

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DIETAS  
HIPERLIPÍDICAS NA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE  
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) CRIADAS NA AMAZÔNIA  
ORIENTAL**

**Benjamim de Souza Nahum**

Médico Veterinário

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DIETAS  
HIPERLIPÍDICAS NA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE  
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) CRIADAS NA AMAZÔNIA  
ORIENTAL**

**Benjamim de Souza Nahum**

**Orientadora: Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti**

**Coorientadora: Profa. Dra. Naiara Zoccal Saraiva**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal

**2018**

N153e Nahum, Benjamim de Souza  
Efeito da suplementação com dietas hiperlipídicas na performance reprodutiva de búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia oriental / Benjamim de Souza Nahum. -- Jaboticabal, 2018 ix, 63 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti

Co-orientadora: Naiara Zoccal Saraiva

Banca examinadora: Maria Emília Franco Oliveira, Joaquim Mansano Garcia, Roberta Carrilho Canesin, Ériklis Nogueira.

Bibliografia

1. AGPI. 2. Búfalo. 3. Colesterol. 4. Gordura Protegida. 5. Sincronização. 6. Torta de Palmiste. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.1:636.293.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DIETAS HIPERLIPÍDICAS NA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) CRIADAS NA AMAZÔNICA ORIENTAL

**AUTOR: BENJAMIM DE SOUZA NAHÚM**  
**ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI**  
**COORIENTADORA: NAIARA ZOCCAL SARAIVA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA/UNESP - Araçatuba

Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA  
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisadora Dra. ROBERTA CARRILHO CANESIN  
Centro APTA Bovinos de Corte / IZ - Sertãozinho/SP

Pesquisador Dr. ÉRIKLIS NOGUEIRA (Participação por Videoconferência)  
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal / EMBRAPA - Corumbá/MS

Jaboticabal, 20 de março de 2018

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Benjamim de Souza Nahum:** Filho de Benjamim Viana Nahum e Gracinda de Souza Nahum, nascido em 13 de agosto de 1971, natural de Belém, Pará. Concluiu o ensino médio no Colégio Salesiano Nossa Senhora do Carmo, no ano de 1988, na mesma cidade. Ingressou no curso de Graduação em Biologia modalidade médica na Universidade Federal do Pará, em janeiro de 1989; e Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, em janeiro de 1992. Concluindo o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 1996. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, nível de mestrado, área de Medicina e Saúde Animal, na Universidade Federal do Pará – UFPA, em agosto de 1997, sob a orientação do Prof. Dr. William Gomes Vale, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e obteve o grau de mestre em agosto de 2000, com a dissertação de mestrado intitulada “Avaliação da água de coco (*Cocus nucifera*) como diluidor para a congelamento do sêmen de bubalino”. De 2000 até 2002, atuou ministrando cursos do SENAR AR/PA na área de bovinocultura, e a partir de 2002 atuou como fiscal Agropecuário da Secretaria de Agricultura do Estado do Pará e da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARÁ, até agosto de 2005. Desde agosto de 2005, é pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém do Pará, na área de Sistemas de Produção Animal – Manejo Animal. Em agosto de 2014, ingressou no curso de Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal, São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti e coorientação da Dra. Naiara Zoccal Saraiva.

## EPÍGRAFE

Deus está aqui neste momento,  
Sua presença é real em meu viver,  
Entregue sua vida e seus problemas,  
Fale com Deus, Ele vai ajudar você.

Deus te trouxe aqui,  
Para aliviar o teu sofrimento,  
É Ele o autor da fé,  
Do princípio ao fim,  
Em todos os seus tormentos.

E ainda se vier noites traiçoeiras,  
Se a Cruz pesada for, Cristo estará contigo,  
E o mundo pode até fazer você chorar,  
Mas Deus te quer sorrindo...

Noites Traiçoeiras  
Composição: José Carlos Papae (1986).

## DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, pela vida e saúde.

À FAMÍLIA, bem mais precioso que Deus nos concede, em especial aos meus amados pais, BENJAMIM VIANA NAHUM e GRACINDA DE SOUZA NAHUM, pelo amor, dedicação e incentivo em todos os momentos, meu exemplo de casal, fé, determinação e força.

À MINHA IRMÃ, pelo amor incondicional:  
Marcia Nahum.

À MINHA ESPOSA AMADA, pela dedicação, companheirismo e carinho:  
Márcia Sobrinha.

ÀS MINHAS FILHAS, amor intenso e despretensioso de cada dia:  
Luiza Nahum e Amanda Nahum.

Vocês são a razão do meu viver, amo MUITO cada um de vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha ilustre orientadora, Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, pela oportunidade, confiança, paciência e ensinamentos.

À Embrapa Amazônia Oriental, pela oportunidade de crescimento profissional, cessão dos animais e instalações para realização dos experimentos.

Aos colegas de Embrapa, em especial a Dra. Naiara Zoccal Saraiva, pela confiança depositada, oportunidades concedidas e incentivo constante.

Aos professores da UNESP de Jaboticabal, em especial ao prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelos ensinamentos, sugestões e convívio.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Araçatuba, em especial ao Departamento de Apoio a Produção e Saúde Animal, ao prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira e Devani Mariano Pinheiro, pela valiosa execução das dosagens hormonais e orientações para o entendimento dos resultados.

Ao professores da Universidade Federal do Pará e Universidade Federal Rural da Amazônia, em especial aos profs. Dr. André Guimarães Maciel e Silva e Dr. Cristian Faturi, pelo acompanhamento, orientações e apoio laboratorial.

Aos colegas da pós-graduação, em especial ao colega e parceiro nas disciplinas Marivaldo Rodrigues Figueiró, pela convivência dinâmica, produtiva e amigável no transcorrer das disciplinas.

## SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
Aspectos da bubalinocultura.....	1
Influência da suplementação lipídica na reprodução.....	2
Utilização da torta de palmiste na suplementação de ruminantes.....	5
Suplementação de AGPI em ruminantes e seus reflexos na reprodução.....	6
Referências.....	10
CAPÍTULO 2 – Efeito da suplementação alimentar com torta de palmiste nas concentrações circulantes de progesterona, lipidemia e função hepática de búfalas ( <i>Bubalus bubalis</i> ).....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1. Introdução.....	20
2. Material e Métodos.....	22
2.1. Local experimental.....	22
2.2. Dietas e animais experimentais.....	22
2.3. Análises químicas.....	23
2.4. Sincronização do ciclo e avaliação ultrassonográfica dos ovários.....	25
2.5. Colheita de sangue e ensaios.....	26
2.6. Análise Estatística.....	27
3. Resultados.....	27
4. Discussão.....	31
5. Conclusão.....	34
Agradecimentos.....	34
Referências.....	35

CAPÍTULO 3 – Efeito da suplementação alimentar com ácidos graxos poliinsaturados nas concentrações circulantes de progesterona, lipidemia sanguínea e taxa de concepção em búfalas submetidas a IATF.....	40
Resumo.....	41
Abstract.....	42
1. Introdução.....	43
2. Material e Métodos.....	46
2.1. Local e animais experimentais.....	46
2.2. Delineamento experimental.....	46
2.3. Protocolo de sincronização do estro e ovulação.....	47
2.4. Análise bromatológica.....	48
2.5. Colheita e processamento de sangue.....	51
2.6. Dosagens de metabólitos sanguíneos e progesterona.....	51
2.7. Diagnóstico de prenhez.....	52
2.8. Análise Estatística.....	52
3. Resultados.....	53
4. Discussão.....	56
5. Conclusão.....	58
Agradecimentos.....	58
Referências.....	59



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 5128/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Efeito da suplementação com dietas hiperlipídicas na performance reprodutiva de búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia Oriental", sob a responsabilidade da Profª Drª Gisele Zoccal Mingoti está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 01 de abril de 2015.

Jaboticabal, 01 de abril de 2015.

**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DIETAS HIPERLIPÍDICAS NA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) CRIADAS NA AMAZÔNIA ORIENTAL

**RESUMO** – O objetivo do experimento 1 foi avaliar o efeito da suplementação alimentar com torta de palmiste sobre a atividade ovariana, lipidemia e função hepática de búfalas submetidas à sincronização da ovulação, visando determinar o melhor percentual de torta de palmiste que pode ser oferecido na dieta. Foram utilizadas vinte e quatro búfalas da raça Murrah, com idade média de  $5,67 \pm 1,60$  anos e peso médio de  $684,17 \pm 62,82$  kg, cíclicas e não lactantes, divididas em quatro tratamentos de suplementação com torta de palmiste (0%; 0,25%; 0,50% e 1,00% do peso vivo). Todas as búfalas foram submetidas ao protocolo Ovsynch e foram avaliados os diâmetros do folículo pré-ovulatório, do corpo lúteo e do ovário ipsilateral nos dias D10 (fase folicular) e D17 (fase luteínica) após o início do protocolo de sincronização. O sangue foi colhido nesses mesmos dias para determinar as concentrações séricas de colesterol total e fração HDL, triglicerídeos, progesterona ( $P_4$ ) e das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT). A suplementação com torta de palmiste não influenciou o desenvolvimento folicular e luteal ( $P > 0,05$ ) e não incrementou as concentrações de  $P_4$  ( $P = 0,23$ ). As concentrações de colesterol total aumentaram nos animais suplementados com até 0,5% PV de torta de palmiste, independente da fase ( $P < 0,05$ ), mas esse efeito não foi observado na fração HDL do colesterol, que se manteve semelhante nas fases folicular (54,86 mg/dL;  $P = 0,08$ ) e luteínica (53,73 mg/dL;  $P = 0,47$ ) do ciclo estral. Nas concentrações de triglicérides, houve um efeito linear ( $P = 0,03$ ) dos tratamentos na fase folicular, porém, houve similaridade na fase luteínica (59,99 mg/dL;  $P = 0,51$ ). A suplementação não alterou a atividade da enzima ALT ( $P > 0,05$ ), mas as enzimas hepáticas AST e GGT tiveram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) nas duas fases avaliadas. No grupo suplementado com 1,0% PV as concentrações de AST e GGT foram acima do recomendado para a espécie. Conclui-se que a suplementação de búfalas com torta de palmiste aumenta as concentrações de colesterol e triglicerídeos, mas não influencia nas concentrações circulantes de progesterona e no desenvolvimento folicular e luteal. A avaliação das enzimas hepáticas permite recomendar o fornecimento de 0,5% PV de torta de palmiste para búfalas, com aumento nas concentrações séricas de colesterol, sem que haja disfunção hepática nos animais. O objetivo do experimento 2 foi avaliar o efeito da suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) na taxa de concepção de búfalas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e quantificar os níveis de progesterona e o perfil lipídico desses animais. Foram utilizadas búfalas leiteiras (*Bubalus bubalis*,  $n = 120$ ) da raça Murrah, com peso médio de  $452,27 \pm 6,55$  kg e ECC de  $3,41 \pm 0,05$ . Todas as búfalas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação e a partir do dia da IATF (D0) divididas em três tratamentos de suplementação com os concentrados (0,5% PV) durante 22 dias. Os tratamentos foram: grupo Controle: animais suplementados com concentrado padrão; grupo Soja: concentrado padrão acrescido de óleo de soja refinado e grupo Megalac: concentrado padrão acrescido de gordura protegida. Foram dosadas as concentrações séricas de colesterol total, HDL, triglicerídeos e progesterona ( $P_4$ ) nos dias D-12 (pré-tratamento) e D22 (pós-tratamento). O diagnóstico de prenhez foi realizado 30 dias após a IATF. Houve uma

elevação substancial de consumo de AGs insaturados para os grupos Soja e Megalac, na ordem de 174,43% e 198,47% respectivamente, em comparação ao grupo Controle. Após 22 dias de suplementação, as concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL e lipídios totais foram mais elevadas ( $P < 0,05$ ) nos grupos tratados Soja e Megalac em comparação ao grupo Controle, e as concentrações circulantes de P4 não diferiram estatisticamente entre os grupos Controle, Soja e Megalac, tanto para as fêmeas prenhas ( $18,09 \pm 2,06$  vs  $20,53 \pm 1,95$  vs  $18,76 \pm 1,36$ ;  $P = 0,6833$ , respectivamente) quanto para as não prenhas ( $4,15 \pm 1,06$  vs  $8,34 \pm 1,87$  vs  $6,09 \pm 1,51$ ;  $P = 0,2105$ , respectivamente). Os resultados da taxa de concepção aos 30 dias demonstram que houve diferença entre os grupos ( $P = 0,0130$ ) Soja, Controle e Megalac, onde as búfalas suplementadas com ração Controle e Megalac obtiveram uma maior taxa de concepção (33,3% e 30,8%, respectivamente) em relação ao grupo Soja (14,3%). As suplementações com concentrados adicionados de sais de cálcio de AGPI aumentaram as concentrações séricas de lipídios (colesterol total, HDL, LDL, lipídios totais), mas não desencadearam reflexos positivos nas concentrações circulantes de progesterona e nas taxas de concepção das búfalas.

**Palavras-chave:** AGPI, Búfalo, Colesterol, Gordura Protegida, Sincronização, Torta de Palmiste

## EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH HYPERLIPIDAL DIETS IN THE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF BUFFALO (*Bubalus bubalis*) CREATED IN THE EASTERN AMAZON

**ABSTRACT** – The objective of experiment 1 was to evaluate the effect of food supplementation with palm kernel cake on ovarian activity, lipidemia and hepatic function of buffaloes subjected to ovulation synchronization, aiming at determining the best percentage of palm kernel cake that can be offered in the diet. Twenty-four Murrah buffaloes, mean age of  $5.67 \pm 1.60$  years and mean weight of  $684.17 \pm 62.82$  kg, cyclic and non-lactating, were divided into four treatments of palm kernel cake supplementation (0%, 0.25%, 0.50% and 1.00% of live weight). All buffaloes were submitted to the Ovsynch protocol and the diameter of the preovulatory follicle, corpus luteum and ipsilateral ovary were evaluated at days D10 (follicular phase) and D17 (luteal phase) after the initiation of the synchronization protocol. Blood was collected on these same days to determine serum concentrations of total cholesterol and HDL, triglycerides, progesterone ( $P_4$ ) and alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyltransferase (GGT). Supplementation with palm kernel cake did not influence follicular and luteal development ( $P > 0.05$ ) and did not increase  $P_4$  concentrations ( $P = 0.23$ ). Concentrations of total cholesterol increased in animals supplemented with up to 0.5% PV of palm kernel cake, regardless of the phase ( $P < 0.05$ ), but this effect was not observed in the HDL cholesterol fraction, which remained similar in the follicular phase (54.86 mg/dL,  $P = 0.08$ ) and luteal phase (53.73 mg/dL,  $P = 0.47$ ) of the estrous cycle. In the triglyceride concentrations, there was a linear effect ( $P = 0.03$ ) of the treatments in the follicular phase, but there was similarity in the luteal phase (59.99 mg/dL;  $P = 0.51$ ). Supplementation did not alter ALT activity ( $P > 0.05$ ), but liver enzymes AST and GGT had a significant effect ( $P < 0.05$ ) in the two phases evaluated. In the group supplemented with 1.0% PV the concentrations of AST and GGT were above that recommended for the specie. It is concluded that supplementation of buffaloes with palm kernel cake increases cholesterol and triglyceride concentrations but does not influence circulating progesterone concentrations and follicular and luteal development. The evaluation of hepatic enzymes allows recommending the supplementation of 0.5% PV of palm kernel cake to buffaloes, with increase in serum cholesterol concentrations, without hepatic dysfunction in the animals. The objective of experiment 2 was to evaluate the effect of supplementation with calcium salts of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the conception rate of buffaloes submitted to artificial insemination at fixed time (FTAI) and to quantify progesterone levels and lipid profile of these animals. Milk buffaloes (*Bubalus bubalis*,  $n = 120$ ) of the Murrah breed were used, with a mean weight of  $452.27 \pm 6.55$  kg and BCS of  $3.41 \pm 0.05$ . All buffaloes were submitted to an ovulation synchronization protocol and from day FTAI (D0) divided into three supplementation treatments with the concentrates (0.5% PV) for 22 days. The treatments were: Control group: animals supplemented with standard concentrate; Soybean group: standard concentrate plus refined soybean oil and Megalac group: standard concentrate plus protected fat. The serum concentrations of total cholesterol, HDL, triglycerides and progesterone ( $P_4$ ) on days D-12 (pre-treatment) and D22 (post-treatment) were measured. The diagnosis of pregnancy was performed 30 days after the FTAI. There was a substantial increase in the

consumption of unsaturated AGs for the Soja and Megalac groups, in the order of 174.43% and 198.47%, respectively, compared to the Control group. After 22 days of supplementation, serum concentrations of total cholesterol, HDL, LDL and total lipids were higher ( $P < 0.05$ ) in the treated groups compared to the Control group, and the circulating concentrations of  $P_4$  did not differ statistically between the Control, Soybean and Megalac groups, both for pregnant females ( $18.09 \pm 2.06$  vs.  $20.53 \pm 1.95$  vs  $18.76 \pm 1.36$ ,  $P = 0.6833$ , respectively) and for non-pregnant ( $4.15 \pm 1.06$  vs  $8.34 \pm 1.87$  vs.  $6.09 \pm 1.51$ ,  $P = 0.2105$ , respectively). The results of the conception rate at 30 days show that there was a difference between the groups ( $P = 0.0130$ ) Soybean, Control and Megalac, where buffaloes supplemented with Control and Megalac rations obtained a higher conception rate (33.3% and 30.8%, respectively) in relation to the Soja group (14.3%). Supplements with added concentrates of PUFA calcium salts increased serum lipid concentrations (total cholesterol, HDL, LDL, total lipids), but did not trigger positive reflexes in circulating progesterone concentrations and buffalo conception rates.

**Keywords:** PUFA, Buffalo, Cholesterol, Protected Fat, Synchronization, Palm Kernel Cake

## LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2.....	
Tabela 1. Proporção da composição química da torta de palmiste, do farelo de trigo e da gramínea ( <i>Urochloa brizantha</i> cv. <i>Marandu</i> ), fornecidos às búfalas.....	23
Tabela 2. Proporção da composição em ácidos graxos da torta de palmiste...	24
Tabela 3. Medidas (média ± EPM) de ovários e estruturas ovarianas (folículos e corpos lúteos) durante as fases folicular (D10) e luteínica (D17) de búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste.....	28
Tabela 4. Valores de medidas (média ± EPM) dos metabólitos sanguíneos, durante as fases folicular (D10) e luteínica (D17), de búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste.....	30
CAPÍTULO 3.....	
Tabela 1. Composição química dos ingredientes utilizados na formulação dos concentrados Controle, Soja e Megalac, fornecidos às búfalas no experimento.....	48
Tabela 2. Proporção dos ingredientes e composição química dos concentrados Controle, Soja e Megalac, fornecidos às búfalas no experimento.....	49
Tabela 3. Composição em ácidos graxos dos concentrados Controle, Soja e Megalac, fornecidos às búfalas no experimento.....	50
Tabela 4. Consumo médio de matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT), proteína bruta (PB) e de ácidos graxos (AGs) das búfalas...	53
Tabela 5. Concentração de metabólitos sanguíneos (média ± EPM) em búfalas leiteiras, antes do arraçoamento (D-12) e 22 dias após início da suplementação (D22) com concentrados Controle, Soja e Megalac.....	54

## LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1.....	
Figura 1. Estrutura dos ácidos graxos linoleico e linolênico.....	4
CAPÍTULO 2.....	
Figura 1. Representação do delineamento experimental e aplicação de medicamentos no protocolo de sincronização da ovulação (Ovsynch), adotado no experimento.....	25
Figura 2. Concentrações séricas de colesterol total em búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste, nas fases folicular (A) e luteínica (B) do ciclo estral sincronizado.....	29
Figura 3. Concentrações séricas de triglicerídeos na fase folicular do ciclo estral sincronizado de búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste na dieta.....	30
Figura 4. Concentrações séricas das enzimas AST e GGT em búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste na dieta, nas fases folicular (respectivamente A e B) e luteínica (respectivamente C e D) do ciclo estral sincronizado.....	31
CAPÍTULO 3.....	
Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental e do protocolo de sincronização da ovulação.....	47
Figura 2. Médias para progesterona sérica (ng/mL) das búfalas prenhas e não prenhas, no dia 22 de suplementação alimentar com concentrados Controle, Soja e Megalac.....	55
Figura 3. Médias para taxa de concepção aos 30 dias das búfalas suplementadas com concentrados Controle, Soja e Megalac.....	55

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **Aspectos da bubalinocultura**

Os bubalinos possuem distribuição geográfica mundial, de um contingente de 199 milhões de cabeças, sendo 97% localizado na Ásia, com destaques para Índia (56,4%), Paquistão (18,4%) e China (11,9%)(FAO, 2016). Os bubalinos vêm sendo criados mundialmente em pequenas e médias propriedades, onde possui fundamental importância econômica e social, com desempenho favorável na produção de carne e leite (LOURENÇO JUNIOR & GARCIA, 2008).

