

Universidade Brasil

Programa de Pós-Graduação em Produção Animal – Campus de Descalvado

ENÉIAS MARCELINO DA ROCHA

**INFLUÊNCIA DA SILIMARINA E OCITOCINA SOBRE A LACTOGÊNESE DE
VACAS**

DESCALVADO, SP

2016

Enéias Marcelino da Rocha

**INFLUÊNCIA DA SILIMARINA E OCITOCINA SOBRE A LACTOGÊNESE DE
VACAS**

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complemento dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

DESCALVADO, SP

2016

FICHA CATALOGRAFICA- UNIVERSIDADE BRASIL

Rocha, Enéias Marcelino da

R572i Influência da silimarina e ocitocina sobre a lactogênese de vacas / Enéias Marcelino da Rocha. – Descalvado, 2016.

39 f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof^o Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

1. Composição do leite. 2. Hepatoprotetor. 3. Ocitocina.
I. Título.

CDD 636.2142

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da UNICASTELO e no Banco de Teses da CAPES

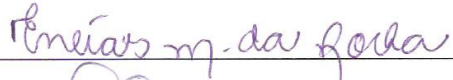
Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a UNICASTELO a disponibilizar através do site <http://www.unicastelo.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

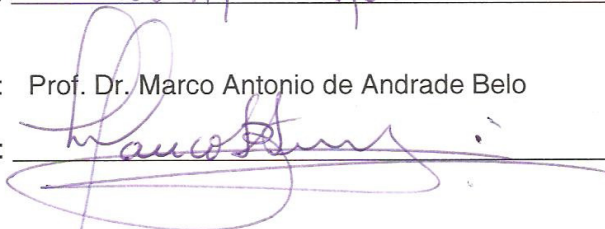
Título do Trabalho: **“Estudo da participação da silimarina sobre a lactogênese de vacas lactantes”**

Autor(es):

Discente: Enéias Marcelino da Rocha

Assinatura:  _____

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Assinatura:  _____

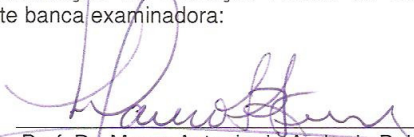
Data: 31 de agosto de 2016

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

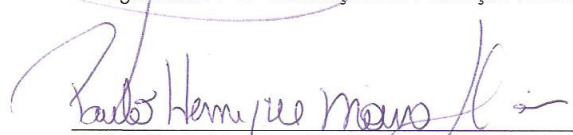
Enéias Marcelino da Rocha

“Estudo da participação da silimarina sobre a lactogênese de vacas lactantes”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Camilo Castelo Branco, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo
(Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi dos Santos
FCAV- UNESP – Jaboticabal

Descalvado, 31 de agosto de 2016

Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo
Presidente da Banca

INFLUÊNCIA DA SILIMARINA E OCITOCINA SOBRE A LACTOGÊNESE DE VACAS

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com silimarina e ocitocina sobre a lactogênese de vacas lactantes, e a segurança clínica dos tratamentos. Foram randomizadas 18 vacas pela produção leiteira diária e tempo de ordenha, constituindo três grupos homogêneos (n=6), sendo T1= controle não tratado, T2= Dose oral de 2g silimarina e T3= Ocitocina 10 UI via intramuscular. As vacas foram avaliadas em três momentos, antes do tratamento (AT), durante o tratamento (DT) (cinco dias consecutivos de tratamento com uma dose diária) e cinco dias após o término do tratamento (TT). Amostras de leite foram colhidas para análise da quantidade de gordura, proteína total, caseína, lactose, sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD), nitrogênio ureico (NU) e contagem de células somáticas (CCS). Os resultados revelaram aumento significativo na quantidade de gordura (0,43%) e ST (0,54%) no leite de vacas tratadas com silimarina, assim como, aumento não significativo na quantidade de lactose e ESD. Comparativamente, o tratamento com ocitocina resultou em maior aumento na quantidade de lactose e ESD no leite quando comparado a silimarina. Amostras de sangue foram colhidas em cada período experimental (AT, DT e TT) para análise sorológica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose, triglicérides, colesterol, creatinina e uréia. Não se observou alterações significativas nos valores séricos de ALT, glicose, triglicérides, colesterol e creatinina das vacas tratadas com ambos os compostos. No entanto, ocorreu aumento transitório na atividade enzimática de AST em vacas tratadas com ocitocina. O tratamento com silimarina resultou em diminuição de 25% dos valores séricos de uréia. O estudo bioquímico sérico revelou a segurança clínica dos tratamentos com ocitocina ou silimarina, pois não resultaram em alterações na funcionalidade hepática e renal das vacas. Contudo, o tratamento com silimarina resultou em alterações satisfatórias na composição do leite principalmente quanto aos teores de gordura e ST.

Palavras-Chaves: Composição do Leite, Hepatoprotetor, ocitocina.

INFLUENCE OF SILIMARIN AND OCITOCIN ON LACTOGENESIS OF COWS

ABSTRACT

This study aimed to study the effect of treatment with silymarin and oxytocin on lactogenesis of lactating cows, and clinical safety of these treatments. 18 cows were randomly assigned by the daily milk production and milking time, compounding three homogeneous groups (n = 6): T1 = untreated control, T2 = oral dose of 2g silymarin and T3 = 10 IU oxytocin intramuscularly. The cows were evaluated in three times before treatment (AT) during treatment (DT) (five consecutive days of treatment with a daily dose) and five days after the end of treatment (TT). Milk samples were taken for analysis of the amount of fat, total protein, casein, lactose, and total solids (TS), nonfat dry extract (ESD), urea nitrogen (UN) and somatic cell count (SCC). The results revealed a significant increase in the amount of fat (0.43%) and ST (0.54%) in milk cows treated with silymarin, as well as no significant increase in the amount of lactose and ESD. In comparison, treatment with oxytocin resulted in an increase in the amount of lactose in milk and ESD compared silymarin. Blood samples were taken from each experimental period (AT, DT and TT) for serological analysis of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, triglycerides, cholesterol, creatinine and urea. There was no significant changes in serum ALT, glucose, triglycerides, cholesterol, and creatinine cows treated with both compounds. However, there was a transient increase in the enzymatic activity of AST in cows treated with oxytocin. Silymarin treatment resulted in a 25% reduction in serum BUN values. Serum biochemical study revealed the clinical safety of treatment with oxytocin or silymarin, they did not result in changes in renal and hepatic function of cows. However, silymarin treatment resulted in satisfactory changes in milk composition especially regarding the fat and ST.

Key Words: Composition of Milk, Hepatoprotective, Oxytocin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura química da Silimarina	14
Figura 2- Estrutura química da Ocitocina	17
Figura 3- Mapa de local da pesquisa	12
Figura 4- Planilha de Campo e Coleta das Amostras de Leite	24
Figura 5- - Coleta de Sangue na Região Caudal, Cápsulas Gastro Resistentes de Silimarina e Amostras de Sangue antes e após Centrifugação Coleta de Material	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH: Hormônio Antidiurético

ALT: Alanina Aminotransferase

AST: Aspartato Aminotransferase

AT: Antes do Tratamento

CCS: Contagem de Células Somáticas

DT: Durante Tratamento

ESD: extrato seco desengordurado

IM: intramuscular

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

NU: Nitrogênio Ureico

O T: Ocitocina

ST: Sólidos Totais

TT: Termino do Tratamento

UI: Unidades Internacionais

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Revisão Bibliográfica.....	11
2.1 Silimarina.....	11
2.2 Ocitocina.....	15
2.2.1 Fisiologia Ocitocina.....	15
2.2.2 Biossíntese da Ocitocina	15
2.2.3 Secreção de Ocitocina.....	15
2.2.4 Mecanismo de Ação da Ocitocina.....	16
2.2.5 Efeitos da Ocitocina na Mama	16
2.2.6 Estrutura Química da Ocitocina	17
2.3. Parâmetros Bioquímicos.....	17
2.4 Composição do Leite	19
3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivos geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. Materiais e Métodos.....	23
4.1 Área de Estudo.....	23
4.2 Delineamento Experimental.....	23
4.3 Análise Físico Química do Leite e Contagem de Células Somáticas	24
4.4 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos.....	24
4.5 Análise Estatística	26
5.0 Resultados e Discussão.....	27
6.0 Conclusão.....	31
7.0 Referências Bibliográficas.....	32

1. Introdução

A pecuária de leite em Rondônia é considerada um dos setores mais importantes do agronegócio rondoniense. Os segmentos de produção, industrialização e comercialização de leite e derivados estão presentes em várias regiões, desempenhando um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. Essa atividade é uma das melhores formas de crescer renda na agricultura familiar, por não necessitar de grandes áreas para produção¹.

No estado de Rondônia mais de 80% dos produtores de leite são classificados como pequenos produtores devido à falta de tecnologias que são necessárias para o manejo do rebanho, ligada ao transporte inadequado do leite, resultando em elevadas perdas e baixo valor agregado aos produtos derivados lácteos².

