de 30mL, na região cervical, de determinada forma farmacêutica. Grupo BUT (n=12) recebeu solução de Butafosfan (4,5g por aplicação); BUTSR (n=12) recebeu formulação de liberação sustentada de Butafosfan (4,5g por aplicação) e Grupo CL (Controle; n=12) recebeu água para injetáveis. As aplicações ocorreram no dia do parto (dia 0; em até 12 horas pós-parto) e nos dias 3 e 7 após o parto. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 após o parto, por punção da veia coccígea, para realização das análises de fósforo, cálcio, magnésio, glicose, proteínas totais, albumina, ureia, globulinas, paraoxanase-1, beta-hidroxibutirato, aspartato aminotransferase e gama glutamiltransferase. O escore de condição corporal (ECC) e o peso foram avaliados nos dias 0 e 10 e a produção de leite do dia 11 aos 60 dias pós-parto. Observa-se que independente da forma farmacêutica, os grupos tratados com Butafosfan tiveram maior produção de leite, maiores níveis de cálcio, menores níveis de glicose em comparação aos animais controle. Destacando que quando os animais tratados são contrastados entre si, observa-se que o BUTSR apresentou maior produção de leite que o grupo BUT. Além disso, os níveis de ureia e albumina tenderam a ser maiores no grupo BUTSR do que o grupo CL, sem diferir do grupo BUT. Essa plataforma poderá ser um grande avanço a Medicina Veterinária e

Zootecnia por permitir resultados satisfatórios em relação à produção de leite. Contudo, estudos utilizando maior número de animais e com diferentes doses e dias de aplicação são necessários para desenvolver o protocolo com menor número possível de aplicação, mantendo os resultados satisfatórios.

Palavras-chave: fósforo orgânico; produção de leite; balanço energético negativo; perfil bioquímico; vaca Holandês.

Abstract

Butafosfan: Different dosage forms for use in production animals

The objective of this study was to evaluate whether different pharmaceutical forms containing Butafosfan have a positive effect on the metabolic and zootechnical parameters of dairy cows in the recent postpartum period, multiparous, being randomly divided into three groups to receive three subcutaneous doses of 30mL in the cervical region of a certain pharmaceutical form. Group BUT (n = 12) received Butafosfan solution (4.5g per application); BUTSR (n = 12) received sustained release formulation of Butafosfan (4.5g per application) and CL Group (Control; n = 12) received water for injections. The applications occurred on the day of parturition (day 0, within 12 hours postpartum) and on days 3 and 7 postpartum. Blood samples were collected on days 0, 3, 7 and 10 postpartum, by puncture of the coccygeal vein, for the analysis of phosphorus, calcium, magnesium, glucose, total proteins, albumin, urea, globulins, paraoxanase-1, beta-hydroxybutyrate, aspartate aminotransferase and gamma glutamyltransferase. The body condition score (ECC) and weight were evaluated on days 0 and 10 and milk production from day 11 to 60 days postpartum. It is observed that, indifferent to the pharmaceutical form, the groups treated with

Butafosfan had higher milk yield, higher calcium levels, lower glucose levels compared to control animals. Noting that when treated animals are contrasted with each other, it is observed that the BUTSR presented higher milk production than the BUT group. In addition, urea and albumin levels tended to be higher in the BUTSR group than the CL group, without differing from the BUT group. This platform could be a great advance in Veterinary Medicine and Animal Husbandry for allowing satisfactory results in relation to milk production. However, studies using a larger number of animals and with different doses and days of application are necessary to develop the protocol with as few applications as possible, maintaining the satisfactory results.

Keywords: organic phosphorus; milk production; negative energy balance; biochemical profile; cow Holandês.

Implicações

Este estudo propôs avaliar o efeito de duas formas farmacêuticas contendo Butafosfan, frente a parâmetros metabólicos e zootécnicos de vacas leiteiras no pós-parto recente. O protocolo consistiu de três aplicações de 30mL de solução ou formulação de liberação sustentada de Butafosfan, por via subcutânea (4,5g por aplicação) nos dias 0 (parto), 3 e 7 pós-parto. Os resultados deste experimento indicam que Butafosfan pode interferir nas concentrações plasmáticas de cálcio, glicose, ureia e ALB e ainda aumentar a produção de leite. Destacando que os animais que receberam a formulação de liberação sustentada de Butafosfan tiveram maior produção de leite que os demais grupos.

Introdução

No pós-parto recente, as vacas leiteiras necessitam de grandes concentrações de nutrientes, para produção de colostro, leite e sua própria manutenção. Porém, esta demanda geralmente não é suprida pela ingestão de matéria seca (IMS), resultando em balanço energético negativo (BEN) (Chapinal *et al.*, 2011). Na tentativa de sanar esse alto requerimento nutricional, ocorre à ativação das vias de reserva, para aumentar a disponibilidade de energia ao organismo, através da desmineralização óssea e mobilização do tecido adiposo (Rollin *et al.*, 2010, Elizondo Salazar *et al.*, 2013).

