



# Marcadores metabólicos e produção de leite de vacas da raça Holandesa submetidas a diferentes protocolos de aplicação de cianocobalamina e butafosfan no pós-parto recente

## Metabolic markers and milk production by Holstein cows undergoing different protocols with cyanocobalamin and butaphosphan postpartum

Rafael Herbstrith Krusser\*<sup>1</sup> , Thais Casarin da Silva\*<sup>1</sup> , Matheus Wrege Meireles Barbosa<sup>1</sup> , Josiane de Oliveira Feijó<sup>1</sup> , Uriel Secco Londero<sup>1</sup> , Viviane Rohrig Rabassa<sup>1</sup> , Francisco Augusto Burkert Del Pino<sup>1</sup> , Nathaly Ana Carpinelli<sup>1</sup> , Antônio Amaral Barbosa<sup>1</sup> , Marcio Nunes Corrêa<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

\*autor correspondente: thais\_casarin@hotmail.com

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes protocolos de administração da associação de cianocobalamina e butafosfan no pós-parto recente de vacas da raça Holandesa sobre marcadores metabólicos e produção de leite. Foram utilizadas 154 vacas da raça Holandesa, múltiparas, mantidas em sistema *Free-stall* e divididas em cinco grupos, utilizando como critérios de randomização o número de lactações e a data provável do parto. Os animais receberam aplicações por via intramuscular após o parto da associação de 100 mg/mL de butafosfan e 0,05 mg/mL de cianocobalamina, em volume de 1 mL para cada 20 kg de peso vivo, variando apenas os dias de aplicação: **T1:** no dia do parto (dia 0) (n=36); **T2:** dias 0 e 3 (n = 31); **T3:** dias 0 e 7 (n = 30); **T4:** dias 0, 3 e 7 (n = 28). O grupo controle (**GC**) recebeu solução fisiológica nos dias 0, 3 e 7 (n = 29). As amostras de sangue foram coletadas para avaliação de metabólitos nos dias 0, 7, 21 e 30 pós-parto. A produção de leite foi registrada uma vez por semana até 98 dias em lactação. Observou-se que o grupo T4 apresentou a média de produção de leite maior (25,87±0,34 kg/dia; P < 0,001) do que os demais grupos. O protocolo com a administração da associação de butafosfan e cianocobalamina aplicado nos dias 0, 3 e 7 pós-parto foi o mais eficiente em relação a produção de leite e contribuiu para um melhor metabolismo energético e hepático dos animais.

**Palavras-chave:** balanço energético negativo; fósforo orgânico; vitamina B12

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the effects of different protocols combining cyanocobalamin and butaphosphan on metabolic markers and milk production by Holstein cows postpartum. We used 154 multiparous cows housed in a free-stall system and divided into five groups, using the number of lactations and the probable date of calving as randomization criteria. The animals received intramuscular applications of a 100 mg/mL butaphosphan and 0.05 mg/mL cyanocobalamin combination. The treatment was delivered in a volume of 1 mL for every 20 Kg of body weight on varying treatment days as follows: treatment 1 (T1), on delivery day (day 0) (n=36); T2, days 0 and 3 (n = 31); T3: days 0 and 7 (n = 30); T4: days 0, 3 and 7 (n = 28). The control group (CG) received saline solution on days 0, 3 and 7 (n = 29). Blood samples were collected for metabolite evaluation on days 0, 7, 21 and

Recebido: 05 de setembro, 2023. Aceito: 21 de fevereiro, 2024. Publicado: 04 de julho, 2024.

30. Milk production was recorded once a week for up to 98 lactation days. T4 elicited higher average milk production ( $25.87 \pm 0.34$  kg/day;  $P < 0.001$ ) than all other groups. Administering butaphosphan and cyanocobalamin on days 0, 3 and 7 postpartum increased milk production and improved energy and liver metabolism in the animals.

**Keywords:** negative energy balance; organic phosphorus; B12 vitamin

## 1. Introdução

Durante o período pós-parto, a vaca leiteira passa por grandes mudanças fisiológicas, como a involução uterina e o início da produção de leite, que exigem grande aporte de nutrientes. Essa demanda geralmente não é atendida pela dieta, tornando o balanço energético negativo (BEN)<sup>(1)</sup>. Com isso, ocorre a intensificação da mobilização lipídica, aumentando as concentrações circulantes de ácidos graxos livres (AGL) e de corpos cetônicos, como o  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), para disponibilizar mais energia ao organismo<sup>(2,3)</sup>. Entretanto, quando essa mobilização ocorre de forma exacerbada predispõe a vaca leiteira a doenças metabólicas e infecciosas, como cetose, acidose ruminal e metrite<sup>(4)</sup>.