Também pode-se destacar outras deficiências, como baixa qualidade nutricional da alimentação oferecida ao rebanho, manejo sanitário impróprio, baixo padrão genético, período longo entre os partos, são fatores que cooperam para o baixo rendimento do rebanho³. Neste experimento, foi avaliado a segurança clínica do uso da Silimarina ou da Ocitocina associando a análises físico-químicas do leite afim de implementar algumas técnicas para melhoria tais rebanho para aumentar a produção e qualidade do leite.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Silimarina

Os extratos de plantas medicinais, bem como seus princípios ativos podem ser utilizados como uma alternativa para nutrição de ruminantes, podendo ser utilizados em substituição a produtos sintéticos podendo ser incluída na suplementação de animais por não causar efeitos nocivos à saúde dos ruminante. Dentre estes extratos podemos citar os flavonoides.

Os flavonoides, presentes em grandes quantidade na dieta animal são catequinas e antocianidinas. Estas substâncias foram reconhecidas por apresentarem diversos efeitos tais como manutenção do metabolismo em animais e humanos, além de ação antioxidante em animais⁴.

As catequinas protegem o tecido epitelial da glândula mamaria de danos dos processos oxidativos. Durante o período de transição em vacas leiteiras , vários alterações fisiológicas podem ocorrer e vários estudos avaliaram os mecanismos biológicos associados com este intervalo⁵ .

Certas plantas ou seus extratos possuem várias atividades biológicas, como ação antibacteriana, antioxidante, ou antimutagenicidade além de propriedades que são capazes de limitar distúrbios metabólicos, mesmo se os mecanismos não são completamente compreendidos⁶. Entre estas substâncias, o extrato padronizado de *Silybum marianum* (cardo de leite), silimarina, tem aplicações clínicas em medicina humana, no tratamento de doenças hepáticas de diferentes etiologias: seu extrato contém uma mistura de flavonolignanas e uma fração residual que ainda não foi definida quimicamente em detalhes^{7,8} .

A presença de gordura no fígado durante a gravidez tardia e lactação precoce em vacas leiteiras é o resultado do balanço energético negativo antes do parto e nas primeiras semanas após o parto . Essa gordura surge de uma baixa ingestão de matéria seca, acompanhada de uma grande demanda de energia para a produção de leite⁹. As alterações fisiológicas podem persistirem durante o período de transição , sendo o periodo definido como final da gestação e as primeiras 3 semanas de lactação , e posteriormente irá estabilizar este intervalo^{10,11} .

Vacas leiteiras apresentaram moderada esteatose hepática ao parto^{12,13,14}. Isto pode conduzir também ao desenvolvimento de fígado gorduroso que ocorre quando a taxa de absorção de ácidos graxos esterificados excede a taxa de esgotamento de ácido graxos que pode ser através de oxidação ou transporte como triglicérides ou lipoproteínas¹⁵. Quando esse limite é atingido, os triglicérides podem acumular-se no interior dos hepatócitos, e posteriormente pode ocorrer o aumento da conversão de ácidos graxos para acetoacetato e b - hidroxibutirato (BHBA) que são exportados para outros tecidos através da circulação sanguínea.

O fígado gorduroso pode levar as vacas a serem mais susceptíveis a outros distúrbios metabólicos, tais como cetose, o que pode comprometer seriamente a saúde e a produtividade durante a lactação. Além disso, vacas peri-parto são imunossuprimidos com aumento da susceptibilidade a outras patologias^{16, 17}. O fígado gorduroso associado com a função humoral e imunidade mediada por células alterada são algumas das causas mais importantes de um aumento da susceptibilidade a infecção, tais como a mastite e metrite, com deslocamento do abomaso e conseqüentemente terá diminuição reprodutiva performances produtivas^{12, 10, 18}. Os problemas de saúde durante o período de transição pode resultar em perdas potenciais na produção de leite de pico e persistência da lactação¹¹.

A gravidade dos ácidos graxos no fígado pode ser reduzido pelo uso de agentes hepatoprotetores que limitam a extensão da acumulação de gordura. A silimarina, um extrato padronizado a partir de sementes de *Silybum marianum* L. (Gaertn.) (Cardo de leite), é utilizado em seres humanos para o tratamento de doenças do fígado de diferentes etiologias⁷. extrato da silimarina contém uma mistura de flavolignanas e uma fração residual que ainda não foi definido ou detalhado quimicamente⁸. O interesse nos benefícios potenciais da silimarina na antiguidade foi um dos primeiros documentos encontrados como exemplo de plantas utilizadas para a manutenção da saúde e tratamento da doença¹⁹.

A silimarina vem sendo utilizada como hepatoprotetor na medicina humana²⁰ porém existem relatos do uso deste princípio ativo na descida do leite em mulheres lactantes^{21,22}. A silimarina age protegendo o gene contra

danos aumentando a síntese de proteínas no hepatócito reduzindo a atividade dos promotores tumorais além disso reduz a metabolização do cálcio.

A silimarina tem sido utilizado em uma variedade de doenças do fígado, incluindo a hepatite aguda e crônica, hepatite alcoólica e fígado gorduroso as propriedades hepato- protetores da Silimarina pode ser devido a vários mecanismos, incluindo; inibição da peroxidação de lípidios , anti inflamatória, aumento de desintoxicação , anti - oxidação e efeitos modulatórios do sistema imunológico²³.

É relatado que na presença da silimarina, ocorre a biossíntese de proteínas e a regeneração dos hepatócitos é acelerada no fígado danificado, com isso conduz à restauração de suas funções²⁴. Este extrato possui propriedades antioxidantes que impedem a peroxidação lipídica e destruição da membrana em células influenciando na permeabilidade celular ^{25,26}.

Alguns autores relataram que a silimarina tem propriedades hepatoprotetoras da intoxicação experimental com *Amanita phalloides*²⁷ e aflatoxina B1²⁸ o efeito antioxidante também é sugerido por uma excreção do leite inferior AFM1, um metabolito AFB1, encontrada em vacas leiteiras recebendo silimarina²⁹. *Silybin Silybin* , um dos principais constituinte da silimarina¹⁹, estimula a síntese de fosfatidilcolina por aumentar a atividade da enzima fosfato-colina tranferase no fígado de rato , tanto em condições normais e após intoxicação por galactosamina ^{30,8}. A fração polifenólica de silimarina modifica positivamente perfil de lipoproteínas no plasma e bloqueia o desenvolvimento de fígado de gordo em ratos. Além disso, a silimarina reduz significativamente os níveis gama – glutamil transpeptidase , alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase no soro de ratos com lesão hepática induzida por etanol³¹.

Além dos benefícios descritos anteriormente a principal ação sistêmica de flavonóides é a redução do estresse oxidativo. Ele é mediado por cinco mecanismos de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), sendo prevenção do influxo de Ca²⁺ apesar do aumento dos níveis de ROS / RNS, aumento dos níveis endogenos ROS / RNS sequestrantes, tais como a glutathiona (GSH)³², alteração da função mitocondrial³³, e na diminuição a expressão das enzimas envolvidas na

geração de ROS / RNS, tais como sintase de óxido nítrico (NOS)³⁴, redução do estresse oxidativo em atividade neuroprotetora e anticarcinogênica³⁵.

A ação antioxidante dos flavonóides que complementa os extratores endógenos ROS, por exemplo, ácido ascórbico, tocoferóis, GSH, tioredoxina e glutarredoxina, também são neutralizados por enzimas catalase-peroxidases, e superóxido dismutase (SOD) -que os convertem em compostos menos reativos. Além dos flavonóides, existem outros sequestrantes de plantas derivadas, tais como precursores de lignina e taninos^{36,37}.

A maioria dos estudos sobre silimarina comprova seu efeito protetor sobre as células do fígado, em casos como fígado gorduroso, cirrose, hepatite viral ou auto-imune. Feher (2012) em uma revisão de estudos experimentais e clínicos ele concluiu que, Silimarina reduz a proliferação de células tumorais, angiogênese e resistência à insulina. Além disso, tem um efeito anti-aterosclerótico, e pode suprimir a produção de proteínas por fator de necrose tumoral-alfa³⁸. Em estudo *in vitro* descobriu poderoso efeito antioxidante para proteger as células contra o stress oxidativo, em outra pesquisa realizada em ratos mostraram que a silimarina exibe significativa hepatoprotetora e efeito antioxidante contra lesão hepatocelular induzida por dietilnitrosamina³⁹.