Quando essa mobilização é intensa, ela se torna prejudicial ao organismo pelo acúmulo de triglicerídeos (TAG) nos hepatócitos e também pela elevada síntese de corpos cetônicos (CC) a partir da oxidação incompleta de parte dos ácidos graxos, podendo causar lipidose hepática e/ou cetose (Kreipe *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013b). Além disso, a desmineralização óssea que é regulada pelos hormônios paratormônio e vitamina D3, pode não ser suficiente para aumentar as concentrações especialmente de fósforo e cálcio nos fluidos extracelulares (Elizondo Salazar *et al.*, 2013), resultando em hipocalcemia e/ou hipofosfatemia (DUKES and REECE, 2006, Ingvarsen, 2006).

Com intuito de atenuar o BEN e possivelmente, prevenir estes transtornos metabólicos, diversas estratégias são utilizadas, como a suplementações energéticas a base de fósforo, administradas tanto via oral, como injetáveis, empregadas para melhorar o metabolismo energético. O Butafosfan (ácido 1-(n-butilamino)-1-metiletil-fosfônico), é um tipo de fósforo orgânico conhecido por ter alta biodisponibilidade desse mineral (Rollin *et al.*, 2010). O fósforo é de extrema importância, por ser constituinte de membranas plasmáticas, ácidos nucleicos, moléculas energéticas como adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP),

102 auxiliar na estabilização do BEN e na homeostasia mineral (Van Der Staay *et al.*,
103 2007).

104 Geralmente, são realizadas sucessivas aplicações devido à meia vida
105 plasmática relativamente curta do Butafosfan (Sun *et al.*, 2017), tornando o protocolo
106 inviável quando se trabalha com grande número de animais. Neste sentido,
107 estudam-se novas estratégias de utilização deste fármaco, como os sistemas de
108 liberação sustentada, que são definidos pela capacidade de liberação de um
109 fármaco numa velocidade e período pré-determinados. Estes sistemas podem ser
110 formados por hidrogéis, estruturas poliméricas tridimensionais, capazes de promover
111 ligações cruzadas (Villanova *et al.*, 2010).

112 A administração de Butafosfan, através de uma formulação de liberação
113 sustentada (denominado Butafosfan SR) biodegradável, permitirá que a vaca leiteira
114 tenha suporte energético semelhante, ou melhor, aos múltiplos protocolos de
115 Butafosfan utilizados atualmente, visando reduzir a intensidade do BEN e aumentar
116 a produção de leite. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de
117 uma nova formulação polimérica de liberação sustentada de Butafosfan sobre os
118 parâmetros metabólicos e zootécnicos no pós-parto recente de vacas leiteiras.

119 **Material e Métodos**

120 **Formulações de liberação sustentada de Butafosfan**

121 As formulações poliméricas de liberação sustentada do Butafosfan foram
122 preparadas previamente, fazendo uso de fórmulas previamente desenvolvidas e
123 validadas através de ensaios *in vitro*. Para preservar os direitos de propriedade
124 intelectual dos inventores da fórmula, a mesma não poderá ser descrita neste artigo
125 uma vez que está sendo encaminhado o processo de patente.

Estudo *in vivo*

Animais e Manejo

Este estudo foi realizado em uma fazenda leiteira do sul do Rio Grande do Sul (32,8°16'S, 52,8°32'L), Brasil. Foram utilizadas trinta e sete vacas da raça Holandês, multíparas, mantidas sobre a mesma condição de manejo e alimentação.

Trinta dias pré-parto e durante os dez primeiros dias pós-parto, os animais ficavam em sistema semi-extensivo, permanecendo em piquete com campo nativo recebendo suplementação *Total Mix Ration* (TMR) duas vezes ao dia, após a ordenha e água à vontade. Com aproximadamente dez dias pós-parto, os animais passavam para o sistema de confinamento *Compost Barn*, onde recebiam TMR fornecida três vezes ao dia, água à vontade e eram ordenhadas duas vezes ao dia, a cada 12 horas.

Os animais foram divididos aleatoriamente, de acordo com a previsão de parto, em três grupos, para receber três doses de 30mL (cada), por via subcutânea, na região cervical, de determinada forma farmacêutica. Grupo BUT (n=12) recebeu 90mL de solução de Butafosfan (4,5g por aplicação); BUTSR (n=12) recebeu 90mL de formulação de liberação sustentada de Butafosfan (4,5g por aplicação) e Grupo CL (Controle; n=12) recebeu 90mL de água para injetáveis (por questões de propriedade intelectual, a composição da formulação não será detalhada neste documento).

As aplicações ocorreram no dia do parto (dia 0; em até 12 horas pós-parto) e nos dias 3 e 7 após o parto (pós ordenha da manhã). Além disso, foram contabilizados nos primeiros quinze dias pós-parto, a frequência de animais

149 diagnosticados com alguma doença (metrite, retenção de placenta, hipocalcemia,
150 tristeza e/ou edema de úbere).