Para amenizar o BEN, podem ser utilizadas estratégias como a suplementação de butafosfan (fósforo orgânico) e cianocobalamina, que possuem efeitos positivos sobre o metabolismo<sup>(5,6)</sup>. O fósforo possui importante papel no metabolismo energético, atuando na síntese de fosfoproteínas e na fosforilação oxidativa para a síntese de adenosina trifosfato (ATP), além de atuar no metabolismo hepático reduzindo a expressão gênica de enzimas relacionadas à cetogênese e oxidação de ácidos graxos<sup>(7)</sup>. Já a cianocobalamina é a forma sintética da vitamina B12, que atua como co-fator da enzima metilmalonil-CoA mutase, que está envolvida na transformação do propionato em succinil-CoA para síntese de ATP<sup>(8,9)</sup>.

Estudos demonstraram que o uso associado de butafosfan e cianocobalamina no pós-parto de vacas leiteiras, pode reduzir a concentração de AGL e BHB<sup>(5)</sup> e favorecer a produção de leite<sup>(5,10)</sup>. Entretanto, apesar de existirem vários estudos que demonstram os efeitos positivos desta associação, estes apresentam diferentes protocolos de aplicação, variando o número de doses e dias pós-parto, o que dificulta a sua ampla utilização em sistemas produtivos<sup>(5,10,11)</sup>. Portanto, o objetivo deste estudo foi estabelecer o melhor protocolo de administração da associação de butafosfan e cianocobalamina no pós-parto recente de vacas leiteiras da raça Holandesa, através dos seus efeitos sobre marcadores metabólicos e produção de leite.

## 2. Material e Métodos

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (protocolo número 9378). O estudo foi realizado em uma fazenda comercial, leiteira, localizada no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizadas 154 vacas da raça Holandesa, multíparas, de duas a cinco lactações, criadas em sistema intensivo tipo *Free-stall*. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, em sistema mecanizado.

Os animais recebiam ração totalmente misturada (TMR) após cada ordenha (Tabela 1) e água à vontade. A dieta foi formulada para atender às necessidades nutricionais de vacas leiteiras de média produção no período pós-parto <sup>(23)</sup>, sendo composta por: 71,87% de silagem de milho, 10,27% de aveia pré-seca, 12,32% de polpa cítrica, 4,54% de farelo de soja, 0,80% de pré-mistura de vitaminas e 0,20% de ureia.

**Tabela 1** Ingredientes da dieta em matéria verde (MV) e seca (MS), além dos nutrientes em MS da TMR de vacas da raça Holandesa que receberam diferentes protocolos com associação de cianocobalamina e butafosfan via intramuscular, durante o período pós-parto.

Ingredientes	Kg/MV	kg/MS
Milho/silagem > 34%	29,17	10,93
Pré-secado de aveia	4,17	1,52
Polpa cítrica	5,00	4,29
Farelo de soja 44%	1,84	1,63
Ureia	0,08	0,08
Pré-mistura de vitaminas	0,33	0,33
Total	40,59	18,78

  

Nutrientes (TMR)	Porcentagem (%)
Matéria seca - (%)	46,31
NDT - (% MS)	69,17
Amido - (% MS)	17,36
Extrato etéreo - (% MS)	3,29
Carboidratos não fibrosos - (%)	39,80
Proteína bruta - (% MS)	12,39
Proteína degradável - (% MS)	8,43
Proteína não-degradável - (% MS)	3,96
Fibra em detergente ácido (FDA) - (% MS)	23,51
Fibra em detergente neutro (FDN) - (% MS)	39,61
Lignina - (% MS)	2,46
Cálcio - (% MS)	0,62
Fósforo - (% MS)	0,22
Magnésio - (% MS)	0,16
Potássio - (% MS)	1,32
Sódio - (% MS)	0,04
Cloro - (% MS)	0,24
Enxofre - (% MS)	0,14
Cinzas - (% MS)	7,25
DCAD (mEq/100g)	20,44