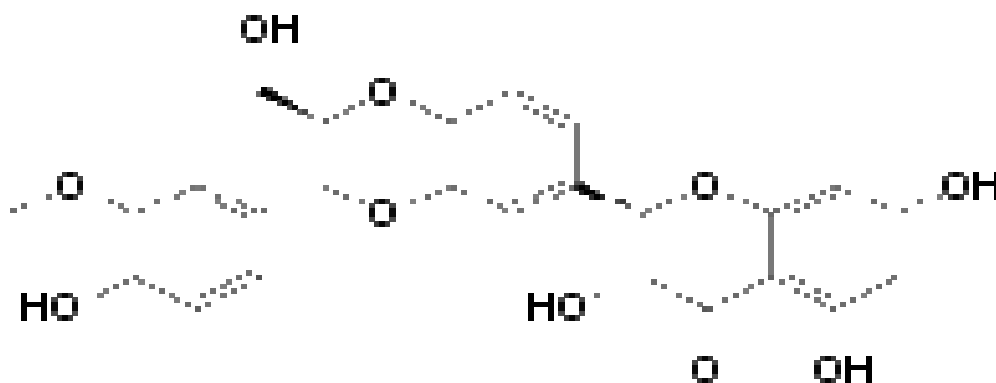


Figura 1: Estrutura química da Silimarina

2.2 Ocitocina

2.2.1 Fisiologia da Ocitocina

A Ocitocina (OT) é um hormônio peptídico sintetizado no hipotálamo e armazenado na neuro-hipófise, classicamente relacionado com os processos fisiológicos que acompanham a gravidez e lactação, estando envolvido nos processos de contração uterina e ejeção de leite. Embora suas ações fisiológicas mais amplamente investigadas estejam relacionadas à reprodução, incluindo os processos de lactação e cuidados maternos, OT também parece participar em vários outros processos fisiológicos, devido à constatação de receptores para OT em mioblastos, ovários, testículos, timo, coração, rins, adipócitos, osteoclastos e osteoblastos⁴⁰.

2.2.2 Biossíntese da Ocitocina

A ocitocina é um nonapeptídeo cíclico que difere da vasopressina apenas por dois aminoácidos. É sintetizada na forma de um precursor maior em neurônios cujos corpos celulares residem no núcleo paraventricular e, em menor grau, no núcleo supraóptico do hipotálamo⁴¹. O peptídeo precursor é rapidamente clivado ao hormônio ativo e sua neurofisiina, que são acondicionados em grânulos secretores como complexo de ocitocina-neurofisiina e secretados pelas terminações nervosas que terminam principalmente na neuro-hipofise. Além disso os neurônios oxitocinérgicos que regulam o sistema nervoso autônomo projetam-se para regiões do hipotálamo, do tronco encefálico e medula espinha e ocorre a síntese da ocitocina em outros órgãos como células lúteas do ovário, endométrio e placenta^{41,42}.

2.2.3 Secreção de Ocitocina

Os estímulos para secreção de ocitocina incluem estímulos sensoriais que se originam da dilatação do colo do útero da vagina e da sucção da mama. É difícil detectar aumentos da ocitocina circulante em mulheres durante o trabalho de parto devido a natureza pulsátil da secreção de ocitocina e, à atividade da ocitocinase circulante. Todavia o aumento da ocitocina na

circulação materna é detectado no segundo estágio do trabalho de parto, provavelmente desencadeado pela distensão contínua do colo do útero e da vagina^{41,43}.

O estradiol estimula a secreção de ocitocina, e a relaxina, um políptido ovariano, inibe a sua liberação. O efeito inibitório da relaxina parece constituir o resultado final de um efeito direto sobre as células produtoras de ocitocina e de uma ação inibitória mediada indiretamente, por opiáceos endógenos.

A ocitocina em doses farmacológicas pode inibir a depuração de água livre pelos rins através de uma atividade semelhante a arginina vasopressina nos receptores V2 de vasopressina, levando em certos casos intoxicação hídrica se for administrada com grandes volumes de líquido hipotônico⁴¹.

2.2.4 Mecanismo de Ação da Ocitocina

A ocitocina administrada por via intravenosa durante o trabalho de parto tem um tempo de meia-vida plasmática de aproximadamente 12-15 minutos. Ela atua através de um GPCR(OXT) específico, estreitamente relacionado aos receptores de vasopressina V 1^a e V2. No miométrio, o OXT acopla-se á Gq/G11, ativando a via PLCbeta-IP3-Ca2+ e intensifica a ativação dos canais de CA2+ sensíveis a voltagem. Além disso a ocitocina aumenta a produção local de prostaglandinas^{41,44}.

2.2.5 Efeitos da Ocitocina na Mama

A ocitocina desempenha importante papel fisiológico na ejeção do leite. A estimulação da mama ocorre por meio da sucção ou de manipulação mecânica que induz a secreção de ocitocina, que provoca contração do mioepitélio que circunda os canais alveolares na glândula mamária. Essa ação força o leite presente nos canais alveolares para os grandes seios coletores, onde fica disponível para o lactente. Porém as deficiência da ocitocina associadas a distúrbios da neuro-hipófise compromete a ejeção de leite após o parto e podem constituir um dos primeiros sinais de insuficiência hipofisária secundária a hemorragia pós parto⁴¹.

2.2.6 Estrutura Química da Ocitocina

A estrutura química da ocitocina é próxima da vasopressina: a ocitocina é (H-Cys-Tyr-Ile-Glu-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂). Ela liga-se a receptores específicos nas células mioepiteliais na glândula mamária e nas células do músculo liso do útero, provocando a ejeção do leite e contração uterina. Na medida em que a vasopressina e a ocitocina possuem estruturas em semelhantes, não é surpresa que seus agonistas e antagonistas possam ligar-se aos mesmos receptores, podendo mimetizar os efeitos da ocitocina^{41,42}.

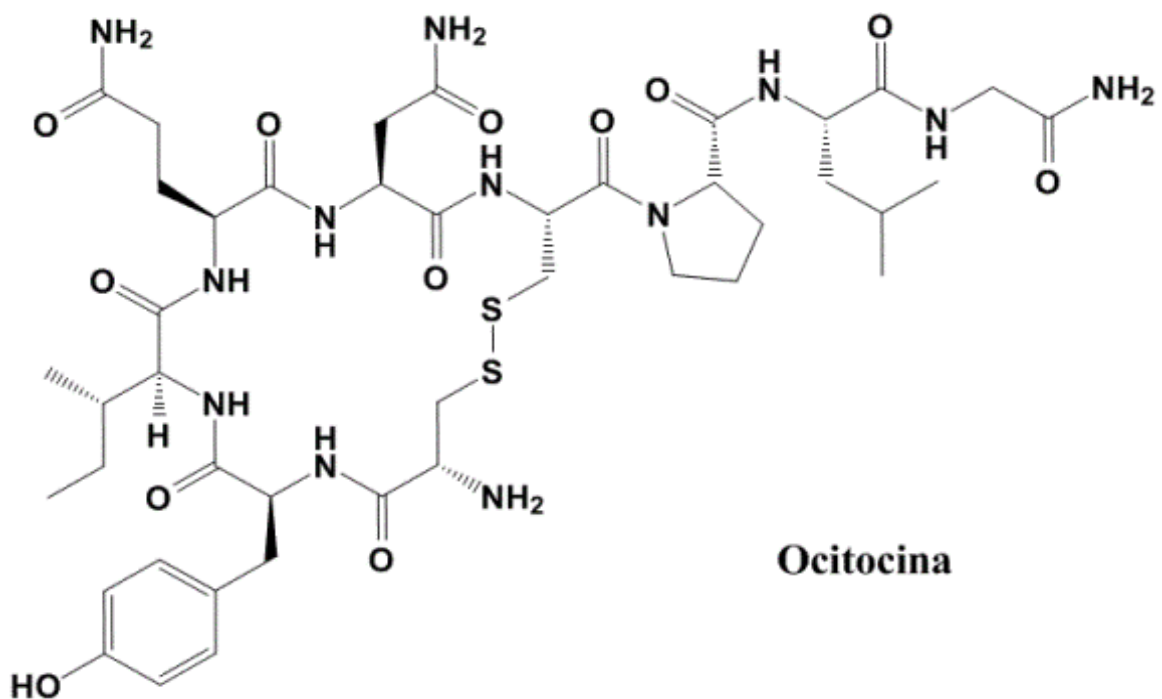


Figura 2: Estrutura química da Ocitocina.

2.3 Parâmetros Bioquímicos

Para diagnosticar a presença de alterações metabólicas nos animais são utilizados vários tipos de exames laboratoriais⁴⁵.

As enzimas são proteínas altamente especializadas com funções catalíticas envolvidas praticamente em todas as reações químicas celulares que participam biomoléculas orgânicas são catalisadas por enzimas com um elevado grau de especificidade sobre seus substratos. As mesmas apresentam papéis bioquímicos específicos, e suas concentrações podem ser alteradas por

processos patológicos sendo realizado suas dosagens em vários exames bioquímicos⁴⁶.