Os búfalos são originários da região asiática e estão em praticamente todos os continentes. A introdução no Brasil ocorreu na Ilha de Marajó (1895) no estado do Pará, com animais provenientes da Itália, e de propriedade do criador Vicente Chermont de Miranda. As últimas importações foram da Índia (1962), de animais “puros” das raças Murrah e Jafarabadi, e se constituíram na base para os cruzamentos por absorção, e da Itália em 1989, e no final do século XX a importação de sêmen bubalino de origem italiana e búlgara (BERNARDES, 2007).

De tal forma que, atualmente, no Brasil encontra-se o maior rebanho de búfalos das Américas, provavelmente devido ao clima tropical da região ser semelhante aos seus países de origem, e assim, propiciar a adaptação ambiental. Sendo que a distribuição é bem heterogênea entre as cinco regiões do país, e ocorre da seguinte maneira: Norte – 906.867 (66,14%), Sudeste – 173.509 (12,66%), Nordeste – 130.059 (9,49%), Sul – 100.757 (7,35%) e Centro-Oeste – 59.749 (4,36%). Maior concentração deste rebanho ocorre na região Amazônica, uma região responsável por 74% do contingente nacional de 1.370.941 búfalos (IBGE, 2016).

Os búfalos domésticos são da espécie *Bubalus bubalis* e pertencem à classe Mammalia, subclasse Ungulata, ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, família Bovidae, subfamília Bovinae, e inclui duas subespécies conhecidas como tipos de rio (*Bubalis*: Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi) e pântano (*Kerebau*: Carabao), de tal forma que, no Brasil são encontradas todas as quatro raças de búfalo doméstico (BERNARDES, 2007; LOURENÇO JUNIOR & GARCIA, 2008). São animais extremamente rústicos, pela capacidade de digerir forragens com alto teor de fibra

bruta e grande capacidade de adaptação, podendo sobreviver em diversos ambientes, com grandes variações de clima, relevo e vegetação, e são explorados para a produção de carne, leite, tração animal e esterco (SANTOS *et al.*, 2016).

Os búfalos podem ser criados em sistemas produtivos que possibilitam excelente desempenho, com produção de animais precoces, e que atingem 450kg em menos de dois anos de idade, além de efeitos positivos no desenvolvimento ponderal e na reprodução das fêmeas (LOURENÇO JUNIOR & GARCIA, 2008). A produtividade pode ser incrementada pela intensificação dos sistemas de produção, como pelo uso da tecnologia de pastejo rotacionado intensivo, inclusive com reflexos positivos na redução do desmatamento e preservação da floresta nativa (LOURENÇO JUNIOR & GARCIA, 2008).

Todavia, apesar da favorável adaptação às condições brasileiras e grande produtividade (NOGUEIRA *et al.*, 1989), os bubalinos ainda apresentam eficiência reprodutiva inferior aos bovinos, devido principalmente à puberdade retardada e prolongados intervalos entre partos (ZICARELLI, 2010), o que provavelmente está relacionado com manejo deficiente e/ou seleção genética inadequada (VALE, 2000), além de interações entre o genótipo e o meio ambiente (ROLIM FILHO *et al.*, 2011).

### **Influência da suplementação lipídica na reprodução**

A baixa eficiência reprodutiva causa redução de rentabilidade na pecuária, em especial devido à fase de balanço energético negativo (BEN), que ocorre nas últimas semanas de gestação e no início da lactação, quando o gasto energético para a produção de colostro, leite e manutenção do animal está mais elevado que a energia fornecida pela ingestão de matéria seca na alimentação (SARTORI & MOLLO, 2007). Fêmeas em BEN apresentam elevadas concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e baixas concentrações de glicose, insulina e IGF-I, e este quadro ocasiona efeitos negativos na função ovariana e fertilidade (SARTORI & MOLLO, 2007), com retardo na primeira ovulação e concepção pós-parto (WILTBANK *et al.*, 2006).

Como estratégia para aumento do desempenho reprodutivo, e considerando a influência da nutrição, mais precisamente do conteúdo energético, tem sido adotado

o uso de gorduras na suplementação de fêmeas bovinas (FUNSTON, 2004; THATCHER *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2009; 2011) e bubalinas (MALIK *et al.*, 2011; NAZIR *et al.*, 2013), como forma de contribuir para a longevidade produtiva dos animais, e consequente aumento da rentabilidade do produtor.

A ingestão de ácidos graxos por ruminantes está limitada a percentuais baixos, na ordem de 1 a 4% da dieta, sob a forma de fosfolipídios e glicolipídios nas forragens, e de triglicerídeos nos grãos (VAN SOEST, 1994; SANTOS, 1998). Fontes concentradas de energia como gorduras, sementes de oleaginosas e óleos vegetais, têm sido utilizadas na alimentação de ruminantes, com o intuito de elevar a densidade energética e melhorar o desempenho de vacas leiteiras e de corte (SANTOS, 1998; STAPLES *et al.*, 1998), sem comprometer a ingestão de fibras e nem exceder a inclusão de carboidratos na dieta (SALLA *et al.*, 2003). Com a suplementação lipídica, é possível incrementar este nível de gordura na dieta de ruminantes e chegar até 5% em relação à ingestão de matéria seca (IMS).

Níveis superiores ao patamar de 5% da IMS causam revestimento físico da ingesta contra a ação dos microrganismos ruminais, com redução da digestibilidade da fibra, prejuízos no consumo de matéria seca e no desempenho animal, além de possibilitar alterações na fisiologia ruminal, por causar danos aos microrganismos celulolíticos presentes no rúmen (DIAS *et al.*, 2009).

No ambiente ruminal, as diferentes fontes de gordura interagem com a população microbiana, ocasionando mudanças no padrão de crescimento e função da microbiota, além de transformações nos lipídios ingeridos na dieta, com conversão por hidrólise e biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados em saturados, os quais eventualmente alcançam os tecidos do corpo (JENKINS, 2011). Juchem (2007) demonstrou que o processo de biohidrogenação pode alterar o perfil lipídico dos óleos fornecidos na suplementação de vacas leiteiras, de tal forma que, mais de 70% do ácido linoléico e mais de 85% do ácido linolênico são biohidrogenados no rúmen.

No caso de sementes de oleaginosas na forma de grão inteiro, ocorre uma maior proteção da fração óleo, o que reduz a possibilidade de biohidrogenação ruminal (CAVALIERI *et al.*, 2005). Outra possibilidade é o uso de gordura *by-pass*, protegida ou inerte, que permite o incremento na densidade energética da dieta, sem

impactos negativos sobre a fermentação ruminal e o consumo de forragem, com a passagem de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) pelo rúmen sem sofrer biohidrogenação, sendo absorvidos somente nas condições ácidas do abomaso (JENKINS & PALMQUIST, 1984).

Tais suplementos tem proporcionado aumento na eficiência produtiva, principalmente na produção de leite, devido a uma combinação de efeitos calóricos e não calóricos (JENKINS, 2011). A suplementação lipídica em bovinos aumenta a capacidade funcional dos ovários, prolonga a vida útil do corpo lúteo e aumenta as concentrações plasmáticas de progesterona, o que reflete positivamente no desenvolvimento da competência (STAPLES *et al.*, 1998) e qualidade embrionária (CERRI *et al.*, 2009).

Na suplementação com gordura, outro fator relevante é o perfil de ácidos graxos (AGs) da dieta, o qual direciona o perfil de AGs dos tecidos e pode influenciar no desempenho reprodutivo (FUNSTON, 2004; RAES *et al.*, 2004). A fração de óleo das forragens e de vários grãos, embora geralmente baixa, possui proporções significativas de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), em particular os ácidos linoleico (C18:2; n6;  $\omega$ 6) e linolênico (C18:3; n3;  $\omega$ 3) (Figura 1), os quais são ácidos graxos que não podem ser sintetizados pelos animais e seres humanos, e portanto essenciais na dieta (MATTOS *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2009).

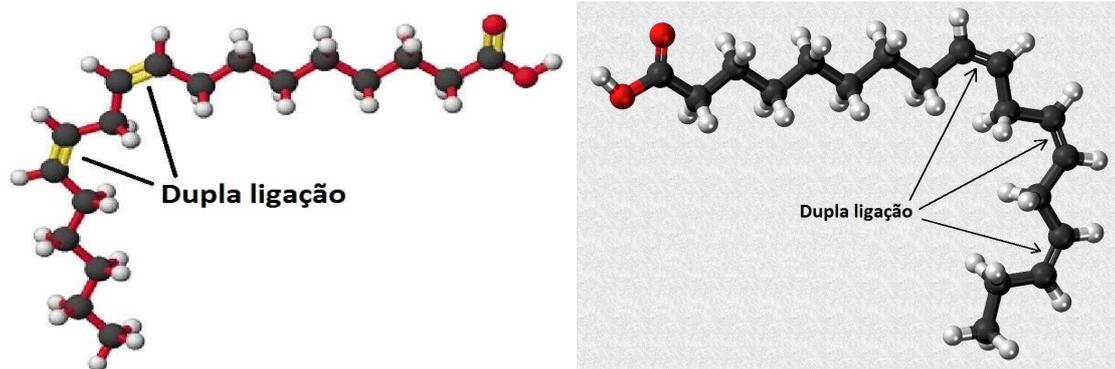


Figura 1. Estrutura dos ácidos graxos linoleico e linolênico respectivamente, destaque para as duplas ligações demonstradas pelas setas.

Adaptado de <https://pixabay.com/pt/ácido-alfa-linolênico-ácido-graxo-872688/>  
<https://i0.wp.com/malnutridos.com/wp-content/uploads/2016/10/linoleico2.png>

## Utilização da torta de palmiste na suplementação de ruminantes

Apesar dos benefícios de uma nutrição adequada, a alimentação representa um custo elevado na pecuária, principalmente quando são usados cereais de alto valor nutricional. Em condições tropicais, existem espécies arbóreas cultivadas comercialmente, que no processo de extração de seus óleos, disponibilizam significativas quantidades de subprodutos agroindustriais.

Estes subprodutos têm menor valor agregado e, portanto, motivam pesquisas quanto às qualidades químicas e utilização na dieta alimentar de ruminantes (RODRIGUES FILHO *et al.*, 1999), como forma de baratear custos, melhorar os índices zootécnicos e minimizar os efeitos da sazonalidade produtiva dos ruminantes. Sendo assim, a inclusão de subprodutos na alimentação de ruminantes é economicamente justificável, devido a qualidade nutricional e preço competitivo em relação aos concentrados convencionais (COSTA *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2012).

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é da família das Palmáceas, de origem africana, cultivada em vários países de clima tropical, sem sazonalidade e com alta produção, de cerca de 1,486 milhões de toneladas de cachos no Estado do Pará (IBGE, 2016). A produtividade da cultura do dendê é maior do que a soja (3.500 a 6.000 kg/ha vs 400 a 600 kg/ha), assim como o seu rendimento em grãos (Kg/ha) que pode ser oito vezes maior (SUFRAMA, 2003).

Dos frutos do dendezeiro são extraídos dois tipos de óleo: o de palma, retirado da polpa ou mesocarpo e o de palmiste, obtido da amêndoa ou endosperma. O beneficiamento da produção inicia logo após a colheita, e consta das etapas de: esterilização, debulha, digestão e prensagem mecânica, de maneira natural e sem o uso de substâncias químicas, extraindo da polpa do fruto o óleo de palma ou óleo de dendê (SUFRAMA, 2003). Esta gordura de palma é popular nas culinárias africana e brasileira, além de amplamente usada na indústria de alimentos, em frituras, massas de biscoito e sorvetes.

Da cultura do dendê obtêm-se 22% de óleo da polpa, 2% de óleo de palmiste e 3% de torta de palmiste do peso total do cacho (COSTA *et al.*, 2011; SUFRAMA, 2003). O óleo de palmiste é extraído da amêndoa interna da semente, e a torta de amêndoa de dendê ou torta de palmiste é o subproduto resultante da polpa seca,

sendo o resíduo agroindustrial mais abundante na região Amazônica (RODRIGUES FILHO *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 2011).

Além disso, a torta de palmiste possui teores de proteína bruta (PB; 14%), digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DVMO; 60%) e extrato etéreo (EE; 11,98%) que favorecem o uso deste subproduto na alimentação animal (RODRIGUES FILHO *et al.*, 2001). A torta de palmiste possui características favoráveis, tais como: potencial nutritivo, ausência de fatores antinutricionais, disponibilidade durante o ano e baixo custo, que possibilitam o uso na alimentação de bubalinos em proporções de até 60% de substituição do volumoso (BARBOSA, 2010). O elevado percentual lipídico da torta de palmiste justifica o uso na suplementação animal, para a elevação do teor energético da dieta, uma estratégia utilizada para aumento de desempenho produtivo e reprodutivo.

### **Suplementação de AGPI em ruminantes e os reflexos na reprodução**

Ácidos graxos poliinsaturados são constituintes essenciais das membranas celulares, inclusive do sistema reprodutivo, e a proporção nos diferentes tecidos é um reflexo dos lipídios ingeridos na dieta (WATHES *et al.*, 2007), de tal forma que esse fornecimento de ácidos graxos poliinsaturados pode modificar algumas vias específicas e influenciar o metabolismo de alguns hormônios, causando alterações metabólicas e endócrinas, que resultam em mudanças na atividade uterina e ovariana (LUCY *et al.*, 1991; DIAS *et al.*, 2009; MATTOS *et al.*, 2000).

A inclusão dietética de ácidos graxos, além de aumentar o coeficiente energético da dieta, estimula a síntese e o acúmulo de colesterol e ésteres de colesterol nos tecidos e fluidos corporais, inclusive nos ovários (NOGUEIRA, 2008) e corpo lúteo (HAWKINS *et al.*, 1995). Altas concentrações séricas de colesterol promovem uma maior concentração de progesterona (P<sub>4</sub>) plasmática (HAWKINS *et al.*, 1995; STRONGE *et al.*, 2005; DEMETRIO *et al.*, 2007).

Este aumento nas concentrações de progesterona deve-se ao aumento na síntese deste hormônio (GRUMMER & CARROLL, 1991) e diminuição do metabolismo hepático (HAWKINS *et al.*, 1995), com reflexos positivos no desenvolvimento da competência embrionária (MCNAMARA *et al.*, 2003). Fator este

importante em búfalas, onde uma das principais causas de mortalidade embrionária precoce é a produção insuficiente de progesterona (CAMPANILE *et al.*, 2005; 2007).

Os ácidos graxos polinsaturados podem afetar características do ciclo estral de fêmeas de corte e leite, com alterações na duração do ciclo, padrão de ondas foliculares, dimensão das estruturas ovarianas, concentrações circulantes de hormônios esteróides (SARTORI & MOLLO, 2007; GREGORY *et al.*, 2009), tempo de luteólise e o número e tamanho dos folículos (WATHES *et al.*, 2007) e produção de prostaglandinas (SARTORI & GUARDIEIRO, 2010).

Dietas ricas em AGPI, principalmente os ácidos linoléico (C18:2; n6; ω6) e linolênico (C18:3; n3; ω3), inibem a secreção precoce de prostaglandinas – PGs, em especial de PGF2α, com resultados bastante significativos na inibição da síntese de PGF2α endometrial bovina (MATTOS *et al.*, 2002; AMBROSE *et al.*, 2006), e consequente retardamento da luteólise (WILLIAMS & STANKO, 2000), sendo importante manter o equilíbrio entre a luteólise e mecanismos anti-luteolíticos para obter bons resultados nas taxas de concepção em sistemas de criação de bovinos (BINELLI *et al.*, 2001) e bubalinos (NAZIR *et al.*, 2013).

Os ácidos linoléico, que é convertido em ácido araquidônico, um precursor das prostaglandinas dienoicas (ex. PGF2α), e linolênico, que é convertido em ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n-3) precursor das prostaglandinas trienoicas (ex. PGF3α), são descritos como os ácidos graxos que afetam a fertilidade em bovinos (SARTORI & GUARDIEIRO, 2010) e bubalinos (NAZIR *et al.*, 2013).

O ácido linoleico e os AGPI de cadeia longa, EPA e docosa-hexaenoico (DHA; C22:6n-3), também agem como inibidores competitivos pela enzima prostaglandina endoperóxido sintases (PGHS), dentro do processo de síntese das prostaglandinas (THATCHER *et al.*, 2004), e interferem na conversão do ácido araquidônico a PGF2α (BINELLI *et al.*, 2001).

Por outro lado, vários trabalhos têm sido realizados para melhor entender e controlar o ciclo estral, a dinâmica folicular ovariana e maximizar os resultados reprodutivos em bovinos (PURSLEY *et al.*, 1995) e bubalinos (BARUSELLI, 1992; BARUSELLI *et al.*, 2001; NEGLIA *et al.*, 2003; BARUSELLI & CARVALHO, 2005; DE RENSIS *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2008; GHUMAN *et al.*, 2012).

Os protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), apesar de

serem uma alternativa potencial para o aumento do desempenho reprodutivo em búfalos (BARUSELLI & CARVALHO, 2005), possuem ainda resultados bastante variáveis com relação à taxa de concepção em bubalinos (GHUMAN *et al.*, 2012), sendo necessário desenvolver medidas para melhorar estes índices reprodutivos.

Fator relevante neste contexto é a mortalidade embrionária precoce resultante da síntese  $\text{PGF2}\alpha$ , devido à ausência de fatores inibidores, acarretando em degeneração do corpo lúteo e perda gestacional, principalmente em rebanhos de búfalos leiteiros (MALIK *et al.*, 2011). Estratégias de suplementação dietética com ácidos graxos  $\omega 3$  ou  $\omega 6$ , são capazes de diminuir a síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  pelo endométrio (AMBROSE *et al.*, 2006) e inibir a ação luteolítica, favorecendo o reconhecimento de embriões bovinos ainda incapazes de sinalizar para o organismo materno (BURNS *et al.*, 2003), com a possibilidade de aumento das taxas de concepção das búfalas.

O efeito inibitório na síntese de PGs, na fase lútea tardia em vacas, pode reduzir a incidência de perda embrionária precoce, com aumento nas taxas de concepção (THATCHER *et al.*, 1994; MATTOS *et al.*, 2000; AMBROSE *et al.*, 2006), devido ao aumento no reconhecimento materno da gravidez (WATHES *et al.*, 2007). Acredita-se que conceptos bovinos pequenos e subdesenvolvidos são incapazes de sinalizar e desencadear o reconhecimento materno da gestação, por meio da produção de interferon-tau (IFN- $\tau$ ) entre os dias 13 e 21 após a ovulação, para que ocorra o bloqueio na liberação uterina de  $\text{PGF2}\alpha$  e, assim, permitir a continuidade da secreção de progesterona pelo corpo lúteo e manutenção da gestação (BURNS *et al.*, 2003; SENGER, 2012).

O reconhecimento da gestação é o período em que o conceito sinaliza sua presença no ambiente uterino materno, sendo imprescindível para evitar a secreção luteolítica de  $\text{PGF2}\alpha$ , manutenção do CL e da gestação (SENGER, 2012). Em ruminantes, este período requer o alongamento do embrião, que coincide com a máxima produção de interferon-tau (ANTONIAZZI *et al.*, 2011).