151 **Coletas e análises sanguíneas**

152 As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 3, 7 e 10 após o parto, por
153 punção da veia coccígea, utilizando sistema Vacutainer (BD diagnostics, SP, Brasil),
154 totalizando 4 coletas por animal. As amostras de sangue foram coletadas em dois
155 tubos: um com fluoreto de sódio (4mL Vacuplast[®] - Zhejiang, China) para obtenção
156 de plasma para avaliar os níveis de glicose; e outro com sílica (ativador de coágulo)
157 (10mL Vacuplast[®] - Shandong, China) para obtenção do soro e realização das
158 análises bioquímicas.

159 Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 1800 x *g*, durante 15
160 minutos. O plasma e soro foram transferidos para tubos de eppendorf, identificados
161 e armazenados a -20°C até a realização das análises.

162 As análises de ureia, ALB, proteínas totais, GGT, AST, cálcio, magnésio e
163 fósforo e glicose foram realizadas através dos reagentes da Labtest (Labtest®, Lagoa
164 Santa, MG, Brasil). Já para o BHB foi utilizado o Kit comercial RANDOX Brasil Ltda
165 (SP, Brasil). Todas as análises foram realizadas com auxílio de um analisador
166 bioquímico automático Labmax Plenno (Labtest[®], MG, Brasil).

167 A concentração de globulinas foi determinada subtraindo-se o resultado
168 obtido para ALB daquele das proteínas plásticas totais. Para avaliar a atividade da
169 paraoxanase1, foi utilizado o protocolo descrito por Browne *et al.*, (2007).

Avaliações Zootécnicas

Peso e o ECC foram avaliados nos dias 0 e 10 após o parto. A pesagem foi realizada com fita de medição específica para gado leiteiro e o ECC foi avaliado subjetivamente através de uma escala de 1 a 5, onde 1 = muito magro e 5 = muito gordo (Hady *et al.*, 1994). A produção de leite foi registrada no momento da ordenha, diariamente a partir de 11 dias pós-parto (DPP), até 60 DDP. A quantidade referente às duas ordenhas foi somada e a análise estatística foi feita sobre a produção diária total (IDEAGRI[®], Windows, DeLaval, MG, Brasil).

Análise estatística

Todos os dados foram analisados no programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, EUA, 2016). Para tal, foi utilizada análise de variância com MIXED MODEL para comparação dos grupos coletas e sua interação (grupo x coleta) através do teste de Tukey HSD ($P < 0,05$). Para a avaliação de frequência de doenças entre os grupos, foi utilizado o teste exato de Fisher. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

Resultados

Nenhum animal apresentou quadros de cetose subclínica, permanecendo com os níveis de BHB abaixo de 1,2 mmol/L (Tabela 2) (Song *et al.*, 2016).

Observa-se (Figura 1; Tabela 3) que a produção de leite foi maior ($P < 0,01$) nas vacas suplementadas com Butafosfan do que com o grupo CL. Quando comparados os grupos tratados, pode-se observar que o BUTSR foi maior ($P < 0,01$), do que o grupo BUT. Em média, o grupo BUTSR aumentou 3,33L/dia de leite em

193 relação aos animais do grupo CL e 1,81L/dia em comparação ao grupo BUT até 60
 194 DPP.