A enzima alanina aminotransferase (ALT) ocorre em todas as células com exceção das células musculares. Sua atividade é alta sendo evidenciada nos rins e no fígado, mas somente a (ALT) de origem hepática é encontrada no plasma⁴⁷. O aumento da atividade desta enzima ocorre em afecções hepatobiliares com colestase⁴⁸.

A enzima aspartato aminotransferase (AST) é encontrada principalmente no fígado, nos eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco⁴⁷. O aumento significativo da AST sérica sugere lesão hepática grave e difusa, especialmente quando associada a icterícia⁴⁵, a mesma pode ser muito útil no diagnóstico de alterações neuromusculares dos animais⁴⁹.

Os marcadores bioquímicos relacionado as proteínas não são modificados somente em uma diminuição de nutrientes proteicos. Por isso, a interpretação de suas concentrações no perfil metabólico deve considerar, além da alimentação, aspectos de manejo, saúde e estado fisiológico. Quando estes marcadores se encontram fora do intervalo de referência é uma manifestação clara de que o rebanho deve ser estudado detalhadamente, para fazer correções da alimentação, do manejo ou da saúde do rebanho, evitando assim que enfraqueça a produção, a fertilidade e a rentabilidade da pecuária⁵⁰.

Os principais marcadores bioquímicos do metabolismo de proteínas em um perfil metabólico são: proteínas totais, albumina, globulina e ureia. As concentrações séricas de uréia podem se elevar com o aumento do consumo dietético de proteína, caquexia ou hemorragia no interior do trato gastrointestinal. E esse aumento, pode refletir tanto uma aceleração no catabolismo protéico, quanto uma diminuição na sua excreção urinária. Fatores não renais que diminuem os valores de uréia sanguínea são esteróides, diminuição do catabolismo protéico e uma severa insuficiência hepática⁵¹.

Outro marcador bioquímico de extrema relevância é a creatinina sendo um metabólito que avalia diretamente a filtração dos glomérulos e, deste modo, é indicativa de função renal. Seus valores tornam-se elevados quando ocorre comprometimento da função renal da ordem de 60% a 75% dos néfrons de ambos os rins⁴⁹.

A glicose plasmática é o indicador menos expressivo do perfil metabólico para avaliar o status energético, devido à insensibilidade da glicemia a mudanças nutricionais e à sua sensibilidade ao estresse. A glicemia, todavia, pode ser de utilidade em condições de déficit energético severo e em animais que não estão em gestação nem em lactação^{50, 53}.

A elevação do colesterol é observada em alguns distúrbios hepáticos, particularmente na diabetes de origem metabólica. Grandes elevações são observadas em todas as formas de colestase. O decréscimo na síntese de colesterol é descrita em graves lesões do parênquima hepático, especialmente na cirrose⁵⁴.

2.4 Composição do Leite

O conhecimento sobre a composição do leite é essencial para a determinação de suas propriedades organolépticas e industriais, imprescindíveis no processamento dessa matéria prima em seus derivados como requeijão, manteiga, queijo entre outros⁵⁵.

Relacionado a composição do leite, o leite possui em média 3,5% de proteínas, 3,8% de gordura, 5,0% de lactose, 0,7% de minerais (cinzas) e 87% de água. Esses valores médios podem oscilar, visto que a variação da composição do leite é grande e em todos os componentes, sendo o que pode ocorrer alteração é a constituída pela gordura. Os sólidos não gordurosos, que compreendem todos os elementos do leite exceto água e gordura, representam, em média, 8,9% do total do leite⁵⁶.

A gordura do leite é um dos constituintes de maior importância que merece destaque devido o estímulo econômico pelo setor industrial. O interesse em produzir maior quantidade de gordura por litro de leite tem motivado produtores na mobilização de técnicas com esse objetivo. Sua concentração e composição sofrem mais influência pela nutrição animal e condições ambientais do que os demais constituintes do leite.

A gordura é constituída 98% pelos triglicerídeos e estes são formados sob a forma de gotas que podem se unir formando glóbulos. Os glóbulos de gordura por estarem suspensos na água e apresentarem densidade inferior, antes da ejeção do leite, ascendem no interior do lúmen alveolar concentrando na camada superior da massa de leite. Isto permite que as gotículas de gordura

agreguem-se nos alvéolos por forças capilares e adesivas retardando sua passagem para o teto, enquanto a porção mais fluida move mais prontamente. Entretanto, as frações com concentração mais elevada de gordura são removidas ao final da ordenha^{57,58}.

Considerado mais estável quanto à sua proporção, a lactose é o constituinte do leite mais simples e mais abundante. É um dissacarídeo formado a partir de moléculas de glicose (glicose + galactose) nas células epiteliais que envolvem os alvéolos. Possui influência direta no volume de leite devido ao seu importante papel regulatório em conjunto com o cloro, o potássio e o sódio na pressão osmótica da glândula mamária⁵⁹. Não sendo encontrado em outros tecidos dos mamíferos, a lactose se destaca sendo a responsável por pelo menos 50% do efeito de pressão osmótica encontrada na glândula mamária. Essa ação regulatória a relaciona com a presença da água no leite, uma vez apresentando concentração mais constante, quanto maior sua capacidade de secreção pelo animal, maior será o volume de leite produzido⁶⁰.

Os peptídeos são os possíveis precursores para a síntese da proteína do leite bem como as proteínas do plasma e aminoácidos livres. Os aminoácidos utilizados em grandes quantidades contribuem com a maior parte do nitrogênio para a síntese proteica. Estes compostos são provenientes da dieta, que passam intactos pela degradação ruminal, sendo absorvidos apenas no intestino ou oriundos de proteínas que sofreram processo de fermentação e são incorporadas às proteínas microbianas⁶¹.

A elevada concentração de aminoácidos no sangue e o fluxo sanguíneo adequado para o úbere, bem como o fluxo dos aminoácidos para os tecidos são os fatores predisponentes para uma eficiência na síntese de proteínas do leite, visto que essa síntese ocorre através da captação celular da glândula mamária. Nas células epiteliais da glândula mamária, os aminoácidos absorvidos são agrupados pelos ribossomos em pequenas cadeias peptídicas, migrando para o complexo de Golgi, onde sofrem condensação culminando na formação de grânulos insolúveis de caseína e solúveis de β -Lactoglobulina⁶⁰.

Um aporte deficiente de aminoácidos, leva à diminuição no conteúdo de proteínas no leite, portanto o conteúdo de proteínas do leite é dependente direto do aporte de energia da dieta. Por outra parte, um excesso, em relação à energia, de proteínas degradáveis e solúveis no rúmen, leva a

uma excessiva formação e absorção de amônia ruminal, com incremento de concentração de uréia no leite⁶¹.

A contagem de células somáticas (CCS) no leite vem sendo usada como indicador geral na determinação da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite⁶². As células somáticas são normalmente, 98% células de defesa do organismo (leucócitos) que migram do sangue em direção à glândula mamária, para combater agentes agressores que poderão causar infecção comumente chamada de mastite. Os demais 2% representam células descamadas do epitélio secretor, processo fisiologicamente normal para renovação celular⁶³.

O número de células somáticas tem sido empregado como um eficiente marcador qualitativo indireto da condição fisiológica do úbere e a qualidade do leite, utilizando como referência a uma possível resposta imunológica do animal frente a um estímulo provocado geralmente por um patógeno^{59,63}.

Neste contexto, animais considerados saudáveis são aqueles que produzem leite com uma CCS abaixo de 200.000 células/mL. Acima desse valor é considerado anormal, indicativo de inflamação do úbere e passível de penalizações⁶⁴. A Normativa 62, que entrou em vigor 01 de janeiro de 2012, determina que produtores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste devem produzir leite com CCS máxima permitida de $4,8 \times 10^5$ células/mL⁶⁵.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a composição do leite e os riscos de alterações em exames laboratoriais como, glicose, colesterol total, triglicerídeos, perfil hepático e função renal em vacas leiteiras em tratamento com o Hormônio Ocitocina ou Protetor Hepático Silimarina.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a eficácia e segurança do uso de Silimarina e Ocitocina.
- Realizar análises bioquímicas para monitorar os níveis sorológicos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, creatinina, ureia, aspartato aminotransferase-AST e alanina aminotransferase-ALT em vacas leiteiras tratadas Silimarina e Ocitocina.
- Analisar a qualidade físico-química do Leite de vacas leiteiras tratadas com Silimarina e Ocitocina.

4. Materiais e métodos

4.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado em uma propriedade de Bovinocultura de Leite e Corte, Linha 15 Km 3,5 Lado Norte. A propriedade possui 87,5 alqueires, no Município de Nova Brasilândia, Região Oeste do Estado de Rondônia.