O IFN- $\tau$  é um interferon do tipo I, secretado pelas células trofoblásticas do blastocisto, embrião e anexos embrionários antes da implantação, que age nas células endometriais do útero para inibir a produção de receptores de oxitocina e, desta forma, evitar a síntese e liberação uterina de  $\text{PGF2}\alpha$ , preservando o corpo

lúteo e a gestação, além de promover a síntese de proteínas pelas glândulas uterinas da porção apical, fundamentais para a sobrevivência embrionária antes da sua implantação no endométrio uterino (SENGER, 2012). A falência funcional e estrutural do corpo lúteo ocorre somente em casos de ausência de fertilização ou de não reconhecimento materno da gestação, com liberação de pulsos de PGF2 $\alpha$  pelas células endometriais entre o 15<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dia do ciclo estral (BERTAN, 2004).

A suplementação de vacas com AGPI ricos em linoléico (C18:2,  $\omega$ 6), durante o tempo esperado de luteólise, promove resultados positivos em vacas submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo - IATF (LOPES *et al.*, 2009; 2011) e transferência de embriões em tempo fixo - TETF (CORDEIRO *et al.*, 2015). Também em bovinos, o ácido linolênico (C18:3,  $\omega$ 3) mostrou capacidade em elevar as concentrações de estradiol (E<sub>2</sub>) plasmático (ROBINSON *et al.*, 2002).

Resultados descritos por Cordeiro *et al.* (2015), apontam que a suplementação de vacas de corte com sementes de girassol (EE 10,1%; rico em  $\omega$ 6) é uma alternativa viável, pois aumentam: as concentrações séricas de colesterol (148,2  $\pm$  6,1 mg/dL vs 116,0  $\pm$  6,4 mg/dL) e a taxa de prenhez (66,7% vs 47,7%), com resultados favoráveis também na TETF, com aumento das concentrações de progesterona (5,8  $\pm$  0,4 ng/mL vs 3,5  $\pm$  0,4 ng/mL) e da taxa de prenhez no grupo girassol (55,7% vs 36,9%) em comparação ao grupo controle, nos dois experimentos.

Na suplementação de búfalas leiteiras com linhaça (59,4%  $\omega$ 3), foram evidenciados impactos positivos no desempenho reprodutivo, com elevação das concentrações de progesterona plasmática e redução da secreção uterina de PGF2 $\alpha$ , durante o período de reconhecimento da gestação, com consequente incremento de 35,5% na taxa de concepção (NAZIR *et al.*, 2013).

Fato semelhante ocorre na suplementação de búfalas leiteiras com farinha de peixe, que possui AGPI da família n-3, ácido eicosapentaenóico (EPA, C20; 5) e ácido docosahexanóico (DHA, C22; 6), com diferença significativa nas concentrações venosas de 13,14-di-hidro-15-ceto-PGF2 $\alpha$  (PGFM), entre o grupo suplementado e o controle (197,4  $\pm$  41,7 pg/ml vs 326,3  $\pm$  33,5 pg/ml), respectivamente, mas sem afetar o diâmetro do corpo lúteo e as concentrações de progesterona (MALIK *et al.*, 2011).

## Referências

- [1] AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A.; ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in  $\alpha$ -linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.8, p.3066–3074, 2006.
- [2] ANTONIAZZI, A.Q.; HENKES, L.E.; OLIVEIRA, J.F.C.; HANSEN, T.R. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p.176-185, 2011.
- [3] BARBOSA, N. G. S. Torta de amêndoa de dendê: consumo, digestibilidade, metabolismo ruminal e desempenho leiteiro em bubalinos. 2010. 176 p. **Tese** (doutorado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Minas Gerais. 2010.
- [4] BARUSELLI, P. S. Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (*Bubalus bubalis*). 1992. 99 f. **Tese** (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1992.
- [5] BARUSELLI, P.S.; AMARAL, R.; BARUFI, F.B.; VALENTIM, R.; MARQUES, M. de O. Lecirelin and buserelin (gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 142-145, 2001.
- [6] BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N. A. T. de. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.1, p. 4-17, 2005.
- [7] BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p. 293-298, 2007.
- [8] BERTAN, C.M. Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  no endométrio de fêmeas bovinas. 2004. 185f. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- [9] BINELLI, M., THATCHER, W.W., MATTOS, R., BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451–1463, 2001.
- [10] BURNS, P.D.; ENGLE, T.E.; HARRIS, M.A.; ENNS, R.M.; WHITTIER, J.C. Effect of fish meal supplementation on plasma and endometrial fatty acid composition in nonlactating beef cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2840–2846, 2003.

- [11] CAMPANILE, G., NEGLIA, G., GASPARRINI, B., GALERO, G., PRANDI, A., DI PALO, R., D'OCCHIO, M.J., ZICARELLI, L. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. **Theriogenology**, v.63, p.2334–2340, 2005.
- [12] CAMPANILE, G., VECCHIO, D., ZICARELLI, L., NEGLIA, G.; DI PALO, R., BALESTRIERI, A., D'OCCHIO, M.J. Strategies to reduce embryonic mortality in buffalo cows. **Italian Journal of Animal Science**, v.6, p.680-683, 2007.
- [13] CAVALIERI, F.B.; SANTOS, G.T.; MATSUSHITA, M.; PETIT, H.V.; RIGOLON, L. P.; SILVA, D.; *et al.* Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100 ® or whole flaxseed. **Canadian Journal of Animal Science**, v.85, p.413-416, 2005.
- [14] CERRI, R.L.; JUCHEM, S.O.; CHEBEL, R.C.; RUTIGLIANO, H.M.; BRUNO, R.G.; GALVÃO, K.N.; *et al.* Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1520-1531, 2009.
- [15] CORDEIRO, M. B.; PERES, M. S.; SOUZA, J. M. de; GASPAR, P.; BARBIERI, F.; SÁ FILHO, M. F.; MATURANA FILHO, M.; DINARDI, R. N.; NOGUEIRA, G. P.; MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; MARTINS, T.; BINELLI, M.; MEMBRIVE, C.M.B. Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. **Theriogenology**, v.83, p.1461-1468, 2015.
- [16] COSTA, D.A. da; COLODO, J.C.N.; FERREIRA, G.D.G.; ARAÚJO, C.V. de; MOREIRA, G.R. Uso da torta de dendê na alimentação de ruminantes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.14, p.133-137, 2011.
- [17] DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.5073-5082, 2007.
- [18] DE RENSIS, F.; RONCI, G.; GUARNERI, P.; NGUYEN, B.X.; PRESICCE, G.A.; HUSZENICZA, G.; SCARAMUZZI, R.J. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.63, p.1824–1831, 2005.
- [19] DIAS, J.C.; MARTINS, J.A.M.; EMERICK, L.L.; SOUZA, F.A.; ANDRADE, V.J. Efeitos da suplementação lipídica no aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p. 95-104, 2009.

- [20] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>; 2016 [acessado 27 janeiro 2018].
- [21] FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v.82(Suppl.), p.154-161, 2004.
- [22] GARCIA, A.R.; NAHÚM, B. de S.; LOURENÇO JUNIOR, J. de B.; COSTA, N. A. da; GONÇALVES, K. da S.; MIYASAKI, M. Y. A.; ANDRADE, A. F. C. de; ARRUDA, R. P. de. Associação da medroxiprogesterona ao protocolo Ovsynch para inseminação artificial em tempo fixo de búfalas cíclicas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia Oriental. **Acta Amazonica** (Impresso), v. 38, p. 369-377, 2008.
- [23] GHUMAN, S.P.S., HONPARKHE, M., SINGH, J., DHAMI, D.S., KUMAR, A., NAZIR, G., AHUJA, C.S. Fertility response using three estrus synchronization regimens in lactating anestrus buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v.82, p.162–166, 2012.
- [24] GREGORY, R.M.; CARDONA, J.C.A.; PATIN OSPINA, H.; HERNANDEZ RAMIREZ, M.; MATTOS, R.C.; JOBIM, M.I.M. Ácidos graxos poliinsaturados e seus efeitos no desempenho reprodutivo da vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, p.153-156, 2009.
- [25] GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3838-3852, 1991.
- [26] HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G. M.; MOELLER, C.L.; ODDE, K.G.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G. D. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, v.73, p. 541-545, 1995.
- [27] HUANG, Y.; SCHOONMAKER, J.P.; OREN, S.L.; TRENKLE, A.; BEITZ, D.C. Calcium salts of CLA improve availability of dietary CLA. **Livestock Science**, v.122, n.1, p.1-7, 2009.
- [28] IBGE. Produção Agrícola Municipal, <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?edicao=16787&t=resultados>; 2016 [acessado 08 novembro 2017].
- [29] IBGE. Produção da Pecuária Municipal, <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?&t=resultados/>; 2016 [acessado 08 novembro 2017].

- [30] JENKINS, T.C. **Feed Ingredients/Feed Supplements: Fats and Protected Fats**. In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, edited by John W. Fuquay, Academic Press, San Diego, 2011, Pag.363-370.
- [31] JENKINS, T.C.; PALMQUIST, D.L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.978-986, 1984.
- [32] JUCHEM, S. O. Lipid Digestion and Metabolism in dairy cows: effects on production, reproduction and health. 2007. **Phd thesis**, University of California Davis, 2007.
- [33] LOPES, C.N.; SCARPA, A.B.; CAPPELLOZZA, B.I.; COOKE, R.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3935-3943, 2009.
- [34] LOPES, C.N.; COOKE, R.F.; REIS, M.M.; PERES, R.F.G.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategic supplementation of calcium salts of polyunsaturated fatty acids to enhance reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.89, p.3116-3124, 2011.
- [35] LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. Panorama da Bubalinocultura na Amazônia. In: Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia, 2008, Belém. **Anais do Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia**. Fortaleza-CE: Instituto Frutal, 2008. p. 1-45.
- [36] LUCY, M.C.; STAPLES, C.R.; MICHEL, F.M.; THATCHER, W.W.; BOLT, D.J. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F<sub>2</sub>α, luteinizing hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.483-489, 1991.
- [37] MACIEL, R.P.; NEIVA, J.N.M.; ARAUJO, V.L. de; CUNHA, O.F.R.; PAIVA, J.; RESTLE, J.; MENDES, C.Q.; LOBO, R.N.B. Consumo, digestibilidade e desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com dietas contendo torta de dendê. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.3, p.698-706, 2012.
- [38] MALIK, A.A.; GANDOTRA, V. K.; BRAR, P.S.; GHUMAN, S.P.S.; DHALIWAL, G.S. Attenuation of luteolytic response following fish meal supplementation in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*), **Animal Reproduction Science**, v.126, n.1–2, p.45-49, 2011.
- [39] MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.38–45, 2000.

- [40] MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; WILLIAMS, J.; AMOROCHO, A.; MCGUIRE, M.A.; THATCHER, W.W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. **Journal Dairy Science**, v.85, p.755–764, 2002.
- [41] MCNAMARA, S.; BUTLER, T.; RYAN, D.P.; MEE, J.F.; DILLON, P.; O'MARA, F.P.; BUTLER, S.T.; ANGLESEY, D.; RATH, M.; MURPHY, J.J. Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Holstein–Friesian cows, **Animal Reproduction Science**, v.79, n.1–2, p.45-56, 2003.
- [42] NAZIR, G.; GHUMAN, S.P.S.; SINGH, J.; HONPARKHE, M.; AHUJA, C.S.; DHALIWAL, G.S.; SANGHA, M.K.; SAIJPAUL, S.; AGARWAL, S.K. Improvement of conception rate in postpartum flaxseed supplemented buffalo with Ovsynch + CIDR protocol. **Animal Reproduction Science**, v.137, n.1-2, p.15-22, 2013.
- [43] NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R.; DE ROSA, C.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Comparison of pregnancy rates with two oestrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. **Theriogenology**, v.60, p.125–133, 2003.
- [44] NOGUEIRA, E. Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção in vitro de embriões em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). 2008. 87f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.
- [45] NOGUEIRA, J.R.; BARBOSA, C.; MATTOS, J.C.A.; CAMPOS, B.E.S.; CAPELLOZA, C.N.Z. Aspectos da eficiência reprodutiva de bualinos das raças Mediterâneo e Jafarabadi. **Boletim de Indústria Animal**, v. 46, p. 45-54, 1989.
- [46] PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915–923, 1995.
- [47] RAES, K.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.113, p.199-221, 2004.
- [48] ROBINSON, R.S.; PUSHPAKUMARA, P.G.A.; CHENG, Z. et al. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.124, p.119-131, 2002.
- [49] RODRIGUES FILHO, J. A.; CAMARÃO, A. P.; LOURENÇO JUNIOR, J.B. **Avaliação de subprodutos agroindustriais para alimentação de ruminantes**. Belém, PA: Embrapa-CPATU, 1993. 15 p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 71).

- [50] RODRIGUES FILHO, J. A.; CAMARÃO, A. P.; AZEVEDO, G.P.C.; BRAGA, E. **Efeito da proporção de casca de semente na composição química da torta de amêndoa de dendê**. Belém: Embrapa-CPATU, 1999. 4p. (Embrapa-CPATU. Comunicado Técnico, 1).
- [51] RODRIGUES FILHO, J.A.; CAMARÃO, A.P.; AZEVEDO, G.P.C. **Utilização da torta de amêndoa de dendê na alimentação de ruminantes**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001 24p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 111).
- [52] SALLA, L.E.; FISCHER, V.; FERREIRA, E.X.; MORENO, C.B.; STUMPF-JR, W.; DUARTE, L.D. Comportamento ingestivo de vacas Jersey alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de gordura nos primeiros 100 dias de lactação. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.32, p.683-689, 2003.
- [53] SANTOS, C. L. R. dos; SANTOS JUNIOR, J. B. dos; CUNHA, M. C. da; NUNES, S. R. F.; BEZERRA, D. C.; TORRES JUNIOR, J. R. de S.; CHAVES, N. P. Nível tecnológico e organizacional da cadeia produtiva da bubalinocultura de corte no estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, 1-8, 2016.
- [54] SANTOS, J.E.P. Efeitos da nutrição na reprodução bovina. In: Congresso Brasileiro de Raças Zebuínas, 3, 1998, Uberaba, MG. **Anais...** Uberaba: ABCZ, 1998. p.24-75.
- [55] SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.39, p.422-432, 2010.
- [56] SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.197-204, 2007.
- [57] SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy & parturition**. Illinois: Current Conceptions Inc., 2012. p. 280-281.
- [58] SUFRAMA. Potencialidades - Estudo de Viabilidade Econômica – Dendê. [http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj\\_pot\\_regionais/dende.pdf](http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/dende.pdf); 2003 [acessado 08 novembro 2017].
- [59] ROLIM FILHO, S.T.; RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W.G.; PICANÇO, N. da S.; BARBOSA, E.M.; FERREIRA, R.N.; SIMÕES, A.R. Involução uterina, atividade ovariana, primeiro cio pós-parto e distúrbios reprodutivos em búfalas **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, p. 221 -227, 2011.
- [60] STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.856–871, 1998.

- [61] STRONGE, A. J. H.; SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MEE, J. F.; KENNY, D. A.; MORRIS, D. G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v.64, p.1212-1224, 2005.
- [62] THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; DANET-DESNOYERS, G.; OLDICK, B.; SCHMITT, E.P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v.72 (Suppl. 3), p.16–30, 1994.
- [63] THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; MACLAREN, L; BILBY, T.R. Efeitos biológicos dos lipídios em parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras em lactação. In: Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, 8, 2004, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia: Conapec Jr; Botucatu: UNESP, 2004. p.115-132.
- [64] VALE, W.G. Enhancing the puberty in buffalo heifers. In: International congress on animal reproduction, 14., 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm: ICAR, 2000. v. 1, p. 271.
- [65] VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- [66] WATHES, D. C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77,p.190-201, 2007.
- [67] WILLIAMS, G. L.; STANKO, R. L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.77 (E. Suppl.), p.1-12, 2000.
- [68] WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v.65, p.17-29, 2006.
- [69] ZICARELLI, L. Enhancing reproductive performance in domestic dairy water buffalo (*Bubalus bubalis*). **The journal of the society for reproduction and fertility**, v.67, p.443–455, 2010.

**CAPÍTULO 2 – Efeito da suplementação alimentar com torta de palmiste sobre as concentrações circulantes de progesterona, parâmetros metabólicos e hepáticos e função ovariana em búfalas (*Bubalus bubalis*)**

Benjamim de Souza Nahúm<sup>a,b,\*</sup>, Naiara Zoccal Saraiva<sup>b</sup>, Cristian Faturi<sup>c</sup>, André Guimarães Maciel e Silva<sup>d</sup>, José de Brito Lourenço Junior<sup>d</sup>, José Silva de Sousa<sup>d</sup>, João Maria do Amaral Júnior<sup>e</sup>, Guilherme de Paula Nogueira<sup>f</sup>, Gisele Zoccal Mingoti<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil

<sup>b</sup> Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil

<sup>c</sup> Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil

<sup>d</sup> Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil

<sup>e</sup> Instituto Federal do Amapá (IFAP), Porto Grande, Amapá, Brasil

<sup>f</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brasil

\* Autor correspondente. Tel.:+55 91 991122646. Endereço de e-mail: benjamim.nahum@embrapa.br (B. de S. Nahum).

Endereços de e-mail: naiara.saraiva@embrapa.br (N.Z. Saraiva), cristian.faturi@ufra.edu.br (C. Faturi), andregms@ufpa.br (A.G.M. e Silva), amaralveterinario@gmail.com (J.M. do Amaral Júnior), joselourencojr@yahoo.com.br (J. de B. Lourenço Junior), jss@ufpa.br (J.S. de Sousa), gpn@fmva.unesp.br (G. de P. Nogueira), gmingoti@fmva.unesp.br (G.Z. Mingoti).

**RESUMO** – O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação alimentar com torta de palmiste sobre a atividade ovariana, lipidemia e função hepática de búfalas submetidas à sincronização da ovulação, visando determinar o melhor percentual de torta de palmiste que pode ser oferecido na dieta. Foram utilizadas vinte e quatro búfalas da raça Murrah, com idade média de  $5,67 \pm 1,60$  anos e peso médio de  $684,17 \pm 62,82$  kg, cíclicas e não lactantes, divididas em quatro tratamentos de suplementação com torta de palmiste (0%; 0,25%; 0,50% e 1,00% do peso vivo). Todas as búfalas foram submetidas ao protocolo Ovsynch e foram avaliados os diâmetros do folículo pré-ovulatório, do corpo lúteo e do ovário ipsilateral nos dias D10 (fase folicular) e D17 (fase luteínica) após o início do protocolo de sincronização. O sangue foi colhido nesses mesmos dias para determinar as concentrações séricas de colesterol total e fração HDL, triglicerídeos, progesterona ( $P_4$ ) e das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT). A suplementação com torta de palmiste não influenciou o desenvolvimento folicular e luteal ( $P > 0,05$ ) e não incrementou as concentrações de  $P_4$  ( $P = 0,23$ ). As concentrações de colesterol total aumentaram nos animais suplementados com até 0,5% PV de torta de palmiste, independente da fase ( $P < 0,05$ ), mas esse efeito não foi observado na fração HDL do colesterol, que se manteve semelhante nas fases folicular (54,86 mg/dL;  $P = 0,08$ ) e luteínica (53,73 mg/dL;  $P = 0,47$ ) do ciclo estral. Nas concentrações de triglicérides, houve um efeito linear ( $P = 0,03$ ) dos tratamentos na fase folicular, porém, houve similaridade na fase luteínica (59,99 mg/dL;  $P = 0,51$ ). A suplementação não alterou a atividade da enzima ALT ( $P > 0,05$ ), mas as enzimas hepáticas AST e GGT tiveram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) nas duas fases avaliadas. No grupo suplementado com 1,0% PV as concentrações de AST e GGT foram acima do recomendado para a espécie. Conclui-se que a suplementação de búfalas com torta de palmiste aumenta as concentrações de colesterol e triglicerídeos, mas não influencia nas concentrações circulantes de progesterona e no desenvolvimento folicular e luteal. A avaliação das enzimas hepáticas permite recomendar o fornecimento de 0,5% PV de torta de palmiste para búfalas, com aumento nas concentrações séricas de colesterol, sem que haja disfunção hepática nos animais.