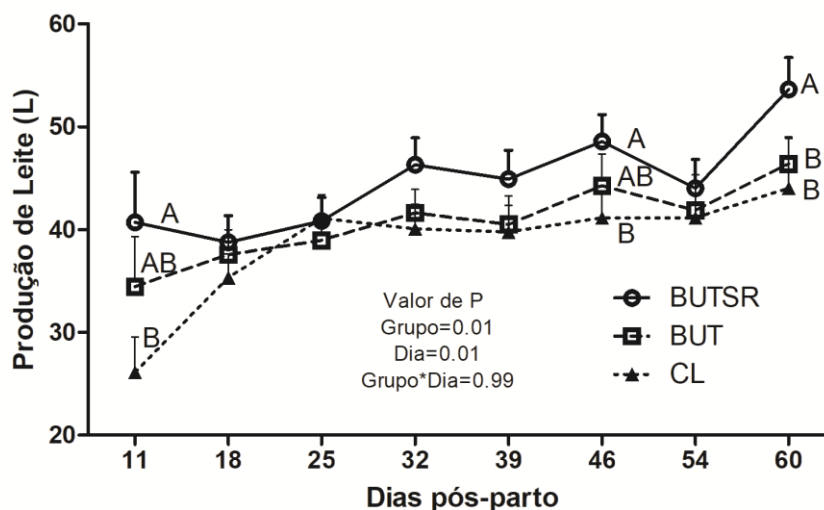


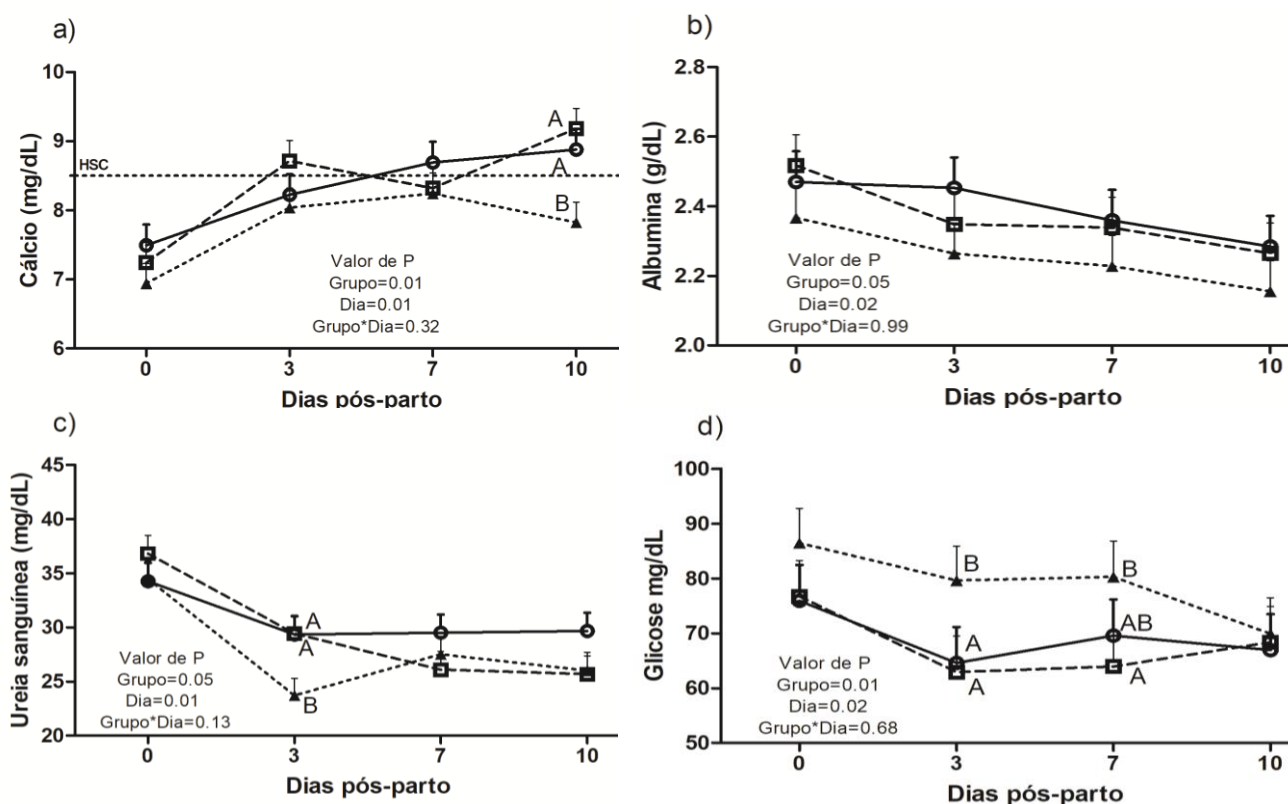
Figura 1. Produção de leite (L) do dia 11 aos 60 dias pós-parto de vacas da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan com diferentes formulações nos dias 0 (parto) 3 e 7 pós-parto, por via subcutânea.

BUTSR (n=12): animais que receberam 30mL de Butafosfan SR (4,5g) através da plataforma de liberação sustentada; BUT (n=12): animais que receberam 30mL de solução de Butafosfan (4,5g); CL (n=12): animais que receberam 30mL de água para injetáveis.^{AB} Médias seguidas de letras maiúsculas ($P < 0,01$) e minúsculas ($P < 0,05$) diferentes no mesmo parâmetro diferem entre grupos no mesmo dia (grupo*Dia) pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

Houve aumento ($P \leq 0,01$; Figura 2a) nas concentrações de cálcio nos grupos BUTSR e BUT, uma interação ($P \leq 0,01$) grupo*dia no dia 10 e nesses grupos observa-se que as concentrações de glicose foram menores ($P \leq 0,01$; Figura 2d) em relação ao grupo CL. Os animais do grupo BUTSR tenderam a apresentar níveis de ALB e ureia maiores ($P = 0,05$; Figura 2b e c, respectivamente) em relação aos animais do grupo CL, não diferindo do tratamento BUT ($P > 0,05$; Figura 2).

213

○ BUTSR ■ BUT ▲ CL



214

Figura 2. Concentrações sanguíneas de a) cálcio (mg/dL), b) albumina (g/dL), c) ureia (mg/dL) e d) glicose (mg/dL) em vacas leiteiras da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan através de diferentes formulações nos dias 0 (parto), 3 e 7 pós-parto, por via subcutânea.

BUTSR (n=12): animais que receberam 30mL de Butafosfan SR (4,5g) através da plataforma de liberação sustentada; BUT (n=12): animais que receberam 30mL de solução de Butafosfan (4,5g); CL (n=12): animais que receberam 30mL de água para injetáveis. HSC: hipocalcemia subclínica. Médias seguidas de letras maiúsculas ("A, B"; $P < 0,01$) e letras minúsculas ("a, b"; $P < 0,05$) diferentes no mesmo parâmetro diferem entre grupos nos mesmos dias (grupo*Dia) pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

225

As concentrações séricas dos demais metabólitos bioquímicos não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$, Tabela 2). Os animais apresentaram ECC maior ($P = 0,01$; Tabela 3), no dia do parto, do que no dia 10 pós-parto, porém, na média geral não houve diferença entre grupo. O peso não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$; Tabela 3).