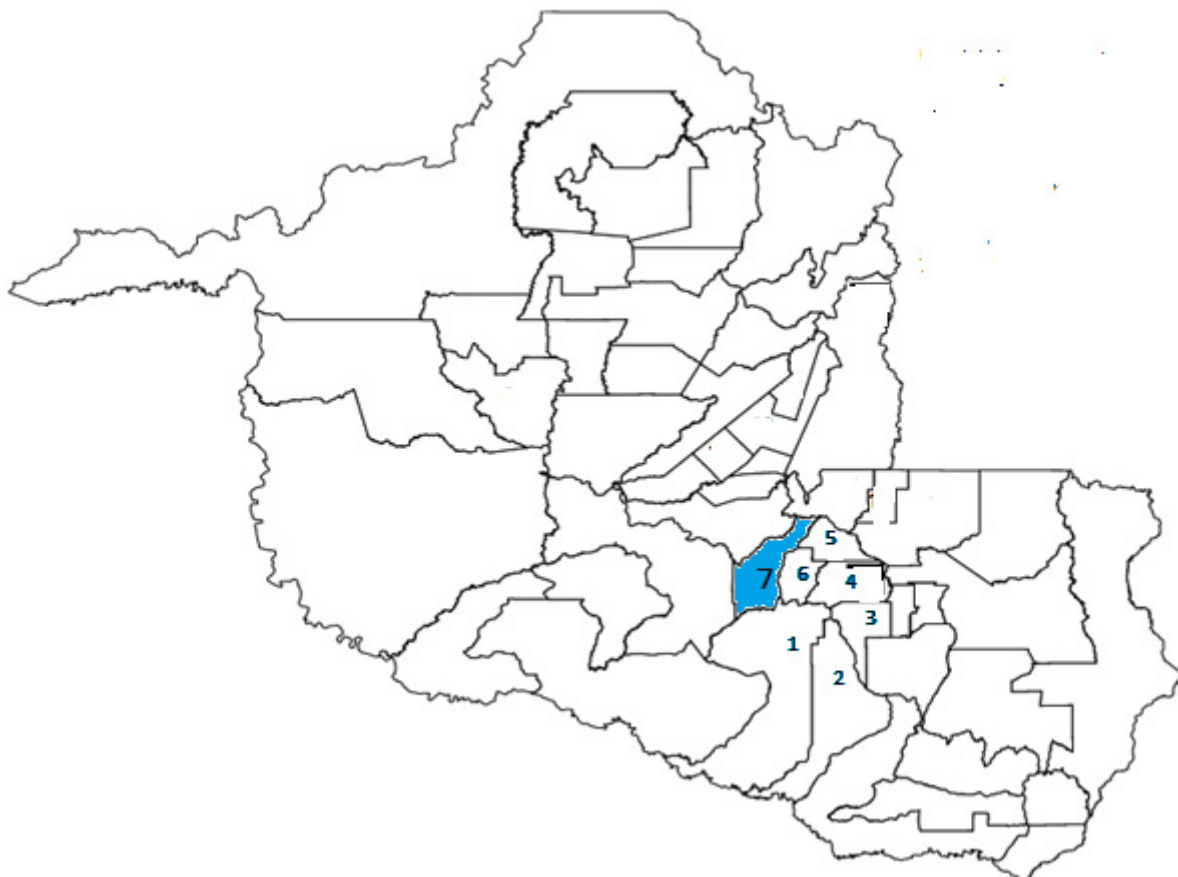


Figura 3: Localização dos municípios da Região Oeste do Estado de Rondônia.

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| 1- Alta Floresta do Oeste | 5- Castanheiras |
| 2- Alto Alegre dos Parecís | 6- Novo Horizonte do Oeste |
| 3- Santa Luzia do Oeste | 7- Nova Brasilândia do Oeste |
| 4- Rolim de Moura | |

4.2 Delineamento Experimental

O estudo foi realizado com 18 vacas leiteiras mestiças, todas produzindo leite com a presença do bezerro com uma ordenha por dia. As vacas foram randomizadas pela produção leiteira diária e pelo tempo de ordenha, constituindo três grupos homogêneos com seis animais cada: sendo T1=

controle não tratado, T2= tratadas com a dose oral de 2g de silimarina em capsulas gastro resistentes manipuladas em farmácia de manipulação e administradas 1 vez ao dia por 5 dias consecutivos via oral/gavage, e T3= tratadas com ocitocina 10 UI administrada via intramuscular (controle positivo).

No delineamento experimental, as vacas foram avaliadas em três momentos, antes do tratamento (AT), durante o tratamento (DT) (cinco dias consecutivos de tratamento com uma dose diária) e cinco dias após o término do tratamento. Amostras de leite foram colhidas para análise da quantidade de gordura, proteína total, caseína, lactose, sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD), nitrogênio ureico (NU) e contagem de células somáticas (CCS).

4.3 Análise Físico Química do Leite e Contagem de Células Somáticas

As análises físico-químicas do leite foi realizada na Clínica do Leite – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), Campus de Piracicaba.

As coletas de leite para as análises físico-químicas foram realizadas: antes da administração dos fármacos, durante a administração e cinco dias após o termino da administração dos fármacos ou seja antes tratamento, durante o tratamento e termino do tratamento, após a coleta o leite foi armazenado em frascos apropriados fornecidos pelo laboratório e guardados em temperatura adequada.

As amostras foram encaminhadas para Clínica do Leite devidamente identificadas através do Sedex dos Correios, onde foram realizadas as seguintes análises: contagem de células somáticas, gorduras, proteínas, nitrogênio uréico, lactose, caseína e extrato seco desengordurado e total.

De acordo com as normas da Clínica do Leite, o leite foi coletado pela manhã em frascos apropriados separadamente, onde foi adicionado o conservante *bronopol* para avaliação do teor de gordura, lactose, proteína e extrato seco desengordurado, caseína e nitrogênio uréico, as análises foram realizadas eletronicamente por absorção (Infravermelho/ PO ANA 001 -4 ISO 9622:2013/IDF 141:2013), a contagem de células somáticas foi analisada por meio de contagem eletrônica por citometria de fluxo (PO ANA 001 – 4 ISO 13366-2:2006/IDF 148-2:2006).



Figura 4: A-Tubos de coleta das amostras de Leite identificados, B- Planilha de campo para coleta de leite

4.4 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

As amostras de sangue foram colhidas em cada período experimental (AT, DT e TT) para análise sorológica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose, triglicerídeos, colesterol, creatinina e uréia. As coletas de sangue foram realizadas através de venopunção com a coleta a vácuo na veia da cauda.

Em seguida realizamos a monitorização da Glicemia (Glicose Sanguinea), com glicosímetro digital (*ACCU – CHEK Performa*, Roche) e respectivas lancetas.

Com todos os cuidados devidos as amostras foram devidamente identificadas com etiqueta contendo o código de cada amostra, no qual foram calibradas para a centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos. Após e centrifugação a separação do soro ou plasma, foram a transferidos para outros tubos de ensaio identificados.

Após a coleta e separação das amostras foram realizadas as seguintes análises bioquímicas: triglicerídeos, colesterol total, creatinina, ureia, aspartato aminotransferase- AST e alanina aminotransferase- ALT, pelo método enzimático colorimétrico semiautomático. Todas as amostras foram feitas por

absorbância em aparelho para análise bioquímica Marca Bioplus Modelo BIO 2000 F semiautomático. As análises bioquímicas foram processadas no laboratório de Bioquímica das Faculdades Associadas de Ariquemes-FAAr e os resíduos dos materiais biológicos foram incinerados pela empresa responsável pela coleta de resíduos da respectiva faculdade.