As vacas foram divididas em cinco grupos utilizando como critérios de randomização o número de lactações e a data provável do parto. Os grupos tratados receberam a combinação de 100 mg/mL de butafosfan e 0,05 mg/mL de cianocobalamina (Catosal B12®; ELANCO, São Paulo, Brasil). A dosagem administrada foi de 1mL para cada 20 kg de peso vivo, aplicado por via intramuscular, variando apenas os dias de aplicação: **T1**: no dia do parto (dia 0) (n=36); **T2**: dias 0 e 3 (n = 31); **T3**: dias 0 e 7 (n = 30); **T4**: dias 0, 3 e 7 (n = 28). O grupo controle (**GC**) recebeu solução fisiológica (0,9%) nos dias 0, 3 e 7 (n = 29), por via intramuscular.

O escore de condição corporal (ECC) e o peso dos animais foram aferidos nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 pós-parto. Foi utilizada uma escala de cinco pontos para atribuir o ECC, considerando um animal obeso igual a 5 e muito magro igual a 1 <sup>(12)</sup>. Em relação a

pesagem, foi utilizada uma fita graduada específica para gado leiteiro<sup>(13)</sup>. A produção de leite foi registrada uma vez por semana até 98 dias em lactação (DEL) através do sistema GEA Farm Technologies®.

As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 7, 21 e 30 pós-parto, através de punção da veia coccígea, utilizando sistema a vácuo. As amostras de sangue foram coletadas em dois tubos: um com fluoreto de sódio (4mL Vacuplast® - Zhejiang, China) para avaliar os níveis de glicose; e outro com sílica (ativador de coágulo) (10mL Vacuplast® - Shandong, China) para obtenção do soro e avaliação dos demais parâmetros metabólicos. Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g, durante 15 minutos. O soro e o plasma foram transferidos para microtubos de 1,5mL, identificados e armazenados a -20°C até a realização das análises. Todas as análises foram realizadas no laboratório de metabolismo do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC HUB), da Universidade Federal de Pelotas.

Foram utilizados kits comerciais para determinar as concentrações de glicose, ureia, magnésio, fósforo (P), cálcio (Ca), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil), AGL (Wako NEFA-HR, Wako Chemicals, Richmond, EUA) e BHB (Randox®, Randox Laboratories U.S.A., Oceanside, CA, EUA) conforme as instruções dos fabricantes. As análises foram realizadas através de analisador bioquímico automatizado (Labmax Plenno, Labtest®, Brasil). A avaliação da atividade da Paraoxanase-1 (PON) foi determinada através do teste enzimático utilizando um kit comercial (ZeptoMetrix® Corporation, Buffalo, NY, USA), de acordo com Schneider et al.,<sup>(14)</sup>.

### Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software SAS 9.0 (SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA, 2004). As concentrações de metabólitos (Ca, P, glicose, magnésio, ureia, AST, GGT, PON, AGL e BHB), o peso, ECC e a produção de leite foram avaliadas pelo procedimento MIXED MODELS, considerando tratamento, período (em dias) sua interação e o animal como efeito aleatório, sendo feita análise pós-hoc por Tukey-Kramer. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. Resultados

No presente estudo, o grupo T4, apresentou a média de produção de leite maior ( $25,87 \pm 0,34$  kg/dia), do que os grupos T1, T2, T3 e GC ( $22,68 \pm 0,36$ ;  $23,26 \pm 0,38$ ;  $23,44 \pm 0,36$  e  $23,29 \pm 0,33$  kg/dia, respectivamente;  $P < 0,001$ ), não tendo diferença significativa na interação entre grupo e dias em lactação (Tabela 2;  $P = 1,0$ ).

Em relação aos níveis de BHB, observou-se diferença significativa na interação entre grupo e período, a qual pode ser observada na tabela 3. Observou-se também que as concentrações de AGL no grupo T1 foram menores em comparação aos grupos T2, T3 e T4 (Tabela 3;  $P = 0,02$ ), não diferindo do grupo GC. Em relação as concentrações de AST, o grupo GC apresentou a maior concentração em comparação aos grupos T1, T2, T3 e T4 (Tabela 3;  $P = 0,02$ ).