229

Quanto à frequência de doenças nos primeiros 15 dias pós-parto, não houve diferenças entre os grupos ($P=0,49$), porém, em porcentagem, dos 36 animais avaliados, 22,22% dos animais do grupo BUTSR, 33,33% do grupo BUT e 44,44% do grupo CL apresentaram algum tipo de doença (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de doenças, nos primeiros quinze dias pós-parto, de vacas da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan com diferentes formulações nos dias 0 (parto) 3 e 7 pós-parto, por via subcutânea.

Doença	Tratamentos ¹			Total
	BUT	BUTSR	CL	
Presença	6 33.33	7 38.89	5 27.78	18
Ausência	6 33.33	4 22.22	8 44.44	18
Total	12	11	13	36
Valor de P = 0,49				

¹Os tratamentos consistiram de três aplicações subcutâneas no dia do parto (dia 0), 3 e 7 pós-parto. BUTSR (n=12): animais que receberam 30mL de Butafosfan SR (4,5g) através da plataforma de liberação sustentada; BUT (n=12): animais que receberam 30mL de solução de Butafosfan (4,5g); CL (n=12): animais que receberam 30mL de água para injetáveis. Foram considerados significativos os valores de $P<0,05$;

Tabela 2. Médias e $\pm$ (erro médio padrão) dos parâmetros bioquímicos de vacas leiteiras da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan através de plataforma de liberação sustentada ou solução, por via subcutânea, no pós-parto recente.

Parâmetros ¹	Tratamentos ²			Valor de P		
	BUTSR	BUT	CL	Grupo	Coleta ³	Grupo*Coleta ⁴
Fósforo (mg/dL)	6,00 $\pm$ 0,20	5,89 $\pm$ 0,20	6,18 $\pm$ 0,19	0,56	0,08	0,74
Magnésio (mg/dL)	1,98 $\pm$ 0,07	2,10 $\pm$ 0,07	2,03 $\pm$ 0,06	0,49	0,05	0,96
Globulina (g/dL)	3,38 $\pm$ 0,19	3,95 $\pm$ 0,19	4,19 $\pm$ 0,18	0,16	0,26	0,80
Proteínas Totais (g/dL)	6,07 $\pm$ 0,18	6,32 $\pm$ 0,18	6,45 $\pm$ 0,17	0,32	0,54	0,79
BHB (mmol/L)	0,86 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,02	0,27	0,45	0,94
AST (U/L)	102,79 $\pm$ 5,66	101,85 $\pm$ 5,66	95,01 $\pm$ 5,55	0,56	0,01	0,62
GGT (U/L)	33,56 $\pm$ 2,20	31,97 $\pm$ 2,27	30,76 $\pm$ 2,214	0,66	0,41	0,92
PON1 (U/mL)	98,98 $\pm$ 4,08	94,43 $\pm$ 4,08	87,37 $\pm$ 4,08	0,12	0,43	0,93

BHB: β -hidroxibutirato

AST: aspartato aminotransferase

GGT: gama glutamil transferase]

PON1: paraoxanase-1

¹ Parâmetros bioquímicos avaliados nos dias do parto, 3, 7 e 10 pós-parto.

² Os tratamentos consistiram de três aplicações subcutâneas no dia do parto (dia 0), 3 e 7 pós-parto. BUTSR (n=12): animais que receberam 30mL de Butafosfan SR (4,5g) através da plataforma de liberação sustentada; BUT (n=12): animais que receberam 30mL de solução de Butafosfan (4,5g); CL (n=12): animais que receberam 30mL de água para injetáveis.

³ Coleta refere-se aos dias em que foram realizadas as coletas sanguíneas (dia do parto (0), 3, 7 e 10 após o parto).

⁴ Grupo*Coleta refere-se a interação do grupo em relação aos dias de coleta sanguíneas. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$;

Tabela 3. Médias e erro médio padrão (EMP) dos parâmetros zootécnicos de vacas leiteiras da raça Holandês que receberam suplementação de Butafosfan através de plataforma de liberação sustentada ou solução, por via subcutânea, no pós-parto recente.

Parâmetros ¹	Tratamentos ²			Valor de P		
	BUTSR	BUT	CL	Grupo	Dias ³	Grupo* Dia ⁴
ECC	2,62±0,77	2,62±0,77	2,47±0,77	0,31	0,01	0,84
Peso (kg)	630,33±12,98	685,82±13,56	651,33±12,98	0,19	0,12	0,86
Produção de Leite (L)	43,41 ^A ±0,38	41,60 ^B ±0,37	40,08 ^C ±0,39	0,001	0,001	0,99

ECC: escore de condição corporal.

¹ Parâmetros zootécnicos (ECC e Peso) avaliados no dia do parto e 10 dias pós-parto. A Produção de leite foi registrada diariamente do dia 11 aos 60 dias pós-parto.

² Os tratamentos consistiram de três aplicações subcutâneas no dia do parto (dia 0), 3 e 7 pós-parto. BUTSR: animais que receberam suplementação de Butafosfan SR (4,5g) através da plataforma de liberação sustentada; BUT: animais que receberam suplementação de Butafosfan (4,5g) através de solução convencional; CL: animais que receberam água para injetáveis.