**Palavras-chave:** Búfalo, Colesterol, Função hepática, Ovsynch, Sincronização

**ABSTRACT** – The objective of the present study was to evaluate the effect of food supplementation with palm kernel cake on ovarian activity, lipidemia and hepatic function of buffaloes subjected to ovulation synchronization, aiming at determining the best percentage of palm kernel cake that can be offered in the diet. Twenty-four Murrah buffaloes, mean age of  $5.67 \pm 1.60$  years and mean weight of  $684.17 \pm 62.82$  kg, cyclic and non-lactating, were divided into four treatments of palm kernel cake supplementation (0%, 0.25%, 0.50% and 1.00% of live weight). All buffaloes were submitted to the Ovsynch protocol and the diameter of the preovulatory follicle, corpus luteum and ipsilateral ovary were evaluated at days D10 (follicular phase) and D17 (luteal phase) after the initiation of the synchronization protocol. Blood was collected on these same days to determine serum concentrations of total cholesterol and HDL, triglycerides, progesterone ( $P_4$ ) and alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyltransferase (GGT). Supplementation with palm kernel cake did not influence follicular and luteal development ( $P > 0.05$ ) and did not increase  $P_4$  concentrations ( $P = 0.23$ ). Concentrations of total cholesterol increased in animals supplemented with up to 0.5% PV of palm kernel cake, regardless of the phase ( $P < 0.05$ ), but this effect was not observed in the HDL cholesterol fraction, which remained similar in the follicular phase (54.86 mg/dL,  $P = 0.08$ ) and luteal phase (53.73 mg/dL,  $P = 0.47$ ) of the estrous cycle. In the triglyceride concentrations, there was a linear effect ( $P = 0.03$ ) of the treatments in the follicular phase, but there was similarity in the luteal phase (59.99 mg/dL;  $P = 0.51$ ). Supplementation did not alter ALT activity ( $P > 0.05$ ), but liver enzymes AST and GGT had a significant effect ( $P < 0.05$ ) in the two phases evaluated. In the group supplemented with 1.0% PV the concentrations of AST and GGT were above that recommended for the specie. It is concluded that supplementation of buffaloes with palm kernel cake increases cholesterol and triglyceride concentrations but does not influence circulating progesterone concentrations and follicular and luteal development. The evaluation of hepatic enzymes allows recommending the supplementation of 0.5% PV of palm kernel cake to buffaloes, with increase in serum cholesterol concentrations, without hepatic dysfunction in the animals.

**Keywords:** Buffalo, Cholesterol, Liver function, Ovsynch, Synchronization

## 1. Introdução

Os búfalos são animais muito bem adaptados às condições ambientais encontradas em países de clima tropical semelhante aos seus países de origem. Por essa razão, a exploração econômica desses animais tem aumentado no Brasil, especialmente na região da Amazônia brasileira, onde são encontrados cerca de 74% do contingente nacional de 1.370.941 cabeças (IBGE, 2016). Esta espécie vem sendo criada mundialmente em pequenas e médias propriedades, onde possui fundamental importância econômica e social, com desempenho favorável na produção de carne e leite, em diferentes sistemas de criação adotados. Todavia, apesar da favorável adaptação a ambientes diversos, os bubalinos apresentam eficiência reprodutiva inferior aos bovinos, devido principalmente à puberdade retardada e prolongados intervalos entre partos (ZICARELLI, 2010), o que provavelmente está relacionado com manejo deficiente e/ou seleção genética inadequada (VALE, 2000).

Como estratégia para aumentar o desempenho reprodutivo, e considerando a influência da nutrição nesse processo, mais precisamente do conteúdo energético da dieta, tem sido adotado o uso de gorduras na suplementação de fêmeas bovinas (THATCHER & STAPLES, 2000; FUNSTON, 2004; LOPES *et al.*, 2009; 2011) e bubalinas (MALIK *et al.*, 2011; NAZIR *et al.*, 2013). Um dos principais efeitos do fornecimento de energia na dieta sobre a eficiência reprodutiva em fêmeas ruminantes deve-se à ação dos ácidos graxos, os quais podem modificar algumas vias específicas e influenciar o metabolismo de alguns hormônios, causando alterações metabólicas e endócrinas que, por sua vez, resultam em mudanças na atividade ovariana (DIAS *et al.*, 2009). Já foi demonstrado em bovinos que a suplementação lipídica aumenta a capacidade funcional dos ovários, prolonga a vida útil do corpo lúteo e aumenta as concentrações plasmáticas de progesterona, o que reflete positivamente na competência (STAPLES *et al.*, 1998; MCNAMARA *et al.*, 2003) e qualidade embrionária (CERRI *et al.*, 2009). Todavia, apesar dos efeitos benéficos em fêmeas bovinas, poucos estudos foram realizados para avaliar os efeitos da suplementação alimentar com ácidos graxos sobre a reprodução em fêmeas bubalinas.

A elevação plasmática de progesterona em decorrência da suplementação alimentar com ácidos graxos se deve a vários fatores, tais como a maior oferta de colesterol (precursor da progesterona) nos tecidos e fluidos corporais, inclusive nos ovários e corpo lúteo (STRONGE *et al.*, 2005; DEMETRIO *et al.*, 2007); ao aumento na síntese deste hormônio (GRUMMER & CARROLL, 1991); e mesmo na diminuição da metabolização, em decorrência da diminuição do metabolismo hepático (HAWKINS *et al.*, 1995). A manutenção de elevadas concentrações plasmáticas de progesterona pode ser importante em búfalas, pois uma das principais causas de mortalidade embrionária precoce é a produção insuficiente deste hormônio (CAMPANILE *et al.*, 2005; 2007; 2008).

Apesar dos benefícios de uma nutrição adequada, a alimentação representa um custo elevado na pecuária, principalmente quando são fornecidos cereais utilizados na alimentação humana. Em condições tropicais, existem espécies arbóreas cultivadas comercialmente em cujo processo de extração de óleos são produzidas significativas quantidades de subprodutos agroindustriais. Estes subprodutos têm menor valor agregado e, portanto, motivam pesquisas quanto ao valor nutricional para utilização na dieta alimentar de ruminantes (RODRIGUES FILHO *et al.*, 1993; ABDALLA *et al.*, 2008). A torta de palmiste, também conhecida como Torta de Amêndoa de Dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), é um abundante subproduto agroindustrial, pois a cada 100 kg de frutos beneficiados para extração mecânica de óleo, gera-se em torno de 3,0 kg de torta (COSTA *et al.*, 2011). Além disso, a torta de palmiste possui teores nutricionais de proteína bruta (14%), digestibilidade (60%) e extrato etéreo (11,98%) que favorecem seu uso na alimentação animal (RODRIGUES FILHO *et al.*, 2001).

Acreditando na importância da criação de búfalos nas regiões tropicais, no potencial de utilização da torta de palmiste na alimentação de bubalinos e na necessidade de melhoria da eficiência reprodutiva dessa espécie, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação alimentar com torta de palmiste sobre a atividade ovariana de búfalas submetidas à sincronização de ovulação com protocolo Ovsynch e sobre as concentrações plasmáticas de progesterona, lipoproteínas, triglicérides e enzimas hepáticas.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Local experimental

O experimento foi realizado na estação experimental de búfalos, pertencente a Embrapa (Belém, PA, Brasil, 1°26'S e 48°24'O), de maio a outubro de 2015. O tipo climático desta região é o Afi (Köppen), com índices elevados de temperatura, insolação, precipitação pluviométrica e umidade relativa, com respectivas médias anuais de 26,7°C, 2.338 horas, 3.001 mm e 84%, e período menos chuvoso de junho a novembro (BASTOS *et al.*, 2002).

### 2.2. Dietas e animais experimentais

Foram utilizadas vinte e quatro búfalas da raça Murrah, com idade média de  $5,67 \pm 1,60$  anos, peso médio de  $684,17 \pm 62,82$  kg, cíclicas, não lactantes e híginas conforme recomendações para bubalinos feitas por Láu (1999; 2006). As búfalas foram distribuídas entre os tratamentos considerando sua idade, peso e ordem de parto, de tal forma que os grupos experimentais permanecessem equilibrados. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Jaboticabal (protocolo nº5128/15).

As búfalas foram mantidas em uma área de pasto de *Urochloa brizantha cv. Marandu*, em sistema de pastejo com lotação intermitente. Na área experimental de 10 ha, subdividida em oito piquetes, todos os animais pastejavam de forma agrupada, para evitar qualquer efeito indesejado da qualidade da pastagem sobre os grupos. Sal mineral e água limpa foram fornecidos *ad libitum* em cochos cobertos e bebedouros artificiais, respectivamente.

Foram delineados quatro tratamentos, correspondentes aos níveis de fornecimento diário de torta de palmiste: 0%; 0,25%; 0,50% e 1,0% do peso vivo (PV) animal, com base na matéria seca. Em todos os tratamentos, o farelo de trigo foi utilizado na proporção de 0,15% PV, para aumentar a aceitação da torta de palmiste. Os animais foram suplementados com a torta de palmiste por 60 dias para adaptação às dietas e, na sequência (fase experimental), receberam a

suplementação por 120 dias. A suplementação foi fornecida em cochos individuais no galpão de arração, uma vez ao dia e pelo período da manhã. Para determinar o consumo da torta de palmiste, as sobras foram coletadas diariamente. O ajuste na quantidade da torta de palmiste fornecida às búfalas era realizado mensalmente, por ocasião da pesagem dos animais.

### 2.3. Análises químicas

Para a realização das análises, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e moídas em moinho do tipo Willey com peneira de 1 mm. Todas as amostras de cada mês foram combinadas e a proporção da composição química dos componentes das dietas está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Proporção da composição química da torta de palmiste, do farelo de trigo e da gramínea (*Urochloa brizantha cv. Marandu*), fornecidos às búfalas

<b>Composição química</b>	Torta de palmiste	Farelo de trigo	Gramínea
Matéria Seca (MS; %)	95,53	89,01	29,50
Matéria Orgânica (% MS)	96,20	94,55	93,40
Extrato Etéreo (% MS)	10,20	3,33	2,59
Proteína Bruta (% MS)	10,28	15,89	8,52
FDNcp (% MS)	53,03	43,40	67,67
FDAcp (% MS)	35,00	13,74	39,38

Abreviaturas: FDNcp, Fibra em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína; FDAcp, Fibra em Detergente Ácido corrigida para cinzas e proteína.

Amostras da torta de palmiste foram colhidas mensalmente e foram estocadas a -20°C para posterior análise conforme métodos preconizados pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA) (DETMANN *et al.*, 2012), para os teores de: matéria seca (MS; método INCT-CA G-003/1), matéria orgânica (MO; INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB; método INCT-CA N-001/1), extrato etéreo (EE; INCT-CA G-005/1), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp; INCT-CA F-002/1, INCT-CA M-002/1 e

INCT-CA N-004/1) e fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDAcp; INCT-CA F-004/1, INCT-CA M-003/1 e INCT-CA N-005/1).

A fração lipídica da torta de palmiste foi extraída pelo método butt soxhlet (AOCS, 2009). A quantificação da composição de ácidos graxos da torta de palmiste (Tabela 2) foi realizada em cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 68650 series GC system, AGILENT, EUA).

Tabela 2 – Proporção da composição em ácidos graxos da torta de palmiste

<b>Ácidos graxos</b>	<b>% massa/massa</b>
<b>SATURADOS</b>	<b>82,40</b>
C6:0 (Capróico)	0,77
C8:0 (Caprílico)	3,47
C10:0 (Cáprico)	3,28
C12:0 (Láurico)	46,58
C14:0 (Mirístico)	16,41
C15:0 (pentadecanóico)	0,06
C16:0 (Palmítico)	8,57
C17:0 (Margárico)	0,13
C18:0 (Esteárico)	2,69
C20:0 (Araquídico)	0,16
C22:0 (Behênico)	0,11
C24:0 (Lignocérico)	0,17
<b>INSATURADOS</b>	<b>17,60</b>
C18:1 (Oléico)	15,06
C18:2 (Linoléico)	2,36
C20:1 (Eicosenóico)	0,18
<b>Total</b>	<b>100,00</b>
Relação insaturados/saturados	0,21

O cromatógrafo utiliza coluna capilar DB 23 Agilent (50% cyanopropyl)-methylpolsiloxane, com dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 µm de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo de coluna 1,00

mL/min.; velocidade linear 24 cm/s.; temperatura do detector 280° C; temperatura do injetor 250° C; temperatura do forno 110°C mantida durante 5 min., aquecimento de 110 a 215 °C (5 °C/min.), e manutenção a 215°C durante 24 min.; gás de arraste Hélio; volume injetado 1,0 µL. A análise foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras da Universidade de Campinas, SP, Brasil (DTA, FEA, UNICAMP).

## 2.4. Sincronização do ciclo e avaliação ultrassonográfica dos ovários

Durante a fase de adaptação à suplementação dietética, as búfalas foram avaliadas por ultrassonografia (US) transretal com transdutor linear de 7,5 MHz (Scanner DP-3300Vet®, Shenzhen Mindray bio-medical electronics co. Ltda, China), com a finalidade de confirmar a ciclicidade dos animais, pela presença de corpo lúteo, e ausência de alterações nos ovários e útero. Após o período de adaptação, em dia aleatório do ciclo estral, todas as búfalas foram submetidas à sincronização da ovulação com protocolo Ovsynch, semelhante ao desenvolvido para bovinos (PURSLEY *et al.*, 1995), porém adaptado para bubalinos (NEGLIA *et al.*, 2003). O protocolo de sincronização foi repetido nos animais experimentais durante quatro sequências, com intervalo de 30 dias, durante o período experimental, conforme representado na Figura 1.

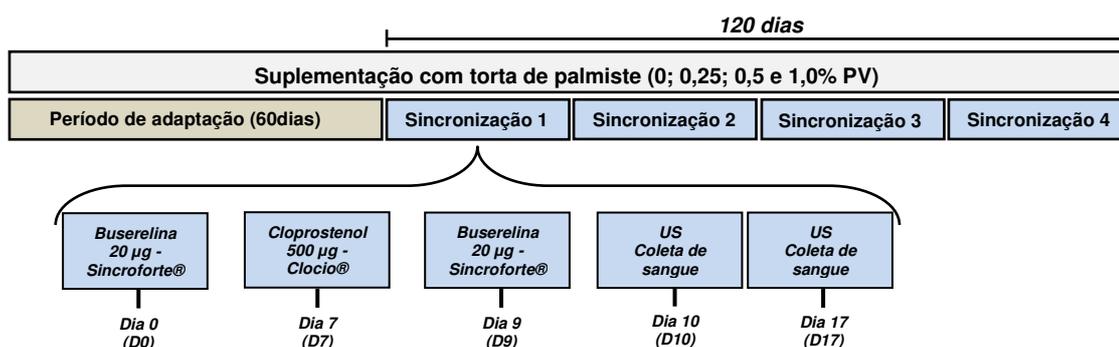


Figura 1 – Representação do delineamento experimental e aplicação de medicamentos no protocolo de sincronização da ovulação (Ovsynch), adotado no experimento.

No primeiro dia do protocolo de sincronização (Dia 0), as búfalas foram tratadas com acetato de buserelina, um análogo do GnRH (Sincroforte® 20 µg im; OUROFINO Saúde Animal, Brasil); no Dia 7, foi aplicado cloprostenol sódico

(Clocio® 500 µg im; BIMEDA Brasil S.A., Brasil); e no Dia 9, foi aplicado acetato de buserelina (Sincroforte® 20 µg im).

Durante a fase experimental, os diâmetros do folículo pré-ovulatório, do corpo lúteo e do ovário ipsilateral foram aferidos nos dias D10 (fase folicular) e D17 (fase luteínica) após início do protocolo de sincronização, sempre pelo mesmo operador. A cada avaliação da superfície ovariana, ainda com as imagens congeladas na tela, foram realizadas as medições das estruturas citadas. No caso de corpo lúteo cavitário, a área da cavidade luteal foi subtraída da área do corpo lúteo, para se determinar a área do tecido luteal.

## 2.5. Colheita de sangue e ensaios

Amostras de sangue foram colhidas nos dias D10 e D17 após início do protocolo de sincronização da ovulação. Foi realizada venopunção da veia jugular com uma agulha para coleta 21 Ga (Labor Import Comercial Imp. Exp. Ltda, Brasil) para colheita a vácuo sangue em dois tubos de vidro estéreis (Vacutainer, 10 mL, Becton Dickinson, EUA), sendo um sem anticoagulante e outro com ativador de coágulo. Os tubos foram centrifugados (Centrífuga Quimis, Brasil) a 1500 X g por 10 min. em temperatura ambiente e as amostras da fração soro foram acondicionadas em microtubos, em triplicata. Os microtubos foram mantidos a -20°C até o momento das análises de metabólitos e hormônios, com descongelamento único.

As concentrações séricas de colesterol total, colesterol fração HDL, triglicerídeos e das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) foram determinadas por meio de reações enzimáticas colorimétricas, utilizando *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante e conforme os métodos descritos por Allain *et al.* (1974) e Fossati & Lorenzo (1982). As mensurações foram realizadas em analisador bioquímico automático (BS 120®, Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co. Ltda, China) no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal

As concentrações de progesterona foram quantificadas por radioimunoensaio (RIA), nas amostras de sangue coletadas no dia D17 em relação ao início do

protocolo de sincronização da ovulação. Foram utilizados *kits* comerciais (MP Biomedicals, California, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram analisadas simultaneamente, após a finalização do experimento. A quantidade mínima detectável de progesterona foi 0,187 ng/mL. Os coeficientes de variação intra e inter ensaio foram 6,95% e 8,67%, respectivamente. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo.

## 2.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do Statistical Analysis System for Windows (SAS 9.1, 2003; SAS Institute, EUA). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições, com medidas repetidas no tempo (quatro períodos de sincronizações). Os dados foram submetidos aos procedimentos de análise de normalidade (Proc Univariate, Shapiro-Wilk test) para testar a distribuição normal. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), onde foram testados os efeitos do percentual de suplementação, período de sincronização e a interação entre os fatores; tanto os efeitos do período de sincronização como a interação não foram significativos. Para análise do efeito do percentual de suplementação com torta de palmiste, os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial. As variáveis paramétricas foram expressas como média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM). Foi adotado um nível de significância de 5%.

## 3. Resultados

Dentre os diferentes percentuais de suplementação com torta de palmiste, somente o fornecimento de 1% PV apresentou sobras de consumo diário, tendo consumo real médio diário na ordem de 0,7% PV.

Os diferentes percentuais de suplementação alimentar com torta de palmiste não influenciaram ( $P > 0,05$ ) os diâmetros dos folículos pré-ovulatórios, dos corpos

lúteos e dos ovários (Tabela 3), determinados pelas avaliações ultrassonográficas realizadas nos dias D10 e D17 após o início da sincronização, correspondentes às fases folicular e luteínica do ciclo estral, respectivamente. O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi de  $13,34 \pm 0,29$  mm e do ovário ipsilateral foi de  $22,19 \pm 0,33$  mm. Já na fase luteínica, o diâmetro médio do corpo lúteo foi de  $15,88 \pm 0,33$  mm e o do ovário ipsilateral foi de  $22,75 \pm 0,45$  mm.

Tabela 3 – Medidas (média  $\pm$  EPM) de ovários e estruturas ovarianas (folículos e corpos lúteos) durante as fases folicular (D10) e luteínica (D17) de búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste

Medidas Ovarianas	Fornecimento de Torta de Palmiste (% PV)				Valor de P
	0,00	0,25	0,50	1,00	
<b>Folicular</b>					
FolDiam <sup>1</sup>	13,17 $\pm$ 0,63	14,00 $\pm$ 0,65	12,90 $\pm$ 0,42	13,21 $\pm$ 0,59	0,7046
FolCirc <sup>2</sup>	38,91 $\pm$ 1,91	41,00 $\pm$ 2,01	37,94 $\pm$ 1,28	38,56 $\pm$ 1,60	0,5998
FolÁrea <sup>3</sup>	124,89 $\pm$ 11,79	139,40 $\pm$ 12,50	115,75 $\pm$ 7,55	119,47 $\pm$ 8,78	0,4122
DiamOv <sup>4</sup>	21,93 $\pm$ 0,69	22,09 $\pm$ 0,69	22,72 $\pm$ 0,64	21,93 $\pm$ 0,60	0,6991
<b>Luteínica</b>					
CLDiam <sup>5</sup>	16,34 $\pm$ 0,75	16,25 $\pm$ 0,77	15,68 $\pm$ 0,55	15,19 $\pm$ 0,56	0,1860
CLCirc <sup>6</sup>	48,07 $\pm$ 2,26	48,33 $\pm$ 2,23	46,33 $\pm$ 1,70	45,58 $\pm$ 1,79	0,3030
CLÁrea <sup>7</sup>	188,76 $\pm$ 18,24	192,34 $\pm$ 18,85	173,53 $\pm$ 12,77	169,15 $\pm$ 13,06	0,2924
DiamOv <sup>4</sup>	22,56 $\pm$ 0,80	23,85 $\pm$ 0,93	22,19 $\pm$ 0,95	22,31 $\pm$ 0,88	0,5312

Abreviaturas:<sup>1</sup>FolDiam – diâmetro folicular, <sup>2</sup>FolCirc – circunferência folicular, <sup>3</sup>FolÁrea – área folicular, <sup>4</sup>DiamOv - diâmetro ovariano, <sup>5</sup>CLDiam – diâmetro do corpo lúteo, <sup>6</sup>CLCirc – circunferência do corpo lúteo, <sup>7</sup>CLÁrea – área do corpo lúteo.