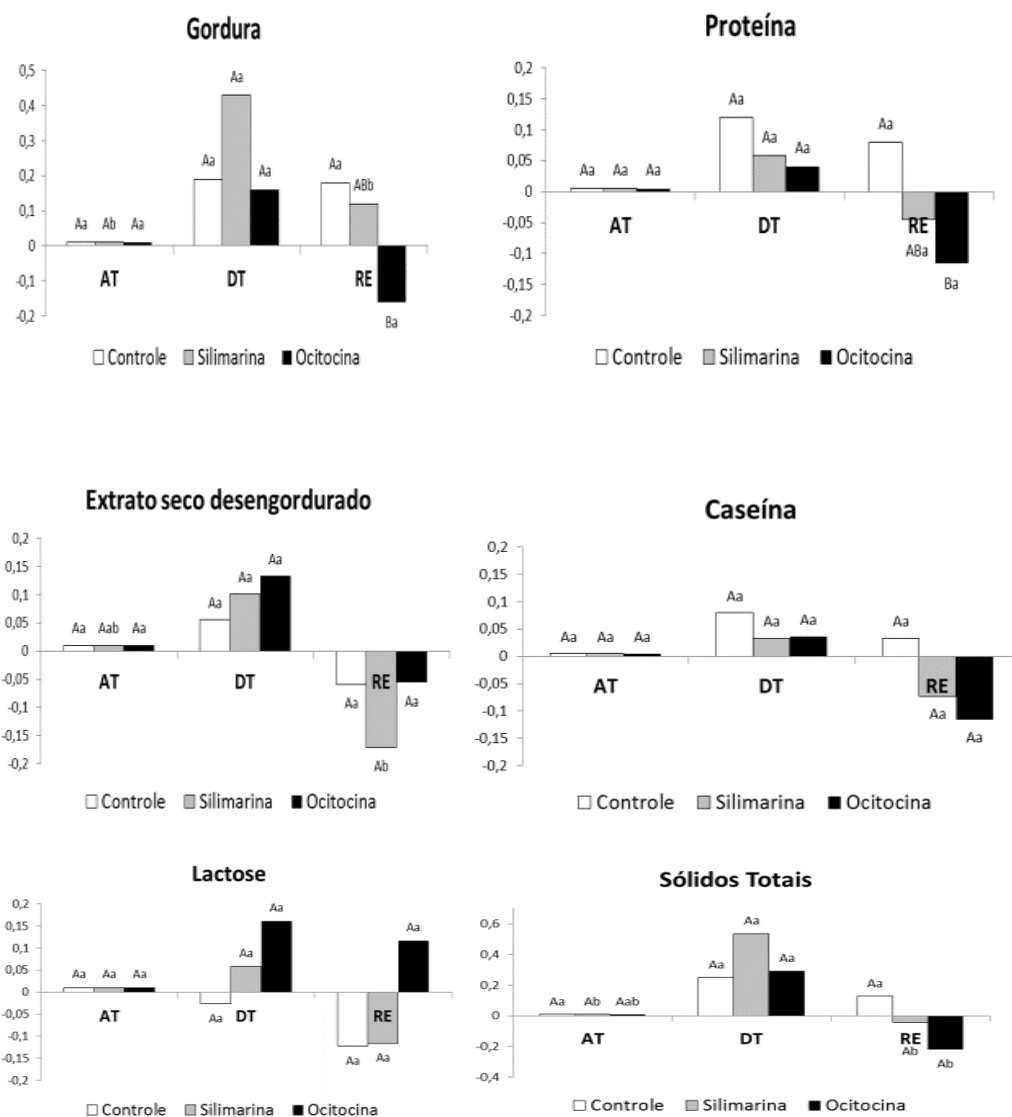
Figura 5: A e B- Coleta de Sangue na Região Caudal, C- Cápsulas gastro resistentes de Silimarina e D Amostras de Sangue dos bovinos avaliados para posterior análise.

4. 5 Análise Estatística

Os resultados obtidos na pesquisa foram transcritos para a planilha do programa Microsoft Office Excel, versão 2013, para serem analisados estatisticamente em delineamento inteiramente casualizado utilizando procedimento PROC GLM no programa Statistical Analysis Software versão 9.3 (SAS, 2012). Pra análise comparativa das médias foi utilizado teste de Tukey a 5% probabilidade ($P < 0,05$).

5. Resultados e Discussão

Os resultados do estudo físico-químico do leite das vacas submetidas aos diferentes tratamentos (Figura 1) revelaram aumento significativo ($P < 0,05$) na quantidade de gordura (0,43% em média) e sólidos totais (0,54% em média) presentes no leite de vacas durante o tratamento com silimarina. Segundo Viotto e Cunha, o teor de sólidos totais e gordura influenciam diretamente o rendimento industrial do leite, para estes autores o rendimento industrial de manteiga, creme leite, leite condensado entre outros⁶⁶.



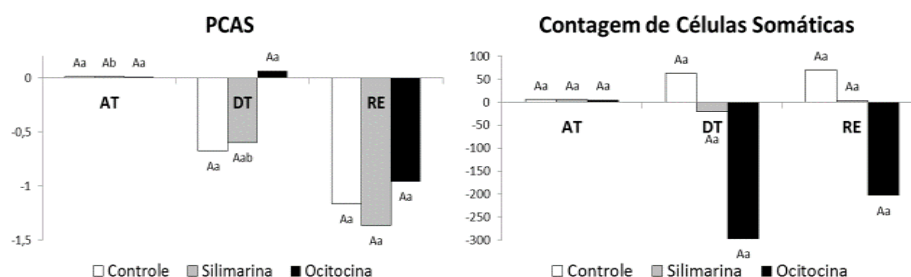


Figura 1. Valores médios (n=6) e análise de variância estatística dos parâmetros avaliados no leite das vacas tratadas com silimarina e ocytocina. AT=Antes do tratamento; DT=Durante o tratamento; RE=Recuperação. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste T ($P < 0,05$), letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro de cada período analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os períodos analisados.

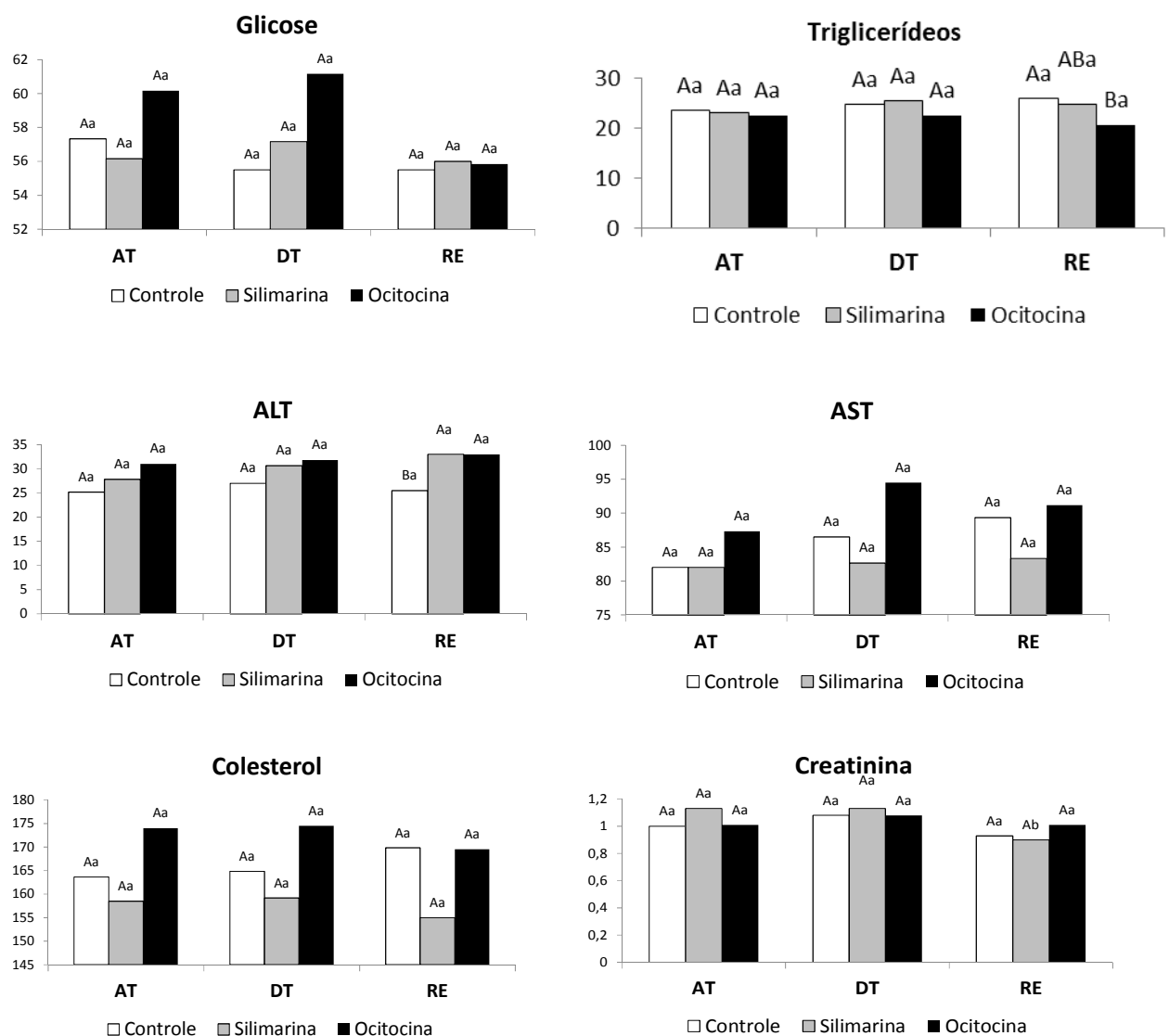
Diversos estudos vem buscando identificar os fatores que influenciam a qualidade do leite em diferentes condições e sistemas de produção. De acordo com Zanela et al., os teores de gordura são influenciados principalmente pela raça utilizada, e as porcentagens de caseína e sólidos totais são afetadas, principalmente, pela nutrição do rebanho⁶⁷.