³ Dias em que foram realizadas a coleta de dados.

⁴ Grupo*Dia é a interação do grupo em relação aos dias de coleta dos dados. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$,^{AB} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes no mesmo parâmetro diferem entre grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Discussão

No presente estudo, foi possível observar que os animais suplementados com Butafosfan tiveram maior produção de leite, menores níveis de glicose e maiores concentrações de cálcio plasmático em comparação ao grupo CL. Destacando que a formulação de liberação sustentada de Butafosfan teve melhor efeito sobre a produção de leite, produzindo 1,81L/dia e 3,33L/dia de leite a mais que o grupo BUT e CL respectivamente.

Com isso, acredita-se que esta nova plataforma farmacêutica possui grande potencial para dar suporte energético aos animais, provavelmente por possuir dissolução mais lenta da forma ativa, permitindo que a taxa de absorção do fósforo orgânico, fosse prolongada nestes animais e com isso, proporcionando melhor resultado com menor quantidade de Butafosfan e mesmo número de aplicações.

O que pode ser salientado quando comparamos os resultados deste estudo com o trabalho de Kreipe *et al.*, (2011), que administrou em torno de 18g de Butafosfan e 9mg de cianocobalamina (10mL/PV de Catosal®B12, Bayer Health Care, São Paulo, Brasil), com o mesmo número de aplicações e obteve aumento de apenas 1,9kg/dias de leite em comparação ao grupo controle.

Entretanto, provavelmente a suplementação de fósforo orgânico independente da forma farmacêutica utilizada, aumentou a síntese de ATP e favoreceu a fosforilação dos intermediários de rotas metabólicas, como a gliconeogênese e glicólise, aperfeiçoando a síntese e utilização da glicose, como já foi mencionado por outros autores como Nuber *et al.*, (2016), Kreipe *et al.*, (2011) e Pereira *et al.* (2013b).

Sendo evidenciado pela maior produção de leite nos animais suplementados, pois se sabe que a glicose é o principal precursor da lactose (Preynat *et al.*, (2009).

Com isso, entendesse que, a menor concentração de glicose nos animais suplementados, deve-se a sua maior utilização para produção de lactose, que por sua vez, permite a maior entrada de água pelo lúmen alveolar da glândula mamária, aumentando o volume de leite produzido por estes animais.

Nos trabalhos de Nuber *et al.*, (2016) e Van Der Staay *et al.*, (2007), a suplementação com Butafosfan resultou em aumento das concentrações de glucagon e redução dos níveis de cortisol, respectivamente. Provavelmente, porque o Butafosfan favorece a síntese de glicose e reduz a β -oxidação, a qual é responsável por formar acetil-coa, que em excesso induz a formação de cortisol.

Com isso, acreditasse menores níveis de cortisol favorecem a síntese de insulina, já que o mesmo tem a capacidade de inibir sua secreção pelas células β do pâncreas (Lambillotte *et al.*, 1997). Tanto a insulina, quanto o glucagon aumentam a disponibilidade de glicose para utilização celular, corroborando aumento da produção de leite.

Vacas de alta produção possuem alto requerimento de minerais, principalmente fósforo e cálcio, para a síntese de colostro e leite (0,7 a 1,3g/L) (Martinez *et al.*, 2012; Eisenberg *et al.* 2014). Neste estudo todos os animais apresentaram hipocalcemia subclínica (HSC) no dia do parto ($\leq 8,50$ mg/dL; Goff, 2014). Entretanto os grupos tratados com fósforo orgânico tiveram seus níveis de cálcio aumentados no dia 10 pós-parto, diferente do grupo CL que permaneceu com HSC durante os dias de coleta.

Possivelmente, a suplementação auxiliou na desmineralização óssea, pois, para que esse mecanismo seja ativado, o paratormônio deve se ligar ao seu receptor no tecido ósseo, ativando a enzima adenilato ciclase, a qual sintetiza a partir do ATP, o segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP

cíclico). Logo, a maior disponibilidade de fósforo pode ter acelerado a formação deste segundo mensageiro, fazendo com que aumentasse os níveis de cálcio plasmático mais rapidamente que o grupo CL (Goff, 2008).

Segundo Kimura *et al.*, (2006), baixas concentrações de cálcio podem contribuir com a supressão imune, pois uma das características iniciais da ativação das células imunes é o aumento das concentrações de cálcio intracelular ionizado, para atuar como segundo mensageiro na transdução de sinal. Neste estudo, a frequência de doenças nos primeiros quinze dias pós-parto, não apresentou diferenças significativas entre os grupos, porém, os animais do grupo BUTSR e BUT tiveram menores porcentagens de animais doentes, respectivamente, que os animais do grupo CL.