Acerca dos níveis de ureia, os animais dos grupos T4 e GC apresentaram menores concentrações que os animais dos grupos T2 e T3 (Tabela 3; P = 0,02), sendo o grupo T1, igual a todos os grupos. Também foi observado diferença significativa na interação grupo e período (Tabela 3; P = 0,02). Em relação aos níveis médios de Ca, observa-se diferença entre os grupos (Tabela 3; P < 0,001), onde T1 e T3 apresentaram maiores níveis do que o GC, enquanto os grupos T1 e T2 apresentaram maiores níveis do que o grupo T4. Também foi observado diferença significativa na interação entre grupo e período (Tabela 3; P =0,001).

Em relação aos níveis de P, observou-se diferença significativa na interação entre grupo e período, a qual pode ser observada na tabela 3. Não houve diferença entre os grupos e na interação entre grupo e período para os níveis de magnésio, glicose, PON e GGT (Tabela 3). Os resultados de ECC e peso corporal estão na tabela 4.

**Tabela 2 Médias (± erro médio padrão) da produção de leite (kg/dia) de vacas leiteiras da raça Holandesa que receberam diferentes protocolos com associação de cianocobalamina e butafosfan via intramuscular, durante o período pós-parto**

Dias pós-parto <sup>1</sup>	Grupos <sup>2</sup>					Valor de P		
	T1	T2	T3	T4	GC	Grupo <sup>2</sup>	Período <sup>3</sup>	Grupo* Período <sup>4</sup>
7	20,66±1,22	22,81±1,25	21,85±1,27	25,03±1,40	21,62±1,25			
14	20,29±1,22	21,40±1,20	21,95±1,27	23,57±1,56	21,20±1,40			
21	22,00±1,25	21,45±1,25	23,00±1,30	23,33±1,52	21,46±1,40			
28	22,20±1,20	23,32±1,20	22,12±1,30	26,30±1,30	22,88±1,25			
35	23,02±1,22	23,23±1,22	24,74±1,33	25,51±1,33	24,12±1,33			
42	24,47±1,20	23,44±1,27	23,19±1,27	26,25±1,43	23,19±1,33			
49	22,01±1,27	24,30±1,22	23,98±1,36	26,19±1,47	23,37±1,30	<0.0001	<0.0001	1.000
56	23,02±1,22	24,91±1,30	24,57±1,36	26,24±1,30	23,62±1,43			
63	22,79±1,22	24,04±1,22	24,93±1,33	27,23±1,40	24,15±1,47			
70	23,73±1,25	23,13±1,25	21,65±1,36	26,64±1,47	23,83±1,36			
77	23,50±1,18	23,15±1,25	23,60±1,30	27,11±1,40	24,72±1,40			
84	23,35±1,27	22,90±1,30	23,97±1,43	26,40±1,47	23,74±1,33			
91	24,38±1,33	22,77±1,20	23,66±1,33	27,26±1,52	24,25±1,36			
98	22,05±1,73	24,74±1,22	25,00±1,56	25,12±1,40	23,94±1,43			

<sup>1</sup> Produção de leite nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 e 98 pós-parto; <sup>2</sup> Grupo: os animais foram divididos em grupos, que receberam o mesmo tratamento, por via intramuscular, de 100 mg/mL butafosfan e 0,05 mg/mL cianocobalamina (1mL para cada 20kg de peso vivo), (Catosal® B12; ELANCO, São Paulo, Brasil), diferindo o número de doses por grupo: **T1**: no dia do parto (dia 0) (n=36); **T2**: dias 0 e 3 (n = 31); **T3**: dias 0 e 7 (n = 30); **T4**: dias 0, 3 e 7 (n = 28) e o grupo controle (**GC**): dias 0, 3 e 7 (n = 29) recebeu solução fisiológica; <sup>3</sup> Período refere-se aos dias em que a produção de leite foi mensurada;

<sup>4</sup> Grupo\*Período refere-se à interação do grupo em relação aos dias de mensuração da produção de leite. Foram considerados valores significativos de P<0,05.