As concentrações séricas de colesterol total aumentaram gradativamente, de acordo com o percentual de torta de palmiste fornecido na dieta das búfalas, com efeitos quadrático ( $P=0,0151$ ) e linear ( $P=0,0589$ ) crescentes nas análises das fases folicular e luteínica do ciclo estral, respectivamente (Figura 2).

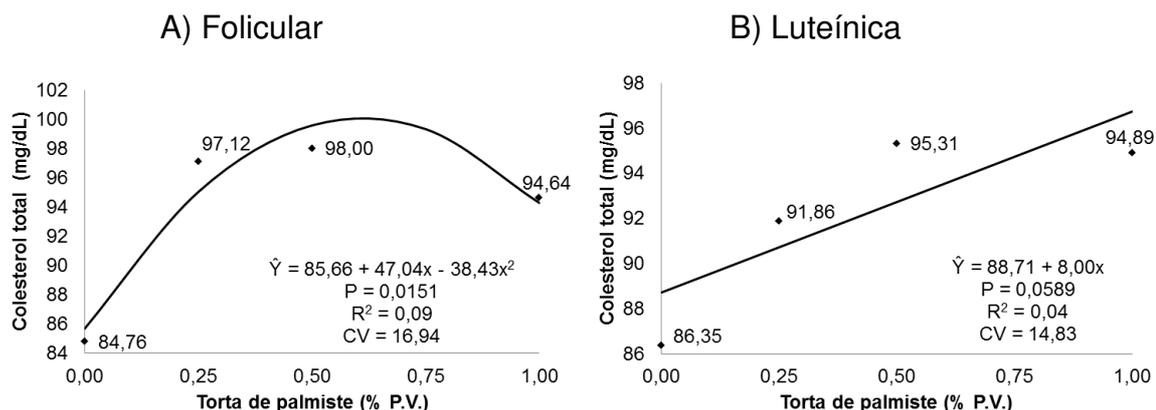


Figura 2 - Concentrações séricas de colesterol total em búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste, nas fases folicular (A) e luteínica (B) do ciclo estral sincronizado

As concentrações séricas da fração HDL do colesterol não foram afetadas com o aumento do percentual de torta de palmiste fornecido na dieta das búfalas (Tabela 4), com concentrações séricas sanguíneas médias de  $54,86 \pm 1,08$  mg/dL na fase folicular ( $P=0,0841$ ) e de  $53,73 \pm 1,00$  mg/dL na fase luteínica ( $P=0,4695$ ) do ciclo estral sincronizado.

Tabela 4 – Valores de medidas (média  $\pm$  EPM) dos metabólitos sanguíneos, durante as fases folicular (D10) e luteínica (D17), de búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste

Metabólitos	Fornecimento de Torta de Palmiste (% PV)				Valor de P
	0,00	0,25	0,50	1,00	
<b>Fase Folicular</b>					
HDL <sup>1</sup> (mg/dL)	51,29 $\pm$ 2,15	54,92 $\pm$ 2,38	58,04 $\pm$ 2,17	54,71 $\pm$ 1,26	0,0841
ALT <sup>2</sup> (UI/L)	31,71 $\pm$ 2,36	29,29 $\pm$ 2,19	32,50 $\pm$ 1,41	32,41 $\pm$ 1,91	0,5472
<b>Fase Luteínica</b>					
HDL <sup>1</sup> (mg/dL)	51,95 $\pm$ 1,75	53,23 $\pm$ 2,06	55,77 $\pm$ 2,55	53,84 $\pm$ 1,19	0,4695
ALT <sup>2</sup> (UI/L)	31,90 $\pm$ 2,50	30,50 $\pm$ 2,22	32,09 $\pm$ 1,81	30,47 $\pm$ 2,30	0,7656
Trig <sup>3</sup> (mg/dL)	57,65 $\pm$ 4,90	57,00 $\pm$ 5,03	64,91 $\pm$ 2,70	60,21 $\pm$ 4,03	0,5100
P <sub>4</sub> <sup>4</sup> (ng/mL)	7,40 $\pm$ 0,90	8,75 $\pm$ 1,34	7,25 $\pm$ 0,90	9,97 $\pm$ 1,76	0,2324

Abreviaturas: <sup>1</sup>HDL – HDL colesterol, <sup>2</sup>ALT – alanina-aminotransferase, <sup>3</sup>Trig – triglicerídeos, <sup>4</sup>P<sub>4</sub> – progesterona.

As concentrações séricas de progesterona na fase luteínica (D17) não foram afetadas com o aumento de torta de palmiste nas dietas das búfalas (Tabela 4), com valores médios de  $8,31 \pm 0,63$  ng/mL.

Nos testes de função hepática, não houve alteração nas concentrações séricas da enzima ALT entre os tratamentos, seja na fase folicular ( $P=0,5472$ ) ou na fase luteínica ( $P=0,7656$ ) do ciclo estral, com valores médios de  $31,40 \pm 0,99$  UI/L e  $31,25 \pm 1,09$  UI/L, respectivamente (Tabela 4).

Com relação às concentrações séricas de triglicerídeos, houve um efeito linear crescente ( $P=0,0339$ ) relacionado ao fornecimento da torta de palmiste nas dietas durante a fase folicular (Figura 3). Todavia, o mesmo não foi observado na fase luteínica ( $P=0,5100$ ), quando houve similaridade entre os tratamentos, com valor médio de  $59,99 \pm 2,12$  mg/dL (Tabela 4).

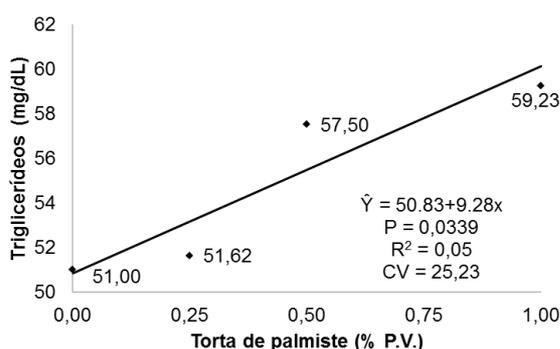


Figura 3 - Concentrações séricas de triglicerídeos na fase folicular do ciclo estral sincronizado de búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste na dieta.

A atividade da enzima AST foi influenciada ( $P<0,001$ ) pelo aumento da oferta de torta de palmiste, com efeito linear crescente nas fases folicular e luteínica (Figura 4) do ciclo estral sincronizado. Fato semelhante ocorreu com a atividade da enzima GGT, que foi afetada pelos percentuais de inclusão da torta de palmiste nas dietas das búfalas (Figura 4), com efeito linear crescente tanto na fase folicular ( $P<0,05$ ) quanto na luteínica ( $P<0,001$ ) do ciclo estral sincronizado.

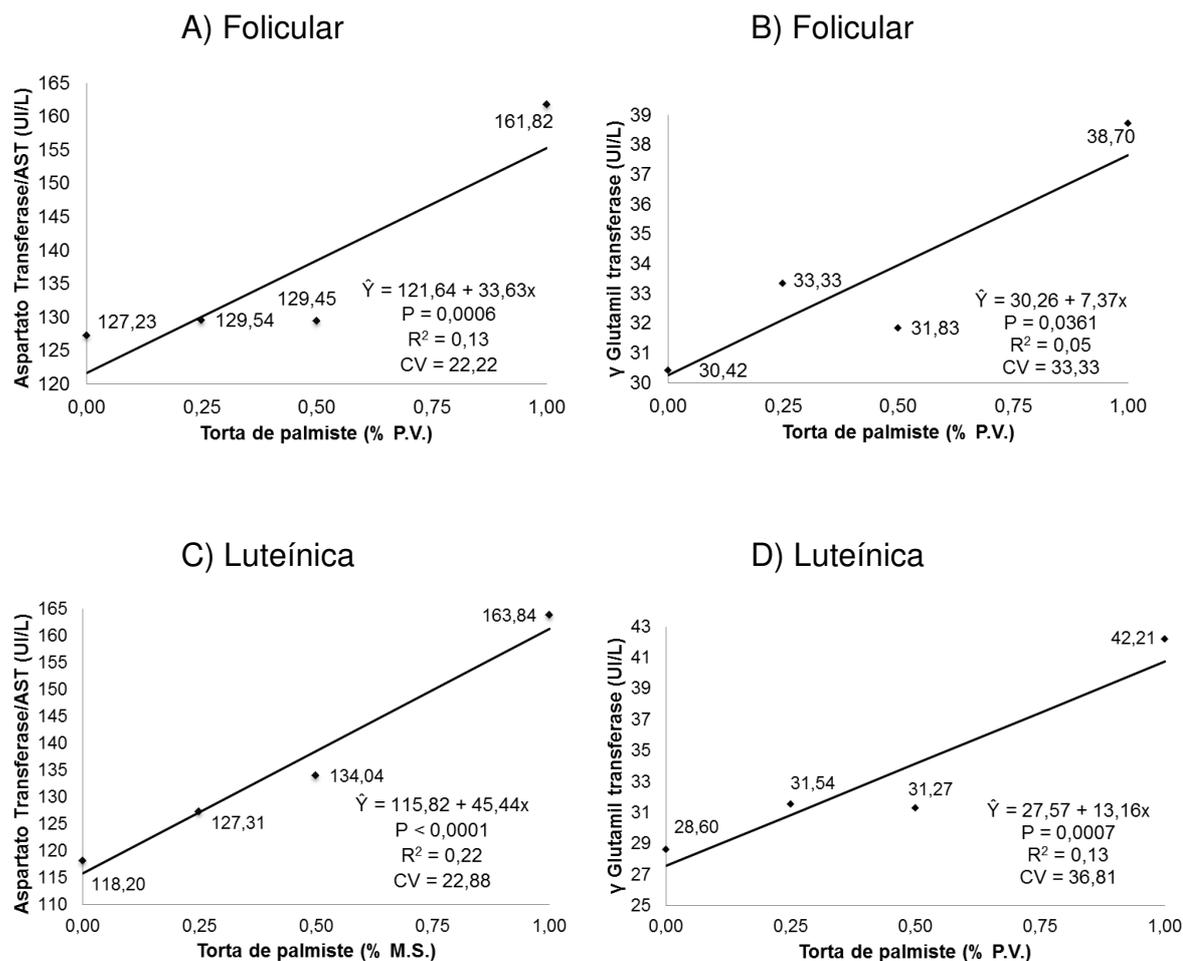


Figura 4 - Concentrações séricas das enzimas AST e GGT em búfalas suplementadas com diferentes percentuais de torta de palmiste na dieta, nas fases folicular (respectivamente A e B) e luteínica (respectivamente C e D) do ciclo estral sincronizado.

#### 4. Discussão

Sabe-se que os búfalos têm maior eficiência de conversão alimentar quando comparados aos bovinos, o que se deve à maior eficiência celulolítica ruminal e melhor aproveitamento de forragens de baixa qualidade (TEWATIA & BHATIA, 1998). No entanto, muitas vezes se torna necessária a suplementação desses animais em períodos críticos, devido à sazonalidade das forrageiras. Porém, a alimentação representa um custo elevado na pecuária, o que estimula a avaliação dos efeitos de suplementos com menor valor agregado. Dentro desse escopo, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da utilização da suplementação

dietética com um subproduto agroindustrial de elevado valor nutricional, a torta de palmiste, sobre parâmetros reprodutivos e metabólicos de búfalas sincronizadas.

A suplementação dietética com ácidos graxos para ruminantes é assunto controverso, pois diferentes trabalhos têm reportado aumento (NAZIR *et al.*, 2013; CORDEIRO *et al.*, 2015) ou ausência de efeito (CHILDS *et al.*, 2008; MALIK *et al.*, 2011) sobre as concentrações séricas de progesterona. Maiores concentrações deste esteroide foram demonstradas em alguns estudos realizados em bovinos, o que foi justificado pela hipótese da diminuição do metabolismo (clearance) hepático resultante de suplementações lipídicas (SARTORI & MOLLO, 2007), embora ainda seja necessário realizar avaliações que consigam mensurar o fluxo hepático dos animais suplementados. Outra explicação para maiores concentrações de esteróides é o possível aumento na pulsatilidade de LH (HIGHTSHOE *et al.*, 1991), resultando em aumento do diâmetro de folículos e corpos lúteos (RAES *et al.*, 2004). Entretanto, no presente estudo não houve diferença nas concentrações de progesterona no dia 17 após o início do protocolo de sincronização entre as búfalas não suplementadas ou suplementadas com torta de palmiste. Independentemente das concentrações de torta de palmiste utilizadas como suplemento, não foram observadas alterações no desenvolvimento folicular e luteal. Conseqüentemente, a ausência de variação no diâmetro, circunferência ou área de tecido luteal justificam uma possível ausência de efeito da dieta rica em ácidos graxos sobre a biossíntese de progesterona, mesmo tendo sido observado aumento das concentrações séricas de colesterol total nos animais tratados.

O colesterol desempenha função importante na fisiologia do ovário, pelo fato de ser precursor dos hormônios esteroides secretados por este órgão. No presente estudo, a inclusão da torta de palmiste na dieta das búfalas, até o nível de 0,5% PV de fornecimento, independente da fase avaliada, elevou as concentrações séricas de colesterol total (84,41 mg/dL) em relação aos animais que não receberam a torta de palmiste (75,40 mg/dL). Contudo, mesmo os maiores valores observados mantiveram-se dentro dos valores de referência (89-134 mg/dL) para búfalas leiteiras (ARSHAD *et al.*, 2005; HAGAWANE *et al.*, 2009). Acredita-se que o aumento na absorção de ácidos graxos por via gastrointestinal, em decorrência do fornecimento da torta de palmiste na alimentação das búfalas, tenha favorecido o

aumento dos níveis séricos de colesterol total, via síntese e acúmulo de colesterol e ésteres de colesterol no sangue (HAWKINS *et al.*, 1995; STRONGE *et al.*, 2005; DEMETRIO *et al.*, 2007). Fato semelhante ao observado no presente estudo foi relatado por outros pesquisadores (NAZIR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014), que também consideram possível a modulação das concentrações plasmáticas de colesterol por meio do incremento do extrato etéreo nas dietas. É interessante frisar que o fornecimento alimentar de 1,0% PV de torta de palmiste causou um declínio nas concentrações de colesterol total sérico, nas fases folicular e luteínica, fato este que não está completamente esclarecido.

Por outro lado, não foi observado efeito sobre a fração HDL do colesterol entre as búfalas não suplementadas ou suplementadas com a torta de palmiste, nas diferentes fases do ciclo estral avaliadas. As concentrações de HDL estão abaixo das obtidas por Campanile *et al.* (2010), com valores médios de 64 mg/dL em búfalas suplementadas com dieta à base de milho.

No presente estudo, foi também avaliada a função hepática das búfalas, visando definir as proporções adequadas da torta de palmiste (em % PV) que podem ser inseridas na dieta sem causar danos ou alterações metabólicas. A suplementação alimentar com torta de palmiste não alterou a atividade da enzima ALT nas búfalas, que apresentou valor médio (31,33 UI/L) inferior ao valor médio de 42,8 UI/L encontrado por Nazir *et al.* (2013) em búfalas suplementadas com sementes de linhaça.

No entanto, as búfalas suplementadas com torta de palmiste apresentaram aumento nas concentrações séricas da enzima hepática AST, nas duas fases avaliadas, de acordo com o aumento na inclusão da torta na dieta. Provavelmente, a elevação desta enzima hepática deve-se ao fato do fígado desempenhar papel fundamental na homeostase do metabolismo das gorduras, por retirar do plasma as lipoproteínas que estão em excesso durante a absorção intestinal, ou devolver ao sangue os ácidos graxos na forma de triglicerídeos, fosfolipídeos e ésteres de colesterol, ligados às lipoproteínas (NIEMEYER, 1978). No entanto, no presente estudo não foi observado quadro de disfunção hepática até o nível de 0,5 % PV de inclusão da torta, já que a atividade da enzima AST apresentou valor médio (129,06 UI/L) bem próximo ao valor de 131,5 UI/L descrito por Gandra *et al.* (2011), mas

inferiores aos descritos por Gomes *et al.* (2010) de 143,1 UI/L, os quais são considerados valores de referência para búfalas da raça Murrah. Por outro lado, a suplementação das búfalas com 1,0% PV da torta de palmiste promoveu elevação da atividade da enzima AST, com valor médio superior ao valor de referência para búfalas (167,47 vs. 143,1 UI/L), conforme descrito por Gomes *et al.* (2010). Este achado indica um possível quadro de disfunção hepática, o que deve ser evitado.

Independentemente da fase avaliada (folicular ou luteal), as concentrações séricas médias da enzima GGT em búfalas suplementadas com até 0,5 % PV de torta de palmiste foram próximas ao valor de referência descrito por Gomes *et al.* (2010) para a mesma espécie e raça (31,83 UI/L vs. 33,3 UI/L). No entanto, houve elevação significativa no valor médio (38,7 UI/L) de atividade dessa enzima nas búfalas tratadas com 1,0% PV de torta de palmiste na dieta, o que pode resultar em efeitos indesejáveis na função hepática dos animais e, por conseguinte, na capacidade de absorção dos nutrientes presentes nos alimentos.

## **Conclusão**

Em suma, os resultados do presente estudo demonstraram que a suplementação de búfalas com torta de palmiste aumenta as concentrações séricas circulantes de colesterol total e triglicerídeos, mas não influencia no desenvolvimento folicular e luteal e também não tem efeito sobre as concentrações circulantes de progesterona. A avaliação das enzimas hepáticas permite recomendar o fornecimento de 0,5% PV de torta de palmiste para búfalas em pastejo, com aumento nas concentrações séricas de colesterol, sem que haja disfunção hepática nos animais.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Embrapa, CAPES Pró-Amazônia e CNPq pelo apoio financeiro, e a empresa Marborges Agroindústria S.A. pela doação da torta de palmiste. Agradecem ainda as seguintes instituições pela colaboração durante a realização de análises: Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal

Rural da Amazônia (UFRA), PA, Brasil; Laboratório de Óleos e Gorduras da Universidade de Campinas (DTA, FEA, UNICAMP), SP, Brasil; Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), PA, Brasil; e Laboratório de Endocrinologia Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil,.

## Referências

- [1] Abdalla AL, Silva Filho JC, Godoi AR, Carmo CA, Eduardo JLP. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. *Rev Bras Zootec* 2008;37:260-8.
- [2] Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.
- [3] American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 5th ed. Champaign, USA, AOCS, 2009.
- [4] Arshad HM, Ahmad N, Zia-ur-Rahman, Samad HA, Akhtar N, Ali S. Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes. *Pakistan Vet J* 2005;25:189-92.
- [5] Bastos TX, Pacheco NA, Nechet D, Sá TDA. Aspectos climáticos de Belém nos últimos cem anos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 31 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 128).
- [6] Campanile G, Neglia G, Gasparini B, Galero G, Prandi A, Di Palo R, *et al.* Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology* 2005;63: 2334-40.
- [7] Campanile G, Di Palo R, Neglia G, Vecchio D, Gasparini B, Prandi A, *et al.* Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology* 2007;67:1393– 8.
- [8] Campanile G, Vecchio D, Di Palo R, Neglia G, Gasparini B, Prandi A, *et al.* Delayed treatment with GnRH agonist, hCG and progesterone and reduced embryonic mortality in buffaloes. *Theriogenology* 2008;12:127–31.
- [9] Campanile G, Baruselli PS, Vecchio D, Prandi A, Neglia G, Carvalho NAT, *et al.* Growth, metabolic status and ovarian function in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers fed a low energy or high energy diet. *Anim Reprod Sci* 2010;122:74-81.