Além disso, o grupo BUTSR tendeu a aumentar as concentrações de ALB e ureia em comparação ao grupo CL, sem diferir do grupo BUT. Apesar de todos os animais apresentarem níveis de ALB abaixo dos valores de referência de 2,50 e 3,60 g/L (Smith and de Souza Coutinho, 2006), possivelmente os animais do grupo BUTSR tiveram atenuação do BEN, provavelmente pelo aumento de IMS, que pode ser justificado também pelo aumento da ureia nestes grupos, a qual esta relacionada com a ingestão de proteína total (Roseler *et al.*, 1993).

O que corrobora com os resultados de Pereira *et al.*, (2013a), que observaram aumento de IMS em ovelhas suplementadas com Butafosfan e cianocobalamina dois dias após o parto (i.m., Catosal®B12, BayerHealth Care, São Paulo, Brazil). Já as concentrações de fósforo plasmático permaneceram dentro dos valores fisiológicos (4 a 8mg/dL; Dukes and Reece, 2006). Levando em consideração que o Butafosfan possui rápida metabolização, com meia-vida curta (Full *et al.*, 2010), acreditasse que

isso pode ter facilitado sua utilização pelos tecidos, fazendo com que não ocorresse diferenças significativas entre os grupos.

Conclusões

A suplementação de Butafosfan provavelmente forneceu suporte energético aos animais, permitindo que os mecanismos homeostáticos ocorressem de forma mais rápida e efetiva, aumentando a produção de leite, principalmente através da nova plataforma de liberação sustentada. Entretanto, novos estudos devem ser feitos para comprovar a eficácia desta nova forma farmacêutica e determinar o melhor protocolo para sua utilização e futuramente espera-se que possa ser utilizada também para veiculação de outras substâncias.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e a Granja 4 Irmãos pelo empréstimo dos animais.

Declaração de interesse

Todos os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

Comitê de ética

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas aprovou todos os procedimentos realizados neste experimento (4983-2017).

Referências

- Browne RW, Koury ST, Marion S, Wilding G, Muti P and Trevisan M 2007. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clin Chem* 53, 310-317.
- Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton M, Santos JE and LeBlanc SJ 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci* 94, 4897-4903.
- DUKES H and REECE W 2006. *Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro (RJ). In Guanabara Koogan.
- Eisenberg SW, Ravesloot L, Koets AP and Grunberg W 2014. Influence of feeding a low-phosphorus diet on leucocyte function in dairy cows. *J Dairy Sci* 97, 5176-5184.
- Elizondo Salazar JA, Ferguson JD, Beegle DB, Remsburg DW and Wu Z 2013. Body phosphorus mobilization and deposition during lactation in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97, 502-514.
- Furll M, Deniz A, Westphal B, Illing C and Constable PD 2010. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 93, 4155-4164.
- Goff JP 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J* 176, 50-57.
- Goff JP 2014. Calcium and magnesium disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 30, 359-381, vi.
- Hady PJ, Domecq JJ and Kaneene JB 1994. Frequency and precision of body condition scoring in dairy cattle. *J Dairy Sci* 77, 1543-1547.
- Ingvartsen K 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases.
- Kimura K, Reinhardt TA and Goff JP 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J Dairy Sci* 89, 2588-2595.

- 128 Kreipe L, Deniz A, Bruckmaier RM and van Dorland HA 2011. First report about the mode of
129 action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic
130 early lactating cows. *J Dairy Sci* 94, 4904-4914.
- 131 Lambillotte C, Gilon P and Henquin JC 1997. Direct glucocorticoid inhibition of insulin
132 secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *Journal of Clinical*
133 *Investigation* 99, 414-423.
- 134 Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, Galvao K
135 and Santos JE 2012. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil
136 function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci* 95, 7158-
137 7172.
- 138 Nuber U, van Dorland HA and Bruckmaier RM 2016. Effects of butafosfan with or without
139 cyanocobalamin on the metabolism of early lactating cows with subclinical ketosis. *J Anim*
140 *Physiol Anim Nutr (Berl)* 100, 146-155.
- 141 Pereira RA, Fensterseifer S, Barcelos VB, Martins CF, Schneider A, Schmitt E, Pfeifer LFM,
142 Pino FABD and Corrêa MN 2013a. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes
143 treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. *Small*
144 *Ruminant Research* 114, 140-145.
- 145 Pereira RA, Silveira PA, Montagner P, Schneider A, Schmitt E, Rabassa VR, Pfeifer LF, Del
146 Pino FA, Pulga ME and Correa MN 2013b. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on
147 postpartum metabolism and milk production in dairy cows. *Animal* 7, 1143-1147.
- 148 Preynat A, Lapierre H, Thivierge MC, Palin MF, Matte JJ, Desrochers A and Girard CL 2009.
149 Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole
150 body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92, 677-689.
- 151 Rollin E, Berghaus RD, Rapnicki P, Godden SM and Overton MW 2010. The effect of
152 injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-hydroxybutyrate,
153 calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *J Dairy Sci* 93, 978-987.