Houve aumento não significativo ($P > 0,05$) na quantidade de lactose e ESD no leite de vacas tratadas com silimarina (Figura 1). Comparativamente, o tratamento com ocytocina resultou em maior aumento na quantidade de lactose e ESD no leite quando comparado a silimarina. Durante o tratamento com ocytocina verificou-se diminuição da contagem média de células somáticas presentes no leite. Estudos buscaram compreender a importância da contagens de células somáticas sobre qualidade do leite. Machado et al. verificaram que tanques com CCS mais altas apresentaram maior porcentagem de gordura, menor porcentagem de proteína e lactose e igual porcentagem de sólido totais. Para estes autores, as mudanças mais significativas ocorrem a partir de 1.000.000 cél./mL para gordura e 500 mil cél./mL para proteína e lactose. Neste estudo, apenas 8 amostras de leite das 72 analisadas apresentaram valores superiores a 500 mil cél./mL⁶³.

Os tratamentos com silimarina e ocytocina não resultaram em variações na quantidade de NU, caseína e proteínas presentes no leite das vacas (Figura 1). Outros estudos buscaram compreender as variações de nitrogênio ureico presentes no leite das vacas durante o período de lactação. Aquino et al. estudaram o efeito de níveis crescentes de uréia na dieta de vacas em lactação

sobre a produção e a composição físico-química do leite. Para estes autores, os teores de proteína, gordura, lactose, uréia, extrato seco total e extrato seco desengordurado não foram afetados pelas dietas⁶⁸. Os resultados deste estudo sugerem que o uso de até 1,5% de uréia na matéria seca da dieta de vacas em lactação não altera a produção, a composição e as características físico-químicas do leite.

O estudo hematológico das vacas tratadas com silimarina e ocitocina não apresentou alterações significativas nos valores bioquímicos séricos de ALT, glicose, triglicerídeos, colesterol e creatinina (Figura 2). No entanto, ocorreu aumento transitório nos valores de atividade enzimática de AST em vacas tratadas com ocitocina.



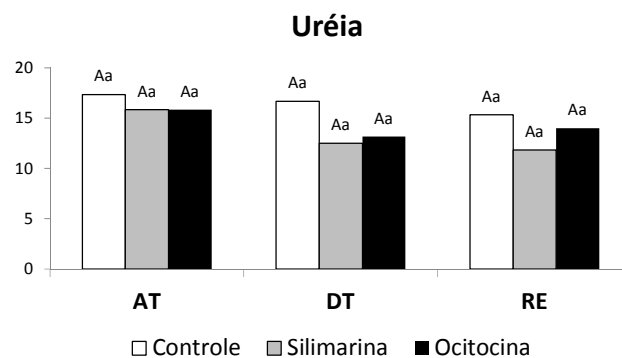


Figura 2. Valores médios (n=6) e análise de variância estatística dos parâmetros bioquímicos avaliados no sangue das vacas tratadas com silimarina e ocitocina. AT=Antes do tratamento; DT=Durante o tratamento; RE=Recuperação. Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste T ($P < 0,05$), letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro de cada período analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os períodos analisados.

O tratamento de vacas com silimarina resultou em diminuição de 25% dos valores séricos de uréia. Outros autores buscaram compreender os valores séricos de creatinina e uréia sanguínea em bovinos. Análise dos resultados da bioquímica sérica de bovinos da raça Jersey, Gregory et al., verificaram teores séricos da uréia de $28,35 \pm 10,94$ mg/dL e o teores séricos da creatinina de $1,35 \pm 0,21$ mg/dL como forma de serem utilizados para a avaliação da função renal destes animais⁶⁹. Segundo Vasquez e Herrera, problemas reprodutivos nos rebanhos vem sendo associado aos níveis de elevados de nitrogênio no sangue, pois valores elevados de uréia plasmática favorecem sua difusão para os órgãos reprodutivos, alterando o ambiente uterino e podendo causar mortalidade embrionária ou impedindo a fecundação⁷⁰.

Portanto, os achados do estudo bioquímico sérico das vacas revelaram a segurança clínica dos tratamentos com ocitocina ou silimarina, pois ambos os tratamentos não resultaram em alterações significativas na funcionalidade hepática e renal das vacas durante a lactação. A inocuidade dos tratamentos com fármacos vem sendo objeto de estudo por diversos autores^{71,72,73,74} como protocolo para obtenção de registro junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estes estudos visam utilizar as doses terapêuticas e avaliar o impacto das mesmas na saúde dos animais, pois segundo estes autores o tratamento farmacológico adequado precisa agregar eficácia terapêutica à segurança clínica.

6. Conclusão

O tratamento com silimarina sobre a lactogênese de vacas lactantes resultou em alterações satisfatórias na composição do leite principalmente quanto aos teores de gordura e sólidos totais, ambos influenciam diretamente o rendimento industrial do leite. Contudo, o estudo bioquímico sérico revelou a segurança clínica do tratamento com silimarina, pois não resultou em alterações na funcionalidade hepática e renal das vacas.

7- Referências Bibliográficas

- 1- IDARON - Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do estado de Rondônia. Disponível em: [http://www.idaron.ro.gov.br/multimedia/downloads/docs/producao de leite e em rondonia-divulgacao.pdf](http://www.idaron.ro.gov.br/multimedia/downloads/docs/producao_de_leite_e_em_rondonia-divulgacao.pdf) Acesso em 20 de Abril de 2015
- 2- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf > Acesso em 20 de abril de 2015.
- 3- Brito, L.G. 2011. Sistemas de Produção Leiteira para Rondônia. Editora Técnica, Porto Velho, Rondônia, 2011.
- 4- Qian, J.Y.;Liu, D;Huang, A.G. The efficiency of flavonoids in polar extracts of Lycium chinesis Mill fruits as free radical scavenger. Food Chemistry, London, v. 87, p.283-287, 2004
- 5- Lauzon, K. et al. 2005 Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 88, p. 4295-4303, 2005.
- 6- Tedesco, D. 2001. The potentiality of herbs and plant extracts as feed additive in livestock production. Zootec. Nutr. Anim. 3-4:111–133.
- 7- Saller, R., R. Meier, and R. Brignoli. 2001. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. Drugs 61:2035–2063.
- 8- Skottova, N., R. Vecera, K. Urbanek, P. Vana, D. Walterova, and L. Cvak. 2003. Effects of polyphenolic fractions of silymarin on lipoprotein profile in rats fed cholesterol-rich diets. Pharmacol. Res. 47:17–26.
- 9- Grummer, R. R., 1995: Impact of changes in organic nutrient metabolism on developing feeding strategies to minimize stress during the transition from late pregnancy to early lactation. J. Dairy Sci. 73, 2820–2833.
- 10-Drackley, J. K., T. R. Overton, and G. Neil Douglas. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. J. Dairy Sci. 84(E. Suppl): E100–E112.
- 11-Goff, J. P., and R. L. Horst. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J. Dairy Sci.80:1260–1268.

- 12-Gerloff, B. J., T. H. Herdt, and R. S. Emery, 1986: Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 845–850.
- 13-Tesfa, A. T., M. Tuori, L. Syria" la" -Qvist, L. Po" so" , H. Saloniemi, K. Heinonen, K. Kivilahti, T. Saukko, and L. A. Lindber, 1999: The influence of dry period feeding on liver fat and postpartum performance of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 76, 275–295.
- 14-Jorritsma, R., H. Jorritsma, Y. H. Schukken, P. C. Bartlett, Th. Wensing, and G. H. Wentink, 2001: Prevalence and indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands. *Livest. Prod. Sci.* 68, 53–60.
- 15-Grummer, R. R. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:3882–3896.
- 16-Mallard, B.A.; Dekkers, J.C.; Ireland, M.J. et al Alteration in Immune Responsiveness During the Peripartum Period and its Ramification on Dairy Cow and Calf health. *J. Dairy Sci*, v.81, p. 585-595, 1998.
- 17-Madsen, S., P. S. D. Weber, and J. L. Burton. 2002. Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86:159–175.
- 18-Zerbe, H., N. Schneider, W. Leibold, T. Wensing, T. A. M. Kruip, and H. J. Schuberth. 2000. Altered Functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54:771–786.
- 19- Morazzoni, P., and E. Bombardelli. 1995. *Silybum marianum* (cardus marianus). *Fitoterapia* 66:3–42.
- 20- Portella, L.R.L.; Belo, M. A. A. Caracterização das unidades produtivas agropecuárias de leite, Município de Buri, Região Sudoeste do Estado de São Paulo. *Enciclopédia biosfera*, v. 8, p. 190-202, 2012.
- 21-Tedesco, D. et al. Effects of Silymarin, the hepatoprotective nature, dairy cows in periparturient. *J. Dairy Sci.* 87:2239–2247, 2004.
- 22- Zuppa, A. A. Safety and efficacy of galactogogues: substances induce, maintain and increase breast milk production. *J Pharm Sci Pharmaceut* 13 (2) 162-174, 2010.