- [10] Cerri RL, Juchem SO, Chebel RC, Rutigliano HM, Bruno RG, Galvão KN, *et al.* Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* 2009;92:1520-31.
- [11] Childs S, Lynch CO, Hennessy AA, Stanton C, Wathes DC, Sreenan JM, *et al.* Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers. *Animal* 2008;2:883-93.
- [12] Cordeiro MB, Peres MS, Souza JM de, Gaspar P, Barbieri F, Sá Filho MF, *et al.* Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. *Theriogenology* 2015;83:1461-68.
- [13] Costa DA da, Colodo JCN, Ferreira GDG, Araújo CV de, Moreira GR. Uso da torta de dendê na alimentação de ruminantes. *Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR* 2011;14:133-7.
- [14] Demetrio DGB, Santos RM, Demetrio CGB, Vasconcelos JLM. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2007;90:5073-82.
- [15] Detmann E, Souza MA, Valadares Filho SC, Queiroz AC, Berchielli TT, Saliba EOS, *et al.* Métodos para análise de alimentos – INCT – Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- [16] Dias JC, Martins JAM, Emerick LL, Souza FA, Andrade VJ. Efeitos da suplementação lipídica no aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. *Rev Bras Reprod Anim* 2009;33:95-104.
- [17] Fossati P, Lorenzo P. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;28:2077-80.
- [18] Funston, RN. Fat supplementation and reproduction in beef females. *J Anim Sci* 2004;82:154-61.
- [19] Gandra JR, Freitas Jr. JE, Barletta RV, Maturama Filho M, Gimenes LU, Vilela FG, *et al.* Productive performance, nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle and Mediterranean Buffaloes (*Bubalus bubalis*) fed with corn-silage based diets. *Livest Sci* 2011;140:283-91.
- [20] Gomes V, Madureira KM, Blagitz MG, Galdino J, Vantim G, Benesi FJ. Valores de referência e influência do etário sobre os parâmetros bioquímicos utilizados para avaliação da função hepática de bubalinos hípidos da raça Murrah. *Ars Vet.* 2010;26:128-131.

- [21] Grummer RR, Carroll DJ. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *J Anim Sci* 1991;69:3838-52.
- [22] Hagawane SD, Shinde SB, Rajguru DN. Hematological and blood biochemical profile in lactating buffaloes in and around Parbhani city. *Vet World* 2009;2:467-9.
- [23] Hawkins DE, Niswender KD, Oss GM, Moeller CL, Odde KG, Sawyer HR, *et al.* An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J Anim Sci* 1995;73:541-5.
- [24] Hightshoe RB, Cochran RC, Corah LR, Kiracofe GH, Harmon DL, Perry RC. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. *J Anim Sci* 1991;69:4097-103.
- [25] IBGE. Produção da Pecuária Municipal, <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?&t=resultados/>; 2016 [acessado 08 novembro 2017].
- [26] Láu HD. Doenças em búfalos no Brasil: diagnósticos, epidemiologia e controle. Belém: Embrapa-CPATU, 1999. 202p.
- [27] Láu HD. Manejo ecosanitário de búfalos: princípios, técnicas e aplicação. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 64p.
- [28] Lopes CN, Scarpa AB, Cappelozza BI, Cooke RF, Vasconcelos JLM. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. *J Anim Sci* 2009;87:3935-43.
- [29] Lopes CN, Cooke RF, Reis MM, Peres RFG, Vasconcelos JLM. Strategic supplementation of calcium salts of polyunsaturated fatty acids to enhance reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. *J Anim Sci* 2011;89:3116-24.
- [30] Malik AA, Gandotra VK, Brar OS, Ghuman SPS, Dhaliwal GS. Attenuation of luteolytic response following fish meal supplementation in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci* 2011;126:45-9.
- [31] Mcnamara S, Butler T, Ryan DP, Mee JF, Dillon P, O'mara FP, *et al.* Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Holstein–Friesian cows, *Anim Reprod Sci* 2003;79:45-56.
- [32] Nazir G, Ghuman SPS, Singh J, Honparkhe M, Ahuja CS, Dhaliwal GS, *et al.* Improvement of conception rate in postpartum flaxseed supplemented buffalo with Ovsynch + CIDR protocol. *Anim Reprod Sci* 2013;137:15-22.

- [33] Neglia G, Gasparrini B, Di Palo R, De Rosa C, Zicarelli L, Campanile G. Comparison of pregnancy rates with two oestrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology* 2003;60:125-33.
- [34] Niemeyer H. Bioquímica. Em: Niemeyer H, editores. *Metabolismo de los Lípidos*, Zaragoza: Inter-Médica; 1978, p.72-91.
- [35] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 1995;44:915-23.
- [36] Raes K, De Smet S, Demeyer D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Anim Feed Sci Tech* 2004;113:199-221.
- [37] Rodrigues Filho JA, Camarão AP, Lourenço Junior JB. Avaliação de subprodutos agroindustriais para alimentação de ruminantes. Belém, PA: Embrapa-CPATU, 1993. 15 p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 71).
- [38] Rodrigues Filho JA, Camarão AP, Azevedo GPC. Utilização da torta de amêndoa de dendê na alimentação de ruminantes. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001 24p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 111).
- [39] Sartori R, Mollo MR. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. *Rev Bras Reprod Anim* 2007;31:197-204.
- [40] SAS Institute Inc. 2003. Statistical analysis system. Release 9.1. (Software). Cary. USA.
- [41] Silva GR, Garcia AR, Faturi C, Lourenço Junior JB, Nahum BS, Gonçalves AA, *et al.* Adição de óleo de palma na dieta sobre a lipídemia e a qualidade do semen de bubalinos (*Bubalus bubalis*). *Arq Bras Med Vet Zootec* 2014;66:152-60.
- [42] Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Sci* 1998;81:856–71.
- [43] Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 2005;64:1212-24.
- [44] Tawatia BS, Bhatia SK. Comparative ruminal biochemical and digestion related physiological characteristics in buffaloes and cattle fed a fibrous diet. *Buffalo Journal* 1998;14:161–70.
- [45] Thatcher WW, Staples CR. Effects of dietary fat supplementation on reproduction in lactating dairy cows. *Adv Dairy Technol* 2000;12:213-32.

- [46] Vale WG. Enhancing the puberty in buffalo heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Stockholm. Proceedings... Stockholm: ICAR, 2000. v. 1, p. 271.
- [47] Zicarelli L. Enhancing reproductive performance in domestic dairy water buffalo (*Bubalus bubalis*). Soc Reprod Fertil Suppl 2010;67:443-55.

### **CAPÍTULO 3 – Efeito da suplementação alimentar com ácidos graxos poliinsaturados nas concentrações circulantes de progesterona, lipidemia sanguínea e taxa de concepção em búfalas submetidas a IATF**

Benjamim de Souza Nahúm<sup>a,b,\*</sup>, Naiara Zoccal Saraiva<sup>b</sup>, José Adérito Rodrigues Filho<sup>b</sup>, Raimundo Parente de Oliveira<sup>b</sup>, Cristian Faturi<sup>c</sup>, Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>c</sup>, Eriklis Nogueira<sup>d</sup>, Guilherme de Paula Nogueira<sup>e</sup>, Gisele Zoccal Mingoti<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil

<sup>b</sup> Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil

<sup>c</sup> Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil

<sup>d</sup> Embrapa Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>e</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brasil

\* Autor correspondente. Tel.:+55 91 991122646. Endereço de e-mail: benjamim.nahum@embrapa.br (B. de S. Nahum).

Endereços de e-mail: naiara.saraiva@embrapa.br (N.Z. Saraiva), jose.rodrigues-filho@embrapa.br (J.A. Rodrigues Filho), raimundo.parente@embrapa.br (R. P. de Oliveira), cristian.faturi@ufra.edu.br (C. Faturi), sebastiaorolim@yahoo.com.br (S. T. Rolim Filho), eriklis.nogueira@embrapa.br (E. Nogueira), gpn@fmva.unesp.br (G. de P. Nogueira), gmingoti@fmva.unesp.br (G.Z. Mingoti).

**RESUMO** – O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) na taxa de concepção de búfalas submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e quantificar os níveis de progesterona e o perfil lipídico desses animais. Foram utilizadas búfalas leiteiras (*Bubalus bubalis*, n=120) da raça Murrah, com peso médio de  $452,27 \pm 6,55$  kg e ECC de  $3,41 \pm 0,05$ . Todas as búfalas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação e a partir do dia da IATF (D0) divididas em três tratamentos de suplementação com os concentrados (0,5% PV) durante 22 dias. Os tratamentos foram: grupo Controle: animais suplementados com concentrado padrão; grupo Soja: concentrado padrão acrescido de óleo de soja refinado e grupo Megalac: concentrado padrão acrescido de gordura protegida. Foram dosadas as concentrações séricas de colesterol total, HDL, triglicérides e progesterona ( $P_4$ ) nos dias D-12 (pré-tratamento) e D22 (pós-tratamento). O diagnóstico de prenhez foi realizado 30 dias após a IATF. Houve uma elevação substancial de consumo de AGs insaturados para os grupos Soja e Megalac, na ordem de 174,43% e 198,47% respectivamente, em comparação ao grupo Controle. Após 22 dias de suplementação, as concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL e lipídios totais foram mais elevadas ( $P < 0,05$ ) nos grupos tratados Soja e Megalac em comparação ao grupo Controle, e as concentrações circulantes de  $P_4$  não diferiram estatisticamente entre os grupos Controle, Soja e Megalac, tanto para as fêmeas prenhas ( $18,09 \pm 2,06$  vs  $20,53 \pm 1,95$  vs  $18,76 \pm 1,36$ ;  $P = 0,6833$ , respectivamente) quanto para as não prenhas ( $4,15 \pm 1,06$  vs  $8,34 \pm 1,87$  vs  $6,09 \pm 1,51$ ;  $P = 0,2105$ , respectivamente). Os resultados da taxa de concepção aos 30 dias demonstram que houve diferença entre os grupos ( $P = 0,0130$ ) Soja, Controle e Megalac, onde as búfalas suplementadas com ração Controle e Megalac obtiveram uma maior taxa de concepção (33,3% e 30,8%, respectivamente) em relação ao grupo Soja (14,3%). As suplementações com concentrados adicionados de sais de cálcio de AGPI aumentaram as concentrações séricas de lipídios (colesterol total, HDL, LDL, lipídios totais), mas não desencadearam reflexos positivos nas concentrações circulantes de progesterona e nas taxas de concepção das búfalas.

**Palavras-chave:** AGPI, Búfalo, Colesterol, Gordura Protegida, Óleo de soja

**ABSTRACT** – The objective of the present study was to evaluate the effect of supplementation with calcium salts of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on the conception rate of buffaloes submitted to artificial insemination at fixed time (FTAI) and to quantify progesterone levels and lipid profile of these animals. Milk buffaloes (*Bubalus bubalis*, n = 120) of the Murrah breed were used, with a mean weight of  $452.27 \pm 6.55$  kg and BCS of  $3.41 \pm 0.05$ . All buffaloes were submitted to an ovulation synchronization protocol and from day FTAI (D0) divided into three supplementation treatments with the concentrates (0.5% PV) for 22 days. The treatments were: Control group: animals supplemented with standard concentrate; Soybean group: standard concentrate plus refined soybean oil and Megalac group: standard concentrate plus protected fat. The serum concentrations of total cholesterol, HDL, triglycerides and progesterone ( $P_4$ ) on days D-12 (pre-treatment) and D22 (post-treatment) were measured. The diagnosis of pregnancy was performed 30 days after the FTAI. There was a substantial increase in the consumption of unsaturated AGs for the Soja and Megalac groups, in the order of 174.43% and 198.47%, respectively, compared to the Control group. After 22 days of supplementation, serum concentrations of total cholesterol, HDL, LDL and total lipids were higher ( $P < 0.05$ ) in the treated groups compared to the Control group, and the circulating concentrations of  $P_4$  did not differ statistically between the Control, Soybean and Megalac groups, both for pregnant females ( $18.09 \pm 2.06$  vs.  $20.53 \pm 1.95$  vs  $18.76 \pm 1.36$ ,  $P = 0.6833$ , respectively) and for non-pregnant ( $4.15 \pm 1.06$  vs  $8.34 \pm 1.87$  vs.  $6.09 \pm 1.51$ ,  $P = 0.2105$ , respectively). The results of the conception rate at 30 days show that there was a difference between the groups ( $P = 0.0130$ ) Soybean, Control and Megalac, where buffaloes supplemented with Control and Megalac rations obtained a higher conception rate (33.3% and 30.8%, respectively) in relation to the Soja group (14.3%). Supplements with added concentrates of PUFA calcium salts increased serum lipid concentrations (total cholesterol, HDL, LDL, total lipids), but did not trigger positive reflexes in circulating progesterone concentrations and buffalo conception rates.

**Keywords:** PUFA, Buffalo, Cholesterol, Protected Fat, Soybean Oil

## 1. Introdução

Os búfalos estão geograficamente distribuídos ao redor do mundo, com um contingente de 199 milhões de cabeças, sendo 97% localizado na Ásia, com destaques para Índia (56,4%), Paquistão (18,4%) e China (11,9%)(FAO, 2016). Atualmente, no Brasil encontra-se o maior rebanho de búfalos das Américas, provavelmente devido à rusticidade e grande habilidade de adaptação a diversos ambientes, onde são explorados para a produção de carne, leite e tração animal (SANTOS *et al.*, 2016).

Vários trabalhos têm sido realizados nesta espécie para melhor entender e controlar o ciclo estral e a dinâmica folicular ovariana, buscando-se maximizar os resultados reprodutivos (BARUSELLI *et al.*, 2001; NEGLIA *et al.*, 2003; BARUSELLI; CARVALHO, 2005; GARCIA *et al.*, 2008; GHUMAN *et al.*, 2012). Porém, apesar do avanço dos programas de inseminação artificial, os resultados das taxas de concepção em bubalinos ainda são insatisfatórios.

Fator relevante destas biotécnicas são as perdas embrionárias decorrentes da síntese e liberação precoce de PGF2 $\alpha$ , acarretando em degeneração do corpo lúteo e perda gestacional, principalmente em rebanhos de búfalos (MALIK *et al.*, 2011; NAZIR *et al.*, 2013). Acredita-se que conceptos pequenos e subdesenvolvidos sejam incapazes de sinalizar e desencadear o reconhecimento materno da gestação, através da produção de interferon-tau (IFN- $\tau$ ) entre os dias 13 e 21 após a ovulação, para que ocorra o bloqueio na liberação uterina de PGF2 $\alpha$  e, assim, permitir a continuidade da secreção de progesterona pelo corpo lúteo e manutenção da gestação (BURNS *et al.*, 2003; SENGER, 2012).

A falência funcional e estrutural do corpo lúteo ocorre somente em casos de ausência de fertilização ou de não reconhecimento materno da gestação, com liberação de pulsos de PGF2 $\alpha$  pelas células endometriais entre o 15<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dia do ciclo estral (BERTAN, 2004). O efeito inibitório da síntese de prostaglandinas pode reduzir a incidência de perda embrionária precoce, com aumento nas taxas de concepção (THATCHER *et al.*, 1994; MATTOS *et al.*, 2002; AMBROSE *et al.*, 2006), devido ao aumento no reconhecimento materno da gestação (WATHES *et al.*, 2007).

Dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), principalmente os ácidos graxos (AGs) essenciais linoléico (C18:2; n6;  $\omega$ 6) e/ou linolênico (C18:3; n3;  $\omega$ 3), inibem a secreção precoce de prostaglandinas – PGs, em especial de PGF2 $\alpha$ , e retardam a luteólise (WILLIAMS & STANKO, 2000; CHENG *et al.*, 2001), favorecendo o reconhecimento de embriões ainda incapazes de sinalizar para o organismo materno (BURNS *et al.*, 2003). Sendo importante manter o equilíbrio entre a luteólise e mecanismos anti-luteolíticos para obter bons resultados nas taxas de concepção e consequente melhoria da eficiência reprodutiva em sistemas de criação de bovinos (BINELLI *et al.*, 2001) e bubalinos (NAZIR *et al.*, 2013).

Desta forma, são verificados resultados positivos após a suplementação de vacas com AGPI ricos em ácido linoleico, durante o tempo esperado de luteólise, inclusive em vacas submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo - IATF (LOPES *et al.*, 2009; 2011; CORDEIRO *et al.*, 2015) e transferência de embriões em tempo fixo - TETF (CORDEIRO *et al.*, 2015).

Em um trabalho recente (CORDEIRO *et al.*, 2015), a suplementação de vacas de corte com sementes de girassol, com grande concentração de extrato etéreo (10,1%) e  $\omega$ 6, melhorou a taxa de prenhez em protocolos de IATF ou TETF, tendo sido observado aumento de colesterol e da taxa de concepção (66,7% vs 47,7% em comparação ao grupo Controle) na IATF, e aumento de progesterona ( $5,8 \pm 0,4$  ng/mL vs  $3,5 \pm 0,4$  ng/mL) e taxa de concepção (55,7% vs 36,9%) na TETF.

Em búfalas leiteiras suplementadas com linhaça, rica em ácido linolênico (C18:3; n3;  $\omega$ 3), foram evidenciados impactos positivos no desempenho reprodutivo, com elevação das concentrações de progesterona plasmática e redução da secreção uterina de PGF2 $\alpha$ , durante o período de reconhecimento da gestação, com consequente incremento de 35,5% na taxa de concepção (NAZIR *et al.*, 2013).

Apesar dos resultados positivos, é sabido que ocorre biohidrogenação ruminal de gordura, o que pode impactar negativamente as ações pretendidas da suplementação com fontes de gordura. No ambiente ruminal, as diferentes fontes de gordura sofrem interações com a população microbiana, ocasionando mudanças no padrão de crescimento e função da microbiota e transformações nos lipídios ingeridos na dieta, com conversão por hidrólise e biohidrogenação dos AGs insaturados em saturados, os quais eventualmente alcançam os tecidos do corpo

(JENKINS, 2011). Porém, o uso de gorduras protegidas da ação ruminal (gordura by-pass, protegida ou inerte), constituídas de sais de cálcio de AGPI, permite a passagem de AGPI pelo rúmen sem sofrer biohidrogenação, sendo absorvidos somente nas condições ácidas do abomaso (JENKINS & PALMQUIST, 1984). A utilização de gordura protegida permite a absorção integral dos AGs fornecidos na dieta, o qual direciona o perfil de AGs dos tecidos e pode influenciar no desempenho reprodutivo (FUNSTON, 2004; RAES *et al.*, 2004). O uso de óleos vegetais na suplementação de búfalas leiteiras poderia incrementar os índices reprodutivos em programa de IATF, com foco principal na taxa de concepção.

Desta forma, a partir das evidências relatadas sobre os potenciais benefícios dos AGPI sobre a reprodução de fêmeas ruminantes, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com sais de cálcio de AGPI na taxa de concepção, nos níveis de progesterona e no perfil lipídico de búfalas submetidas à IATF.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Local e animais experimentais**

O experimento foi realizado na Fazenda Fiore di Bufala, Grupo Bubras, localizada no município de Tailândia (Pará, Brasil, 2<sup>o</sup>45'S e 48<sup>o</sup>58'O). Foram utilizadas 120 búfalas da raça Murrah, com peso médio de 452,27 ± 6,55 kg e escore de condição corporal (ECC) de 3,41 ± 0,05 (escala de 1 a 5). As fêmeas eram não gestantes, primíparas, lactantes e clinicamente híginas.

Os procedimentos experimentais adotados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Jaboticabal (protocolo nº5128/15).