- 154 Roseler DK, Ferguson JD, Sniffen CJ and Herrema J 1993. Dietary Protein Degradability
155 Effects on Plasma and Milk Urea Nitrogen and Milk Nonprotein Nitrogen In Holstein Cows. J
156 Dairy Sci 76, 525-534.
- 157 Smith BP and de Souza Coutinho A 2006. Medicina interna de grandes animais. Manole.
- 158 Song Y, Li N, Gu J, Fu S, Peng Z, Zhao C, Zhang Y, Li X, Wang Z, Li X and Liu G 2016.
159 beta-Hydroxybutyrate induces bovine hepatocyte apoptosis via an ROS-p38 signaling
160 pathway. J Dairy Sci 99, 9184-9198.
- 161 Sun F, Wang J, Yang S, Zhang S, Shen J and Xingyuan C 2017. Pharmacokinetics of
162 butafosfan after intravenous and intramuscular administration in piglets. J Vet Pharmacol
163 Ther 40, 203-205.
- 164 Van Der Staay FJ, De Groot J, Van Reenen CG, Hoving-Bolink AH, Schuurman T and
165 Schmidt BH 2007. Effects of Butafosfan on salivary cortisol and behavioral response to
166 social stress in piglets. J Vet Pharmacol Ther 30, 410-416.
- 167 Villanova JCO, Oréfice RL and Cunha AS 2010. Aplicações farmacêuticas de polímeros.
168 Polímeros 20, 51-64.

4. Considerações Finais

O *deficit energético* da vaca leiteira no pós-parto é preocupante, já que diminui a eficiência do sistema imune, aumentando consequentemente a frequência de doenças, além de favorecer a diminuição da produção de leite. Através deste estudo, foi possível observar que a suplementação com Butafosfan aumentou os níveis de cálcio e ainda aumentou a produção de leite, principalmente pela formulação de liberação sustentada.

Espera-se que esta nova plataforma farmacêutica seja um grande avanço à Medicina Veterinária e Zootecnia, por permitir resultados satisfatórios frente ao balanço energético negativo e que futuramente possa ser utilizada também para veiculação de outras substâncias. Entretanto, demais trabalhos são necessários para comprovar sua eficácia e determinar o melhor protocolo para sua utilização.

Referências

CHAPINAL, N. et al. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 10, p. 4897-903, Oct 2011. ISSN 0022-0302.

COUNCIL, S. O. D. C. N. N. R. **Nutrient requirements of dairy cattle**. National Acad. Press, 2001. ISBN 0309069971.

DETERMAN, M. D.; COX, J. P.; MALLAPRAGADA, S. K. Drug release from pH-responsive thermogelling pentablock copolymers. **J Biomed Mater Res A**, v. 81, n. 2, p. 326-33, May 2007. ISSN 1549-3296 (Print) 1549-3296.

DUKES, H.; REECE, W. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan 2006.

EISENBERG, S. W. et al. Influence of feeding a low-phosphorus diet on leucocyte function in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 8, p. 5176-84, 2014. ISSN 0022-0302.

ELIZONDO SALAZAR, J. A. et al. Body phosphorus mobilization and deposition during lactation in dairy cows. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 97, n. 3, p. 502-14, Jun 2013. ISSN 0931-2439

GRUNBERG, W.; MOL, J. A.; TESKE, E. Red blood cell phosphate concentration and osmotic resistance during dietary phosphate depletion in dairy cows. **J Vet Intern Med**, v. 29, n. 1, p. 395-9, Jan 2015. ISSN 0891-6640.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, n. 8, p. 1993-2007, 2008/04/15/ 2008. ISSN 0032-3861. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386108000487> >.

INGVARTSEN, K. **Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases**. 2006. 175-213

KREIPE, L. et al. First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 10, p. 4904-14, Oct 2011. ISSN 0022-0302.

PEREIRA, R. A. et al. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. **Animal**, v. 7, n. 7, p. 1143-7, Jul 2013. ISSN 1751-7311.

PEREIRA et al. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. **Small Ruminant Research**, v. 114, n. 1, p. 140-145, 2013/08/01/ 2013. ISSN 0921-4488. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448813001855> >.

ROLLIN, E. et al. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 3, p. 978-87, Mar 2010. ISSN 0022-0302.

TABELEÃO, V. et al. Combined of butaphosphan and cyanocobalamin on the glucose metabolism of dairy cows after calving. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 2, p. 317-324, 2017. ISSN 0102-0935.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chem Rev**, v. 99, n. 11, p. 3181-98, Nov 10 1999. ISSN 0009-2665.

VAN DER STAAY, F. J. et al. Effects of Butafosfan on salivary cortisol and behavioral response to social stress in piglets. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 30, n. 5, p. 410-6, Oct 2007. ISSN 0140-7783 (Print) 0140-7783.

Anexo



Pelotas, 03 de outubro de 2017

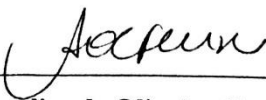
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Desenvolvimento de uma formulação sustentada de butafosfan para ruminantes**” processo número 23110.004983/2017-68, de responsabilidade de **Francisco Augusto Burket Del Pino** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 02/10/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	20/10/2017 a 03/01/2021
Espécie/linhagem/raça	Bovinos/Holandês
Nº de animais	30
Idade	36-48 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Granja 4 irmãos - Rio Grande/RS

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº CEEA 4983-2017).


 M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
 Presidente da CEEA