**Tabela 3 Médias (± erro médio padrão) de marcadores metabólicos de vacas leiteiras da raça Holandesa que receberam diferentes protocolos com associação de cianocobalamina e butafosfan via intramuscular, durante o período pós-parto.**

Parâmetros Bioquímicos <sup>1</sup>	Grupo <sup>2</sup>	Período (dias pós-parto) <sup>3</sup>				Valor de P			
		0	7	21	30	Média <sup>4</sup> Grupo	Grupo <sup>2</sup>	Período <sup>3</sup>	Grupo* Período <sup>5</sup>
BHB (mmol/L)	T1	0,19±0,08	0,44±0,08AC	0,31±0,08A	0,28±0,08	0,31±0,04			
	T2	0,19±0,08	0,87±0,08B	0,46±0,09AB	0,29±0,08	0,45±0,04			
	T3	0,27±0,08	0,61±0,08C	0,46±0,10AB	0,18±0,09	0,38±0,04	0,13	<0,001	0,001
	T4	0,21±0,08	0,43±0,08AC	0,68±0,09B	0,27±0,10	0,40±0,04			
	GC	0,15±0,08	0,28±0,09A	0,65±0,12B	0,20±0,12	0,32±0,05			

AGL (mmol/L)	T1	0,63±0,06	0,73±0,06	0,38±0,05	0,32±0,05	0,52±0,03a			
	T2	0,82±0,05	0,84±0,06	0,52±0,06	0,37±0,05	0,64±0,02b			
	T3	0,75±0,06	0,73±0,05	0,57±0,06	0,36±0,06	0,60±0,03b	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,71
	T4	0,70±0,06	0,87±0,06	0,47±0,06	0,47±0,06	0,63±0,03b			
	GC	0,66±0,06	0,72±0,06	0,51±0,06	0,35±0,06	0,56±0,03ab			
AST (U/L)	T1	57,90±4,76	86,47±5,29	78,42±4,76	73,38±4,76	74,04±2,45a			
	T2	66,09±4,65	91,75±5,45	80,65±4,88	73,85±4,76	78,08±2,47a			
	T3	70,05±4,88	89,85±4,76	76,65±4,88	76,55±7,27	78,27±2,77a	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,88
	T4	62,63±5,00	93,75±4,88	79,10±5,00	77,38±5,14	78,21±2,50a			
	GC	77,73±5,00	90,47±5,29	88,93±5,45	86,60±5,63	85,93±2,67b			
Ureia (mg/dL)	T1	28,94±2,01A	27,54±2,01AB	29,94±2,01A	27,68±2,01AB	28,53±1,00ab			
	T2	31,56±2,01A	31,59±1,90A	27,20±2,20AB	28,64±2,01A	29,75±1,01a			
	T3	31,54±2,07A	26,38±2,13AB	28,27±2,20A	36,61±2,36B	30,70±1,09a	<b>0,02</b>	0,09	<b>0,02</b>
	T4	23,24±2,07B	28,39±1,95AB	26,38±2,20AB	29,84±2,20A	26,96±1,05b			
	GC	29,87±2,13A	25,41±2,07B	21,18±2,84B	27,39±2,84A	25,96±1,25b			
Cálcio (mg/dL)	T1	8,62±0,23	9,46±0,23A	10,32±0,22A	9,67±0,23A	9,52±0,11a			
	T2	8,28±0,22	8,84±0,22B	10,23±0,23A	9,79±0,23A	9,28±0,11ab			
	T3	8,31±0,23	9,26±0,22AB	9,88±0,23ABC	8,80±0,25B	9,06±0,11ad	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,001</b>
	T4	8,67±0,23	8,61±0,23B	9,68±0,24C	8,42±0,26BC	8,84±0,12cd			
	GC	8,37±0,23	7,69±0,25AB	9,38±0,27B	9,23±0,28AB	8,67±0,13bc			
Fósforo (mg/dL)	T1	4,59±0,34A	6,96±0,35A	7,6±0,37	7,61±0,37AC	6,59±0,18			
	T2	4,70±0,32A	6,95±0,34AB	7,53±0,38	7,36±0,36AB	6,63±0,17			
	T3	5,39±0,33AB	6,67±0,35AB	7,5±0,41	6,59±0,46BD	6,54±0,19	0,58	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,03</b>
	T4	5,89±0,35B	6,32±0,34B	6,76±0,39	6,22±0,37CD	6,30±0,18			
	GC	5,63±0,35B	6,41±0,36AB	6,85±0,48	6,38±0,42CD	6,32±0,20			
Magnésio (mg/dL)	T1	2,38±0,11	2,02±0,11	2,80±0,11	2,77±0,11	2,49±0,05			
	T2	2,28±0,10	2,13±0,11	2,92±0,11	2,66±0,11	2,50±0,05			
	T3	2,58±0,11	2,35±0,11	2,81±0,11	2,97±0,11	2,68±0,05	<b>0,05</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,30
	T4	2,46±0,11	2,45±0,13	2,95±0,11	2,60±0,11	2,61±0,05			
	GC	2,44±0,11	2,07±0,11	2,72±0,13	2,71±0,14	2,49±0,06			
Glicose (mg/dL)	T1	70,27±2,53	55,80±2,40	58,47±2,34	55,45±2,40	60,00±1,21			
	T2	76,00±2,40	53,14±2,34	55,45±2,40	62,77±2,53	61,84±1,21			
	T3	74,77±2,53	57,09±2,34	56,35±2,40	58,10±2,46	61,58±1,21	0,50	<b>&lt;0,0001</b>	0,05
	T4	83,95±2,40	55,80±2,77	54,21±2,46	58,77±2,53	63,18±1,27			
	GC	76,58±2,60	55,10±2,40	57,47±2,46	57,56±2,68	61,68±1,27			
GGT (U/L)	T1	24,75±1,88	27,27±1,98	24,89±1,93	26,21±1,93	25,78±0,96			
	T2	25,68±1,79	26,86±2,17	30,20±1,88	26,33±1,83	27,27±0,96			
	T3	26,00±1,88	28,33±1,83	30,20±1,88	22,11±2,80	26,66±1,07	0,15	<b>0,03</b>	0,32
	T4	24,31±1,93	29,42±1,93	27,23±2,04	28,82±2,04	27,44±0,99			
	GC	25,52±1,93	28,47±2,04	30,00±2,10	33,35±2,25	29,33±1,04			
PON1 (U/mL)	T1	87,34±6,06	63,79±6,06	104,76±6,21	110,73±6,06	91,65±3,04			
	T2	88,84±5,92	85,08±6,21	112,03±6,21	111,22±6,06	99,29±3,05			
	T3	87,17±6,21	92,44±6,21	108,57±6,21	101,77±6,94	97,48±3,20	0,36	<b>&lt;0,0001</b>	0,21
	T4	84,08±6,37	84,51±6,21	98,70±6,37	103,98±6,54	92,82±3,18			
	GC	98,18±6,21	83,53±6,37	101,94±6,73	101,96±7,12	96,40±3,31			