- 23- Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am j gastroen.* 1998;93(2):139-43. PubMed PMID: 9468229.
- 24- Leng-Peschlow, E. 1996. Properties and medical use of flavonolignans (silymarin) from *Silybum marianum*. *Phytother. Res.* 10:25–26.
- 25- Muriel, P., and M. Mourelle. 1990. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. *J. Appl. Toxicol.*10:275–279.
- 26-Mira, L., M. Silva, and C. F. Manso, 1994: Scavenging properties of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* 48, 753–759.
- 27- Kröncke, K. D., G. Fricker, P. J. Meier, W. Gerok, T. Wieland, and G. Kurz. 1986. α -Amanitin uptake into hepatocytes. Identification of hepatic membrane transport systems used by amatoxins. *J. Biol. Chem.* 261:12562–12567.
- 28-Rastogi, R., A. K. Srivastava, M. Srivastava, and A. K. Rastogi. 2000. Hepatocurative effect of picroliv and silymarin against aflatoxin B₁ induced hepatotoxicity in rats. *Planta Med.* 66:709–713.
- 29- Tedesco, D., M. Tameni, S. Steidler, S. Galletti, and F. Di Pierro. 2003. Effect of silymarin and its phospholipid complex against AFM1 excretion in an organic dairy herd. *Milchwissenschaft* 58:416–419.
- 30-Schriewer, H., and F. Weinhold. 1973. The influence of silybin from *Silybum marianum* (L.) gaertn. on in vitro phosphatidyl choline biosynthesis in rat livers. *Arzneimittelforschung* 29:791–792.
- 31- Wang, M., L. Grange, J. Tao, and E. Reyes. 1996. Hepatoprotective properties of *Silybum marianum* herbal preparation on ethanolinduced liver damage. *Fitoterapia* 67:166–171.
- 32- Ishige, K.; Schubert, D.; Sagara, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 433–446.
- 33-Mandel, S.; Youdim, M.B. Catechin polyphenols: Neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 37, 304–317.

- 34-Raso, G.M.; Meli, R.; di Carlo, G.; Pacilio, M.; di Carlo, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 2001, *68*, 921–931.
- 35-Galati, G.; O'Brien, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, *37*, 287–303.
- 36-Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* 2003, *91*, 179–194.
- 37-Fruehauf, J.P.; Meyskens, F.L. Reactive oxygen species: A breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* 2007, *13*, 789–794.
- 38- Feher J, Lengyel G. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(1):210-17. PubMed PMID: 21466434.
- 39- Pradeep K, Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;560(2-3):110-16. PubMed PMID: 17300777.
- 40- Laporte, S.A.; Zingg, H.H.;. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol. Metab.*, v.14, n.5 , p. 222-227, Jul. 2003.
- 41- Goodman & Gilman. *Farmacologia, bases para a terapêutica.* 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- 42- Rang. H.P; Dale. M. M; Ritter.J.M. *Farmacologia.* 6° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- 43- Brody, T.; Wecker, L.; Minneman, K. P. *Farmacologia Humana.* 4ª ed. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2006.
- SILVA, Penildon. *Farmacologia.* 7ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,, 2006.
- 44-Katzung, Bertram G. *Farmacologia Básica e Clínica .* 10ª ed Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2009
- 45- Meyer, D. J.; Coles, E. H.; Rich, L. J *Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis.* Philadelphia, Saunders, 1992. 350p.

- 46- Motta, Valter. Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretação. 4ª edição. Porto Alegre: Editora Médica Missau. São Paulo. 2003
- 47-Santos, C. A. J., Riet-Correa, F., Dantas, A. F. M., Barros, S. S., Molyneux, R. J., Medeiros, R. M. T., Silva, D. M., Oliveira, O. F. 2007. Toxic hepatopathy in sheep associated with the ingestion of the legume *Tephrosia cinerea*. Journal Veterinary. Diagnosis Investigation. p .19:690-694.
- 48- Dirksen, G. Sistema digestivo. In: Dirksen, G.; Grunder, H. D.; Stöber, M. Exame clínico dos bovinos. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p. 166-288
- 49- Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6.ed. San Diego: Academic, 2008. 916p.
- 50- Contreras, P.A. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: González, F. D. F.; Barcellos, J. O.; Ospina, H.; Ribeiro, L. A. O. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: UFRGS, p.23-30, 2000
- 51-Doretto, J. S. Influência do tempo e da temperatura de estocagem sobre a estabilidade de alguns constituintes do soro sangüíneo de bovinos. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias Veterinárias da UNESP, 1996. 61p. (Dissertação, Mestrado).
- 52-Morais, M. G.; Rangel, J. M.; Madureira, J. S.; Silveira, A. C. Variação sazonal da bioquímica clínica de vacas aneloradas sob pastejo contínuo de *Brachiaria decumbens*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.52, n.2, p.98-104, 2000.
- 53-Wittwer, F., Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: González, F. H. D., Barcellos, J.O., Ospina, H., Ribeiro, L. A. O. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- 54-Kuntz, E.; Kuntz, H. D. Hepatology: Principles and practice. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 2002. 825p.
- 55-Glantz, M.; Lindmark Månsson, H.; Stålhammar, H.; Bårström, L.O.; Fröjelin, M.; Knutsson, A.; Teluk, C.; Paulsson, M. Effects of animal

- selection on Milk composition and processability. *Journal of Dairy Science*, v.92, n. 9, p.4589-4603, 2009.
- 56-Behmer, M.L.A. *Tecnologia do leite: queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise*. 13ed. São Paulo: Nobel, 1999.
- 57-Ontsouka, C.E.; Bruckmaier, R.M.; Blum, J.W. Fractionized Milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2005–2011, 2003.
- 58-Hafez, E.S.E.; Hafez, B. *Reprodução Animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 513p, 2004.
- 59-Schalm, O.W.; Carroll, E. J.; Jain, N.C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea & Febiger, 360 p, 1971.
- 60-Hafez, E.S.E.; Hafez, B. *Reprodução animal*. 4.ed. São Paulo: Manole, 541p, 1988.
- 61-Cunningham, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. 3.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 579p, 2004.
- 62-Tronco, V.M. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. 3.ed. Santa Maria: UFSM, 206p, 2008.
- 63-Machado, P.F.; Pereira, A.R.; Sarríes, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n. 6, p. 1883-1886, 2000.
- 64-Harmon, R.J. Somatic cell counts: a primer. In: Annual meeting national mastitis council, 40. Reno, 2001. Proceedings. Madison: National Mastitis Council, p.3-9, 2001.
- 65-Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011.
- 66-Viotto WH, Cunha CR. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: Mesquita AJ, Dürr JW, Coelho KO. *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento; 2006, v.1, p.241-258.
- 67-Zanela. M.B.; Fischer.V.;Ribeiro.M.E.R.; Stumpf W.J.; Zanela.C; Marques.L.T; Martins.P.R.G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.1, p.153-159, jan. 2006

- 68-Aquino, A.A.; Botaro, B.G.; Ikeda, F.S.; Rodrigues, P.H.M.; Martins, M. F.; Santos, M.V. Efeito de níveis crescentes de uréia na dieta de vacas em lactação sobre a produção e a composição físico-química do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n. 4, p. 881-887, 2007.
- 69-Gregory, L.; Birgel Junior, E.H.; D'Angelino J.L.; Benesi F.J.; Araújo, W.P.; Birgel, E.H. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça jersey criados no estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.71, n.3, p.339-345, jul./set., 2004
- 70-Vásquez, E.F.A; Herrera, A.P.N. Concentração plasmática de cortisol, uréia, cálcio e fósforo em vacas de corte mantidas a pasto suplementadas com levedura de cromo durante a estação de monta. *Ciência Rural*, Santa Maria v. 33, n. 4, jul-ago, 2003.
- 71-Moraes, A. C. ; Prado, E. J. R. ; Faria, V. P. ; Gírio, T.M.S. ; Manrique, W. G. ; Belo, M. A. A. . Clinical safety of dichlorvos (45%), cypermethrin (5%) and piperonyl butoxide (25%) administered by spray on the skin of cattle. *MVZ Cordoba*, v. 20, p. 4873-4882, 2015.
- 72-Belo, M. A. A.; Prado, E.J.R. ; Soares, V. E. ; Souza, L. M. ; Mota, F. C. C. ; Giamlorenço, T.F. ; Gírio, T.M.S. . Eficácia de diferentes formulações no controle da mosca *Haematobia irritans* em bovinos naturalmente infestados. *Bioscience Journal*, v. 28, p. 245-250, 2012.
- 73-Belo, M. A. A.; Souza, L. M.; Soares, V. E.; Sobreira, M. F. R. ; Cassol, D. M. S. ; Toma, S. B. . Tratamento hepatoprotetor favorece a resposta leucocitária de ratos wistar intoxicados por ccl4. *Archives of Veterinary Science*, v. 14, p. 74-82, 2010.
- 74-Belo, M. A. A.; Soares, V. E.; Souza, L. M.; Sobreira, M. F. R.; Cassol, D. M. S. ; Toma, S. B. . Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology (Print) JCR*, v. 64, p. 155-165, 2012.