### **2.2. Delineamento experimental**

Após avaliação clínica e reprodutiva, as búfalas selecionadas para o experimento foram sincronizadas e a partir do dia da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), as búfalas foram divididas em três grupos para a suplementação com os concentrados isoproteicos (18% proteína bruta-PB) e isoenergéticos (80% de nutrientes digestíveis totais - NDT) durante 22 dias (D0-D22). As exigências nutricionais foram de acordo com as recomendações de Paul e Lal (2010). As suplementações foram estimadas em 0,5% do peso vivo (PV) e fornecidas uma vez ao dia, pelo período da manhã (8 horas), em cochos coletivos com dimensão linear de 50 cm por animal.

Os animais foram distribuídos entre os tratamentos considerando o peso e ECC, com a finalidade de manter o equilíbrio entre os grupos, que foram constituídos da seguinte maneira: grupo Controle (n=40; ECC 3,46 ± 0,08; Peso 442,69 ± 10,99), animais alimentados com concentrado padrão composto de farelo de soja, trigo e milho triturado; grupo Soja (n=40; ECC 3,43 ± 0,07; Peso 460,17 ± 10,97), concentrado padrão acrescido de óleo de soja refinado (Soya<sup>®</sup>; Bunge Alimentos S/A, São Paulo, SP) e grupo Megalac (n=40; ECC 3,33 ± 0,09; Peso 453,33 ± 12,21), concentrado padrão acrescido de sais de cálcio de ácidos graxos poli-insaturados (gordura by-pass Megalac-E<sup>®</sup>; Elanco Saúde Animal, São Paulo, SP).

Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado, em três piquetes de *Urochloa brizantha* cv. *Marandu* com igual qualidade de forragem, contendo 96,81% matéria seca (MS), 92,03% matéria orgânica (MO), 3,27% extrato etéreo (EE), 2,62% proteína bruta (PB), 52,85% fibra bruta (FB), onde permaneceram por 7 dias em cada piquete, e assim remover qualquer efeito de mudanças na composição do pasto entre os piquetes. Os animais tinham livre acesso ao cocho de sal mineral e ao bebedouro de água.

### 2.3. Protocolo de sincronização do estro e ovulação

As sincronizações foram iniciadas em dia aleatório do ciclo estral (primeiro dia do protocolo de sincronização = Dia -12), com inserção do dispositivo intravaginal de 500 mg de progesterona (Primer® monodose, Tecnopec/Agener União Saúde Animal, Brasil) e, no mesmo momento, 2 mg de benzoato de estradiol intramuscular (BE, 2 mL, Sincrodiol®, OUROFINO Saúde Animal, Brasil). O dispositivo foi removido nove dias depois (Dia -3), quando as búfalas receberam 500 µg de Cloprostenol sódico (2 mL; Sincrocio®, OUROFINO Saúde Animal, Brasil) e 300 UI de eCG (1,5 mL; Novormon®, Zoetis, Brasil). O referido protocolo e o delineamento experimental estão representados na Figura 1.

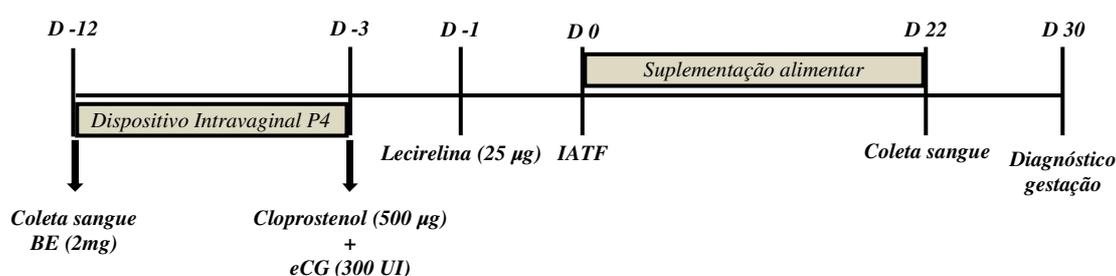


Figura 1 – Representação esquemática do delineamento experimental e do protocolo de sincronização da ovulação: inserção do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol IM (D-12), retirada do dispositivo intravaginal associado à administração de 500µg de Cloprostenol sódico e 300UI de eCG (D-3), administração de 25 µg de Lecirelina (D-1), realização da IATF (D0). As coletas de sangue foram realizadas no D-12 e D22 e o diagnóstico de gestação por ultrassonografia foi realizado no D30. Fornecimento dos concentrados do D0 ao D22, para as búfalas experimentais: grupo Controle (n = 40): concentrado padrão com milho, trigo e soja; grupo Soja (n = 40): concentrado padrão enriquecido de óleo de soja; grupo Megalac (n = 40): concentrado padrão enriquecido com Megalac-E®.

A ovulação foi induzida com 25 µg de Lecirelina (1 mL; Gestran plus®, Tecnopec/Agener União Saúde Animal, Brasil), administrada 48 horas após a remoção do dispositivo de progesterona (Dia -1). Todas as búfalas foram submetidas a protocolo de sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A inseminação artificial em tempo fixo foi realizada 16h após a aplicação de Lecirelina, e foi realizada por um único inseminador. O sêmen proveniente de três touros de fertilidade comprovada foi igualmente distribuído entre as búfalas inseminadas e alocadas nos tratamentos experimentais.

#### 2.4. Análise bromatológica

Amostras dos ingredientes e dos concentrados fornecidos aos animais foram identificadas e estocadas a -20°C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e moídas em moinho do tipo Willey com peneira de 1mm. As análises bromatológicas (Tabela 1) dos ingredientes utilizados nos concentrados foram realizados em duplicata.

Tabela 1 – Composição química dos ingredientes utilizados na formulação dos concentrados Controle, Soja e Megalac, fornecidos às búfalas no experimento

COMPOSIÇÃO QUÍMICA	Ingredientes dos concentrados				
	Milho triturado*	Farelo de soja*	Farelo de trigo*	Megalac E®	Óleo de soja
Matéria Seca (%)	88,21	87,02	88,98	96,51	100,00
Matéria Orgânica (% MS)	98,67	92,95	93,80	80,17	100,00
Extrato Etéreo (% MS)	3,30	3,59	2,94	82,00*	99,90
Proteína Bruta (% MS)	6,79	47,44	14,60	0,00	0,00
FDNcp (% MS)	9,50	18,24	48,43	0,00	0,00
FDAcp (% MS)	3,40	7,35	13,09	0,00	0,00
Cinzas (% MS)	1,33	7,05	6,20	19,83	0,00

Abreviaturas: FDNcp – Fibra em Detergente Neutro corrigida para cinzas e proteína; FDAcp – Fibra em Detergente Ácido corrigida para cinzas e proteína. \*Informação fornecida pelo fabricante.

\* Milho triturado, farelo de soja e farelo de trigo: componentes adicionados ao concentrado padrão (grupo Controle); Óleo de soja: adicionado ao concentrado padrão para composição do suplemento do grupo Soja; Megalac E®: adicionado ao concentrado padrão para composição do suplemento do grupo Megalac.

Por meio das análises bromatológicas e da proporção de ingredientes utilizados na confecção dos concentrados foram calculadas as composições químicas dos concentrados fornecidos às búfalas durante o experimento (Tabela 2). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus Belém.

Tabela 2 – Proporção dos ingredientes e composição química dos concentrados Controle, Soja e Megalac, fornecidos às búfalas no experimento

INGREDIENTES	Concentrados		
	Controle <sup>1</sup>	Soja <sup>2</sup>	Megalac <sup>3</sup>
<b>Composição centesimal (%)</b>			
Milho triturado	56,00	47,38	45,10
Farelo de soja	23,00	24,50	25,00
Farelo de trigo	20,00	20,00	20,00
Megalac	0,00	0,00	8,90
Óleo de soja	0,00	7,12	0,00
Calcário calcítico	1,00	1,00	1,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição química (%)</b>			
Matéria Seca (%)	88,21	89,03	88,92
Matéria Orgânica (% MS)	95,39	95,40	93,63
Extrato Etéreo (% MS)	3,26	10,14	10,27
NDT (% MS)	80,00	80,28	80,35
Proteína Bruta (% MS)	17,63	17,76	17,84
FDN (% MS)	31,60	29,30	28,71
FDA (% MS)	4,43	4,52	4,56
Cinzas (% MS)	4,61	4,60	6,37

Abreviaturas: NDT: Nutrientes Digestíveis Totais; FDN: Fibra em Detergente Neutro; FDA: Fibra em Detergente Ácido; <sup>1</sup>Controle: concentrado padrão com milho, trigo e soja; <sup>2</sup>Soja: concentrado padrão adicionado de óleo de soja; <sup>3</sup>Megalac: concentrado padrão adicionado de Megalac-E®.

Nas análises foram obtidos os teores de: matéria seca (MS; método INCT-CA G-003/1), matéria orgânica (MO; INCT-CA M-001/1), proteína bruta (PB; método INCT-CA N-001/1), extrato etéreo (EE; INCT-CA G-005/1), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp; INCT-CA F-002/1, INCT-CA M-002/1 e INCT-CA N-004/1), e fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína

(FDAcp; INCT-CA F-004/1, INCT-CA M-003/1 e INCT-CA N-005/1), conforme métodos preconizados pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (INCT-CA) (DETMANN *et al.*, 2012).

A extração da fração lipídica dos concentrados foi realizada de acordo com o método butt soxhlet (AOCS, 2009) e a análise do perfil de ácidos graxos (Tabela 3) foi realizado em cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 68650 series GC system, AGILENT, EUA).

Tabela 3 – Composição em ácidos graxos dos concentrados Controle, Soja e Megalac, fornecidos às búfalas no experimento

Composição em Ácidos Graxos	Concentrados		
	Controle <sup>1</sup> (% m/m)	Soja <sup>2</sup> (% m/m)	Megalac <sup>3</sup> (% m/m)
<b>SATURADOS</b>	<b>26,60</b>	<b>37,72</b>	<b>32,09</b>
C 10:0 (Cáprico)	0,03	0,05	0,03
C 12:0 (Láurico)	0,14	0,27	0,12
C 14:0 (Mirístico)	0,19	0,33	0,25
C 15:0 (Pentadecanóico)	0,13	0,11	0,16
C 16:0 (Palmítico)	19,96	25,01	23,14
C 17:0 (Margárico)	0,18	0,23	0,20
C 18:0 (Esteárico)	4,41	9,21	6,37
C 20:0 (Araquídico)	0,59	1,00	0,68
C 22:0 (Behênico)	0,42	0,96	0,68
C 24:0 (Lignocérico)	0,55	0,55	0,46
<b>INSATURADOS</b>	<b>73,40</b>	<b>62,28</b>	<b>67,91</b>
C 16:1 (Palmitoléico)	0,28	0,18	0,24
C 17:1 (cis-10-Heptadecenóico)	0,06	0,08	0,07
C 18:1 (Oleico)	27,22	32,74	30,94
C 18:1 trans (Elaídico)	0,00	0,00	5,05
C 18:2 (Linoleico; $\omega$ 6)	42,61	27,09	29,90
C 18:2 trans (t-Linoleico)	0,16	0,11	0,08
C 18:3 (Linolênico; $\omega$ 3)	2,59	1,74	1,25
C 18:3 trans (t-Linolênico)	0,00	0,00	0,09
C 20:1 (Eicosenoico)	0,48	0,34	0,29
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup>Controle: concentrado padrão com milho, trigo e soja; <sup>2</sup>Soja: concentrado padrão adicionado de óleo de soja; <sup>3</sup>Megalac: concentrado padrão adicionado de Megalac-E®.

O cromatógrafo utiliza coluna capilar DB 23 Agilent (50% cyanopropyl)-methylpoysiloxane, com dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 µm de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo de coluna 1,00 mL/min.; velocidade linear 24 cm/s.; temperatura do detector 280° C; temperatura do injetor 250° C; temperatura do forno 110°C mantida durante 5 min., aquecimento de 110 a 215 °C (5 °C/min.), e manutenção a 215°C durante 24 min.; gás de arraste Hélio; e volume injetado 1,0 µL. A análise foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras da Universidade de Campinas, SP, Brasil (DTA, FEA, UNICAMP).

## **2.5. Colheita e processamento de sangue**

Amostras de sangue foram colhidas nos dias D-12 (pré-tratamento) e D22 do período experimental, através de venopunção da veia jugular com uma agulha 21 Ga (Labor Import Imp. Exp. Ltda), dentro de um tubo estéril sem anticoagulante e com ativador de coágulo (Vacutainer, 10 mL, Becton Dickinson, EUA). Para a obtenção do soro sanguíneo, os tubos foram centrifugados (Centrífuga Marca Quimis, São Paulo, BR) a 1500 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente. A fração soro foi subdividida em triplicatas e as amostras foram identificadas e acondicionadas em frascos de eppendorf, os quais foram congelados à temperatura de -20°C até o momento das análises de metabólitos e hormônios, com descongelamento único.

## **2.6. Dosagens de metabólitos sanguíneos e progesterona**

Os valores dos substratos sanguíneos colesterol total, colesterol fração HDL e triglicerídeos foram determinados nas amostras de sangue coletadas nos dias D-12 (pré-tratamento) e D22 do período experimental, por meio de reações enzimáticas colorimétricas, utilizando *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) e com mensuração em analisador bioquímico automático (BS 120®, Shenzhen Mindray bio-medical electronics co. Ltda, China), de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal, de acordo com os

métodos descritos por Allain *et al.* (1974) e Fossati & Lorenzo (1982). Os lipídios totais representam a soma do colesterol total com os triglicerídeos (FRIEDEWALD *et al.*, 1972). As concentrações plasmáticas de LDL foram determinadas pela Equação de Friedewald, onde:  $LDL \text{ mg/dL} = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + \text{triglicerídeos}/5)$ .

As concentrações de progesterona ( $P_4$ ) foram quantificadas nas amostras de sangue coletadas no dia D22 do período experimental, em laboratório credenciado pela técnica de radioimunoensaio (RIA), utilizando *kits* comerciais (MP Biomedicals, California, USA), e de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram analisadas somente após a finalização do experimento. A quantidade mínima detectável de progesterona foi 0,187 ng. Os coeficientes de variação intra e inter ensaios foram 6,95% e 8,67%, respectivamente. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal, sediado na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo.

## 2.7. Diagnóstico de prenhez

O diagnóstico de prenhez foi realizado 30 dias após a inseminação artificial, por meio de ultrassonografia transretal (Scanner DP-3300Vet, Shenzhen Mindray, China, acoplado a um transdutor linear de 5,0 MHz), sendo constatada a presença ou ausência do feto, o que classifica as fêmeas como prenhas ou não prenhas, respectivamente.

## 2.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistical Analysis System for Windows (SAS, 2003; versão 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A normalidade das variáveis foi avaliada pela ferramenta de dados do SAS (Proc Univariate, Shapiro-Wilk test). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo procedimento GLM e Kruskal-Wallis do SAS, e as comparações de médias pelo teste de Tukey (Proc GLM - HSD Tukey) ou pelo teste de Dunn. Os parâmetros das variáveis foram expressos como média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM), e foi considerado um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

### 3. Resultados

Os resultados de consumo médio diário, com a descrição detalhada dos tipos de ácidos graxos ingeridos nos concentrados Controle, Soja e Megalac fornecidos às búfalas, durante o experimento, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Consumo médio de matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT), proteína bruta (PB) e de ácidos graxos (AGs) das búfalas

<b>Composição em Ácidos Graxos</b>	<b>Consumo médio (g/animal/dia)</b>		
	Controle <sup>1</sup>	Soja <sup>2</sup>	Megalac <sup>3</sup>
<i>MS</i>	2213±55	2301±55	2267±61
<i>NDT</i>	1770	1847	1821
<i>PB</i>	390	409	404
<b>AGs SATURADOS</b>	<b>19,19</b>	<b>88,01</b>	<b>74,68</b>
<i>C 10:0 (Cáprico)</i>	0,02	0,12	0,07
<i>C 12:0 (Láurico)</i>	0,10	0,63	0,28
<i>C 14:0 (Mirístico)</i>	0,14	0,77	0,58
<i>C 15:0 (Pentadecanóico)</i>	0,09	0,26	0,37
<i>C 16:0 (Palmítico)</i>	14,40	58,35	53,85
<i>C 17:0 (Margárico)</i>	0,13	0,54	0,47
<i>C 18:0 (Esteárico)</i>	3,18	21,49	14,82
<i>C 20:0 (Araquídico)</i>	0,43	2,33	1,58
<i>C 22:0 (Behênico)</i>	0,30	2,24	1,58
<i>C 24:0 (Lignocérico)</i>	0,40	1,28	1,07
<b>AGs INSATURADOS</b>	<b>52,95</b>	<b>145,31</b>	<b>158,04</b>
<i>C 16:1 (Palmitoléico)</i>	0,20	0,42	0,56
<i>C 17:1 (cis-10-Heptadecenóico)</i>	0,04	0,19	0,16
<i>C 18:1 (Oleico)</i>	19,64	76,39	72,00
<i>C 18:1 trans (Elaídico)</i>	0,00	0,00	11,75
<i>C 18:2 (Linoleico; ω6)</i>	30,74	63,21	69,58
<i>C 18:2 trans (t-Linoleico)</i>	0,12	0,26	0,19
<i>C 18:3 (Linolênico; ω3)</i>	1,87	4,06	2,91
<i>C 18:3 trans (t-Linolênico)</i>	0,00	0,00	0,21
<i>C 20:1 (Eicosenoico)</i>	0,35	0,79	0,67
<b>Total</b>	<b>72,14</b>	<b>233,32</b>	<b>232,72</b>
<i>Relação insaturados/saturados</i>	2,76	1,65	2,12

<sup>1</sup>Controle: concentrado padrão com milho, trigo e soja; <sup>2</sup>Soja: concentrado padrão adicionado de óleo de soja; <sup>3</sup>Megalac: concentrado padrão adicionado de Megalac-E®; Relação ω6/ω3: relação ômega 6/ômega3.

Os valores das concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e lipídios totais estão apresentados na Tabela 5. Pode-se observar que as concentrações circulantes de colesterol total, LDL e lipídios totais antes da suplementação (D-12; pré-tratamento) não diferiram entre os grupos Soja, Controle e Megalac ( $P>0,05$ ).

Após 22 dias de suplementação, as concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL e lipídios totais foram mais elevadas ( $P<0,05$ ) nos grupos tratados Soja e Megalac em comparação ao grupo Controle (Tabela 5), e somente a concentração circulante de triglicerídeos não foi afetada pelos diferentes concentrados fornecidos às búfalas ( $P>0,05$ ).

Tabela 5 – Concentração de metabólitos sanguíneos (média  $\pm$  EPM) em búfalas leiteiras, antes do arraçamento (D-12) e 22 dias após início da suplementação (D22) com concentrados Controle, Soja e Megalac

<i>Variável</i>	<i>Período pré-suplementação (D -12)</i>				
	<i>Col<sup>4</sup> (mg/dL)</i>	<i>HDL<sup>5</sup> (mg/dL)</i>	<i>LDL<sup>6</sup> (mg/dL)</i>	<i>Trig<sup>7</sup> (mg/dL)</i>	<i>Lipid<sup>8</sup> (mg/dL)</i>
<i>Controle<sup>1</sup></i>	82,77 $\pm$ 2,68 <sup>a</sup>	41,39 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup>	31,95 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>	31,92 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	114,69 $\pm$ 3,04 <sup>a</sup>
<i>Soja<sup>2</sup></i>	85,07 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	45,50 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	30,10 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup>	24,32 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>	109,39 $\pm$ 2,58 <sup>a</sup>
<i>Megalac<sup>3</sup></i>	86,76 $\pm$ 2,63 <sup>a</sup>	44,22 $\pm$ 1,04 <sup>ab</sup>	31,61 $\pm$ 2,57 <sup>a</sup>	28,08 $\pm$ 1,31 <sup>b</sup>	114,84 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>
<b>Valor de P</b>	<b>0,5639</b>	<b>0,0453</b>	<b>0,8381</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,3110</b>
<i>Variável</i>	<i>Período pós-suplementação (D 22)</i>				
	<i>Col (mg/dL)</i>	<i>HDL (mg/dL)</i>	<i>LDL (mg/dL)</i>	<i>Trig (mg/dL)</i>	<i>Lip (mg/dL)</i>
<i>Controle<sup>1</sup></i>	76,79 $\pm$ 3,67 <sup>b</sup>	43,23 $\pm$ 1,69 <sup>b</sup>	28,64 $\pm$ 2,46 <sup>b</sup>	25,69 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	102,47 $\pm$ 4,12 <sup>b</sup>
<i>Soja<sup>2</sup></i>	91,29 $\pm$ 3,52 <sup>a</sup>	49,37 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	37,44 $\pm$ 2,23 <sup>a</sup>	24,43 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	116,69 $\pm$ 4,14 <sup>a</sup>
<i>Megalac<sup>3</sup></i>	93,43 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>	50,15 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>	35,97 $\pm$ 2,21 <sup>a</sup>	25,92 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	118,21 $\pm$ 4,05 <sup>a</sup>
<b>Valor de P</b>	<b>0,00190</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,0165</b>	<b>0,6012</b>	<b>0,0146</b>

Abreviaturas: <sup>1</sup>Controle: concentrado padrão com milho, trigo e soja; <sup>2</sup>Soja: concentrado padrão adicionado de óleo de soja; <sup>3</sup>Megalac: concentrado padrão adicionado de Megalac-E®. Abreviaturas: <sup>4</sup>Col: colesterol total; <sup>5</sup>HDL: HDL colesterol; <sup>6</sup>LDL: LDL colesterol; <sup>7</sup>Trig: triglicerídeos; <sup>8</sup>Lipid: lipídios totais.