<sup>1</sup>Parâmetros bioquímicos clínicos: foram avaliados no dia do parto (0), 7, 21 e 30 pós-parto;

<sup>2</sup>Grupo: os animais foram divididos em grupos, que receberam o mesmo tratamento, por via intramuscular, de 100 mg/mL butafosfan e 0,05 mg/mL cianocobalamina (1mL para cada 20kg de peso vivo), (Catosal® B12; ELANCO, São Paulo, Brasil), diferindo o número de doses por grupo: **T1**: no dia do parto (dia 0) (n=36); **T2**: dias 0 e 3 (n = 31); **T3**: dias 0 e 7 (n = 30); **T4**: dias 0, 3 e 7 (n = 28) e o grupo controle (**GC**): dias 0, 3 e 7 (n = 29) recebeu solução fisiológica; <sup>3</sup>Período refere-se aos dias em que foram realizadas as coletas (dia do parto (0), 7, 21 e 30 após o parto); <sup>4</sup>Média grupo refere-se a média dos grupos e a diferença significativa desta média foi demonstrada com letras minúsculas <sup>a-d</sup>.

<sup>5</sup>Grupo\*Período refere-se à interação do grupo em relação aos dias de coleta de sangue, demonstrada a partir das letras maiúsculas <sup>A-D</sup> entre linhas. Foram considerados valores significativos de P<0,05.

Tabela 4 Médias ( $\pm$  erro médio padrão) do ECC e peso de vacas leiteiras da raça Holandesa que receberam diferentes protocolos utilizando a associação de butafosfan e cianocobalamina, durante o período pós-parto.