As concentrações circulantes de P<sub>4</sub> das búfalas leiteiras, após o período de suplementação de 22 dias (Figura 2), não diferiram estatisticamente entre os grupos Controle, Soja e Megalac, tanto para as fêmeas prenhas (respectivamente aos grupos: 18,09 $\pm$ 2,06 vs 20,53 $\pm$ 1,95 vs 18,76 $\pm$ 1,36;  $P= 0,6833$ ) quanto para as não prenhas (respectivamente aos grupos: 4,15 $\pm$ 1,06 vs 8,34 $\pm$ 1,87 vs 6,09 $\pm$ 1,51;  $P= 0,2105$ ).

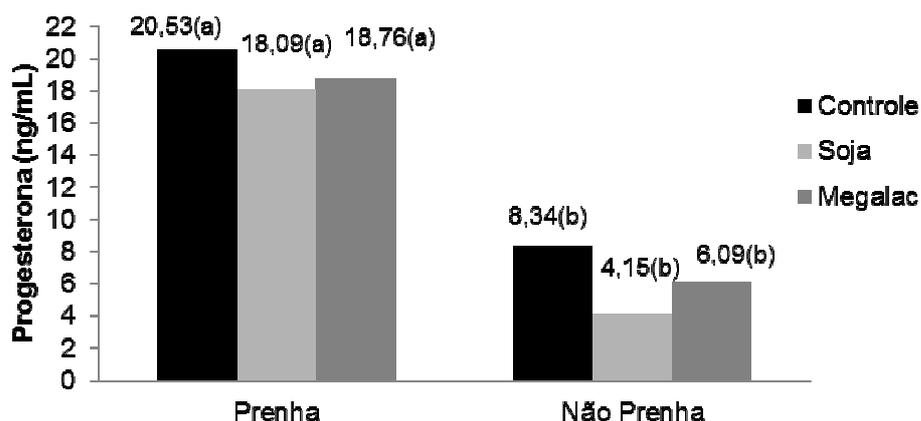


Figura 2. Médias para progesterona sérica (ng/mL) das búfalas prenhas e não prenhas, no dia 22 de suplementação alimentar com concentrados Controle, Soja e Megalac. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.

Os resultados da taxa de concepção aos 30 dias estão apresentados na Figura 3, e demonstram que houve diferença entre os grupos ( $P = 0,0130$ ) Soja, Controle e Megalac, de tal forma que as búfalas suplementadas com ração Controle e Megalac obtiveram uma maior taxa de concepção (33,3% e 30,8%, respectivamente) na IATF em relação ao grupo Soja (14,3%).

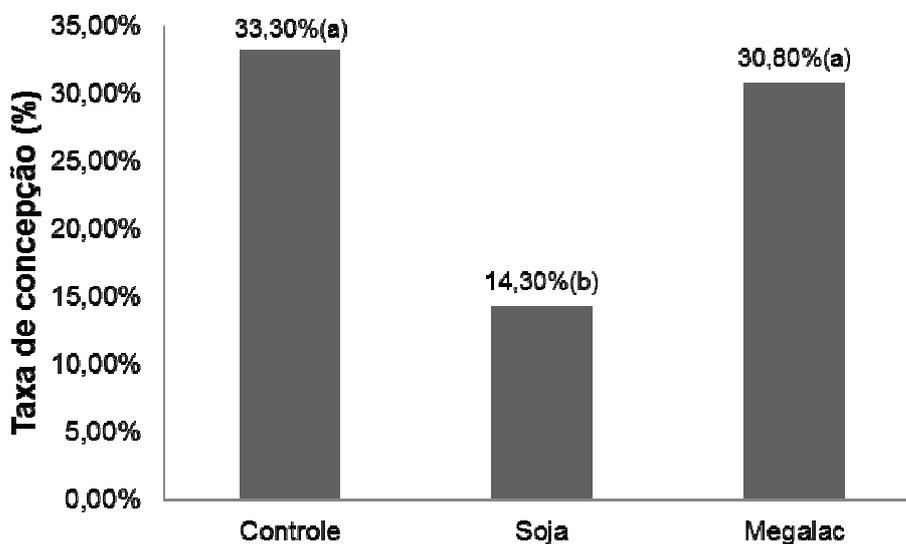


Figura 3. Médias para taxa de concepção aos 30 dias das búfalas suplementadas com concentrados Controle, Soja e Megalac. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.

#### 4. Discussão

No presente estudo, os concentrados fornecidos às búfalas foram produzidos com farelos e sementes de oleaginosas, acrescidos de óleos vegetais, e apresentaram excelente consumo voluntário devido à sua palatabilidade. Os consumos médios diários de MS, NDT e PB foram muito próximos entre os tratamentos (diferentes concentrados), o que já era esperado, pois as formulações foram balanceadas de forma a serem isoproteicas e isoenergéticas, para evitar restrição no consumo voluntário das búfalas, apesar da adição do óleo de soja em um dos grupos (grupo Soja).

Porém, conforme definido na metodologia do experimento, houve maior concentração de extrato etéreo nos concentrados dos grupos tratados com óleo de Soja e Megalac, com incremento na ingestão lipídica pelas búfalas do grupo Soja (10,14%) e Megalac (10,27%) em comparação ao grupo Controle (3,26%). Houve maior ingestão de AGs totais e AGs insaturados nos grupos Soja (233,32 g/dia e 145,31 g/dia, respectivamente) e Megalac (232,72 g/dia e 158,04 g/dia, respectivamente) em relação ao grupo Controle (72,14 g/dia e 52,95 g/dia, respectivamente). Desta forma, houve um maior consumo de AGs insaturados para os grupos Soja e Megalac, na ordem de 174,43% e 198,47% respectivamente, em comparação ao grupo Controle.

O consumo dos concentrados com alto teor lipídico (10% de E.E.) resultou no aumento efetivo das concentrações séricas de colesterol (total, HDL e LDL) dos grupos tratados frente ao grupo Controle, mas as concentrações não extrapolaram os padrões de referência para búfalas leiteiras (89-134 mg/dl) descritos por Arshad *et al.* (2005) e Hagawane *et al.* (2009).

Todavia, o aumento na lipídemia sanguínea observado no presente estudo não resultou em elevação nas concentrações circulantes de  $P_4$  nas búfalas prenhas e não prenhas, diferente dos efeitos positivos relatados por Nazir *et al.* (2013) com elevações de colesterol,  $P_4$  e taxa de concepção (66,7% vs 31,2%) em búfalas suplementadas com sementes de linhaça (59,4% de  $\omega_3$ ). Existe relatos sobre os efeitos positivos do uso de AGPI na dieta sobre a atividade ovariana, resultando em maiores diâmetros de folículos, de corpos lúteos e nas concentrações de esteróides

circulantes (HIGHTSHOE *et al.*, 1991), principalmente progesterona, que pode influenciar na fertilidade de búfalas suplementadas. Porém, a ausência de efeitos neste estudo sobre as concentrações de  $P_4$  pode ser devida ao momento do ciclo em que as dietas foram fornecidas [somente após a inseminação (D0 - D22) das búfalas sincronizadas, ou seja, fora do período de crescimento folicular ovariano], visto que os folículos que deram origem ao CL não foram expostos aos tratamentos, o que conseqüentemente não afetou a qualidade dos mesmos.

No presente trabalho, investigou-se os efeitos da suplementação com diferentes fontes de AGs após a IATF sobre a manutenção do CL, com o possível retardamento da luteólise e, conseqüentemente, aumento na taxa de concepção. Os ácidos graxos presentes nos óleos vegetais que são utilizados na alimentação de ruminantes podem melhorar a fertilidade por ação no trato reprodutivo (SARTORI & GUARDIEIRO, 2010), com resultados inclusive na inibição da síntese de  $PGF2\alpha$  endometrial bovina (WILLIAMS & STANKO, 2000; CHENG *et al.*, 2001; MATTOS *et al.*, 2002; AMBROSE *et al.*, 2006, CHILDS *et al.*, 2008) e bubalina (MALIK *et al.*, 2011; NAZIR *et al.*, 2013). Mais especificamente, o ácido linoleico e os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, tais como o eicosapentaenoico (EPA;  $C20:5n-3$ ) e docosa-hexaenoico (DHA;  $C22:6n-3$ ), agem como inibidores competitivos pela enzima prostaglandina endoperoxídeo sintases (PGHS), que atua no processo de síntese das prostaglandinas (THATCHER *et al.*, 2004). Desta forma, esses ácidos graxos interferem na conversão do ácido araquidônico à  $PGF2\alpha$  (BINELLI *et al.*, 2001). Como resultado, a inibição da síntese de  $PGF2\alpha$  endometrial mantém a secreção de progesterona luteal, que favorece a gestação ainda não sinalizada pelo concepto (BURNS *et al.*, 2003). Porém, no presente estudo, a adição de sais de cálcio de AGPI não afetou a taxas de concepção das búfalas (33,3% Controle vs 30,8% Megalac) na IATF, diferente dos resultados de Nazir *et al.* (2013), que relataram incremento de 35,5% na taxa de concepção das búfalas suplementadas com linhaça.

Com relação ao concentrado soja, houve uma redução da taxa de concepção (14,3% vs 33,3%) na IATF das búfalas em relação ao grupo Controle, sendo que os mecanismos e efeitos sobre o trato reprodutivo não ficaram bem esclarecidos. Porém, acredita-se que possam estar relacionados com a hidrólise e

biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos ingeridos, de tal forma que o perfil de AGs absorvido no abomaso possa ter sido mais saturado no grupo soja do que nos demais tratamentos (Controle e Megalac). Fato semelhante já foi relatado em vacas leiteiras, quando mais de 70% do ácido linoléico e de 85% do ácido linolênico foram biohidrogenados no rúmen (JUCHEM, 2007), com alteração do perfil de AGs absorvido pelo abomaso.

Seguindo este raciocínio, devido ao processo de biohidrogenação ruminal, o perfil de AGs disponibilizado para a circulação sanguínea e os tecidos corporais das búfalas no grupo Soja pode ter sido mais saturado em comparação aos demais grupos. Este perfil saturado de AGs na corrente circulatória pode ter desencadeado um processo de lipoperoxidação plasmática nas búfalas, influenciando negativamente no sistema reprodutivo e ocasionando uma baixa taxa de concepção no grupo Soja, à semelhança dos relatos de Scislowski *et al.* (2005a;b) com bovinos.

## **5. Conclusão**

As suplementações com concentrados adicionados de sais de cálcio de AGPI, como um dos ingredientes, aumentam as concentrações séricas de lipídios (colesterol total, HDL, LDL, lipídios totais), mas não desencadearam reflexos positivos nas concentrações circulantes de progesterona das búfalas.

A suplementação com concentrados produzidos com a utilização de sais de cálcio de AGPI, não proporcionou o incremento desejado nas taxas de concepção, pois o grupo com gordura protegida obteve taxa semelhante ao grupo controle.

Os resultados demonstram que é possível manter um bom aporte de P<sub>4</sub> e uma satisfatória taxa de concepção, com a utilização de concentrados tradicionais produzidos a partir de grãos de oleaginosas e sem a adição de gordura protegida, e assim, permitir uma redução de custos na suplementação de búfalas.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Embrapa pelo apoio financeiro, e a Fazenda Fiore di Bufala, pertencente ao Grupo Bubras, pela parceria no uso das instalações e

animais experimentais e, agradece ainda, aos Laboratórios de: Nutrição Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), PA, Brasil; Óleos e Gorduras da Universidade de Campinas (DTA, FEA, UNICAMP), SP, Brasil; Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), PA, Brasil; Endocrinologia Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil, pela realização de análises.

## Referências

- [1] ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; Richmond, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 470-475, 1974.
- [2] AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A.; ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in  $\alpha$ -linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.8, p.3066–3074, 2006.
- [3] AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign, USA, AOCS, 2009.
- [4] ARSHAD, H.M.; AHMAD, N.; ZIA-UR-RAHMAN; SAMAD, H.A.; AKHTAR, N.; ALI, S. Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes. **Pakistan Veterinary Journal**, v.25, p.189-92, 2005.
- [5] BARUSELLI, P.S.; AMARAL, R.; BARUFI, F.B.; VALENTIM, R.; MARQUES, M. de O. Lecirelin and buserelin (gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 142-145, 2001.
- [6] BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N. A. T. de. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.1, p. 4-17, 2005.
- [7] BERTAN, C.M. Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  no endométrio de fêmeas bovinas. 2004. 185f. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- [8] BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451–1463, 2001.

- [9] BURNS, P.D.; ENGLE, T.E.; HARRIS, M.A.; ENNS, R.M.; WHITTIER, J.C. Effect of fish meal supplementation on plasma and endometrial fatty acid composition in nonlactating beef cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2840–2846, 2003.
- [10] CHENG, Z.; ROBINSON, R.S.; PUSHPAKUMARA, P.G.A.; MANSBRIDGE, R.J.; WATHES, D. C. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow. **Journal of Endocrinology**, v.171, p.463–473, 2001.
- [11] CHILDS, S.; LYNCH, C.O.; HENNESSY, A.A.; STANTON, C.; WATHES, D.C.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; KENNY, D.A. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers. **Animal**, v.2, p.883-893, 2008.
- [12] CORDEIRO, M. B.; PERES, M. S.; SOUZA, J. M. de; GASPAR, P.; BARBIERI, F.; SÁ FILHO, M. F.; MATURANA FILHO, M.; DINARDI, R. N.; NOGUEIRA, G. P.; MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; MARTINS, T.; BINELLI, M.; MEMBRIVE, C.M.B. Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. **Theriogenology**, v.83, p.1461-1468, 2015.
- [13] DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; *et al.* **Métodos para análise de alimentos** – INCT – Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.
- [14] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>; 2016 [acessado 27 janeiro 2018].
- [15] FOSSATI P.; LORENZO P. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v.28, p.2077-2080, 1982.
- [16] FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.L.; FREDRICKSON, D.L. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**. V.18, p.499–502, 1972.
- [17] FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v.82(Suppl.), p.154-161, 2004.
- [18] GARCIA, A.R.; NAHÚM, B. de S.; LOURENÇO JUNIOR, J. de B.; COSTA, N. A. da; GONÇALVES, K. da S.; MIYASAKI, M. Y. A.; ANDRADE, A. F. C. de; ARRUDA, R. P. de. Associação da medroxiprogesterona ao protocolo Ovsynch para inseminação artificial em tempo fixo de búfalas cíclicas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia Oriental. **Acta Amazonica** (Impresso), v. 38, p. 369-377, 2008.

- [19] GHUMAN, S.P.S.; HONPARKHE, M.; SINGH, J.; DHAMI, D.S.; KUMAR, A.; NAZIR, G.; AHUJA, C.S. Fertility response using three estrus synchronization regimens in lactating anestrus buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v.82, p.162-166, 2012.
- [20] HAGAWANE, S.D.; SHINDE, S.B.; RAJGURU, D.N. Hematological and blood biochemical profile in lactating buffaloes in and around Parbhani city. **Veterinary World**, v.2, p.467-469, 2009.
- [21] HIGHTSHOE, R.B.; COCHRAN, R.C.; CORAH, L.R.; KIRACOFE, G.H.; HARMON, D.L.; PERRY, R.C. Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4097-103, 1991.
- [22] JENKINS, T.C. **Feed Ingredients/Feed Supplements: Fats and Protected Fats**. In Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), edited by John W. Fuquay, Academic Press, San Diego, 2011, p.363-370.
- [23] JENKINS, T.C.; PALMQUIST, D.L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.978-986, 1984.
- [24] JUCHEM, S. O. Lipid Digestion and Metabolism in dairy cows: effects on production, reproduction and health. 2007. **Phd thesis**, University of California Davis, 2007.
- [25] LOPES, C.N.; SCARPA, A.B.; CAPPELLOZZA, B.I.; COOKE, R.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3935-3943, 2009.
- [26] LOPES, C.N.; COOKE, R.F.; REIS, M.M.; PERES, R.F.G.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategic supplementation of calcium salts of polyunsaturated fatty acids to enhance reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.89, p.3116-3124, 2011.
- [27] MALIK, A.A.; GANDOTRA, V. K.; BRAR, P.S.; GHUMAN, S.P.S.; DHALIWAL, G.S. Attenuation of luteolytic response following fish meal supplementation in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*), **Animal Reproduction Science**, v.126, n.1–2, p.45-49, 2011.
- [28] MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; WILLIAMS, J.; AMOROCHO, A.; MCGUIRE, M.A.; THATCHER, W.W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. **Journal Dairy Science**, v.85, p.755–764, 2002.

- [29] NAZIR, G.; GHUMAN, S.P.S.; SINGH, J.; HONPARKHE, M.; AHUJA, C.S.; DHALIWAL, G.S.; SANGHA, M.K.; SAIJPAUL, S.; AGARWAL, S.K. Improvement of conception rate in postpartum flaxseed supplemented buffalo with Ovsynch + CIDR protocol. **Animal Reproduction Science**, v.137, p.15-22, 2013.
- [30] NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R.; DE ROSA, C.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Comparison of pregnancy rates with two oestrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. **Theriogenology**, v.60, p.125–133, 2003.
- [31] PAUL, S. S.; LAL, D. **Nutrient requirements of buffaloes**. India: SSPH, 2010.137p
- [32] RAES, K.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.113, p.199-221, 2004.
- [33] SANTOS, C. L. R. dos; SANTOS JUNIOR, J. B. dos; CUNHA, M. C. da; NUNES, S. R. F.; BEZERRA, D. C.; TORRES JUNIOR, J. R. de S.; CHAVES, N. P. Nível tecnológico e organizacional da cadeia produtiva da bubalinocultura de corte no estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, 1-8, 2016.
- [34] SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.39, p.422-432, 2010.
- [35] SAS Institute Inc. 2003. **Statistical analysis system**. Release 9.1. (Software). Cary. USA.
- [36] SCISLOWSKI, V.; BAUCHART, D.; GRUFFAT, D.; LAPLAUD, P.M.; DURAND, D. Effect of dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on peroxidizability of lipoproteins in steers. **Lipids**, v.40,p.1245-1256, 2005a.
- [37] SCISLOWSKI, V.; BAUCHART, D.; GRUFFAT, D.; LAPLAUD, P.M.; DURAND, D. Effects of dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids, and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. **Journal of Animal Science**, v.83, p.2162-2174, 2005b.
- [38] SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy & parturition**. Illinois: Current Conceptions Inc., 2012. p. 280-281.
- [39] THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; DANET-DESNOYERS, G.; OLDICK, B.; SCHMITT, E.P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v.72 (Suppl. 3), p.16–30, 1994.

- [40] THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; MACLAREN, L; BILBY, T.R. Efeitos biológicos dos lipídios em parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras em lactação. In: Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, 8, 2004, Uberlândia, MG. **Anais...** Uberlândia: Conapec Jr; Botucatu: UNESP, 2004. p.115-132.
- [41] WATHES, D. C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77,p.190-201, 2007.
- [42] WILLIAMS, G. L.; STANKO, R. L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.77 (E. Suppl.), p.1-12, 2000.