Parâmetros	Grupo <sup>2</sup>	Período (dias pós-parto) <sup>3</sup>								Valor de P			
		0	15	30	45	60	75	90	105	Média Grupo <sup>4</sup>	Grupo <sup>2</sup>	Período <sup>3</sup>	Grupo*Período <sup>5</sup>
ECC	T1	3,10 $\pm$ 0,08	2,81 $\pm$ 0,09	2,79 $\pm$ 0,09	2,80 $\pm$ 0,09	2,77 $\pm$ 0,09	2,74 $\pm$ 0,09	2,77 $\pm$ 0,09	2,77 $\pm$ 0,09	2,88 $\pm$ 0,03a	0,02	<0,001	0,99
	T2	3,01 $\pm$ 0,09	2,78 $\pm$ 0,09	2,61 $\pm$ 0,09	2,74 $\pm$ 0,10	2,74 $\pm$ 0,09	2,74 $\pm$ 0,09	2,84 $\pm$ 0,10	2,79 $\pm$ 0,10	2,78 $\pm$ 0,03bc			
	T3	2,92 $\pm$ 0,10	2,70 $\pm$ 0,09	2,63 $\pm$ 0,10	2,54 $\pm$ 0,10	2,61 $\pm$ 0,10	2,69 $\pm$ 0,10	2,77 $\pm$ 0,11	2,94 $\pm$ 0,11	2,72 $\pm$ 0,03b			
	T4	3,13 $\pm$ 0,10	2,77 $\pm$ 0,10	2,82 $\pm$ 0,11	2,92 $\pm$ 0,11	2,65 $\pm$ 0,10	2,63 $\pm$ 0,10	2,81 $\pm$ 0,10	2,97 $\pm$ 0,11	2,84 $\pm$ 0,03ac			
	GC	3,12 $\pm$ 0,09	2,76 $\pm$ 0,09	2,63 $\pm$ 0,11	2,68 $\pm$ 0,10	2,80 $\pm$ 0,10	2,70 $\pm$ 0,11	2,90 $\pm$ 0,11	3,00 $\pm$ 0,12	2,82 $\pm$ 0,03ac			
Peso	T1	574,4 $\pm$ 13,1	550,6 $\pm$ 14,8	527,1 $\pm$ 14,0	527,0 $\pm$ 14,0	546,7 $\pm$ 14,2	537,0 $\pm$ 13,7	544,0 $\pm$ 13,7	539,9 $\pm$ 14,5	543,38 $\pm$ 4,9	0,07	0,001	0,99
	T2	589,7 $\pm$ 13,7	580,3 $\pm$ 14,5	566,8 $\pm$ 14,2	568,5 $\pm$ 15,1	565,4 $\pm$ 14,8	544,0 $\pm$ 14,8	547,7 $\pm$ 15,4	541,5 $\pm$ 15,8	563,05 $\pm$ 5,2			
	T3	578,3 $\pm$ 15,4	559,4 $\pm$ 15,1	550,2 $\pm$ 16,1	546,0 $\pm$ 15,8	538,6 $\pm$ 15,8	538,6 $\pm$ 15,8	546,1 $\pm$ 17,0	555,0 $\pm$ 17,4	552,56 $\pm$ 5,7			
	T4	560,8 $\pm$ 14,8	563,3 $\pm$ 15,8	560,4 $\pm$ 16,5	559,4 $\pm$ 16,5	535,7 $\pm$ 15,8	526,6 $\pm$ 15,4	536,6 $\pm$ 15,1	553,7 $\pm$ 17,4	549,60 $\pm$ 5,6			
	GC	568,8 $\pm$ 14,8	540,4 $\pm$ 15,8	550,7 $\pm$ 15,8	528,5 $\pm$ 15,1	535,4 $\pm$ 16,5	546,1 $\pm$ 17,0	535,0 $\pm$ 16,5	558,4 $\pm$ 19,1	545,44 $\pm$ 5,8			

<sup>1</sup> Parâmetros Zootécnicos: Escore de condição corporal (ECC) e Peso avaliado nos 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 pós-parto;

<sup>2</sup> Grupo: os animais foram divididos em grupos, que receberam o mesmo tratamento, por via intramuscular, de 100 mg/mL butafosfan e 0,05 mg/mL cianocobalamina (1mL a cada 20kg de peso vivo) (Catosal® B12; ELANCO, São Paulo, Brasil), diferindo o número de doses por grupo: **T1**: no dia do parto (dia 0) (n=36); **T2**: dia 0 e 3 (n = 31); **T3**: dia 0 e 7 (n = 30); **T4**: dia 0, 3 e 7 (n = 28) e o grupo controle (**GC**): dia 0, 3 e 7 (n = 29) recebeu solução fisiológica;

<sup>3</sup> Período refere-se aos dias em que foram realizadas as coletas nos dias: 0 (parto), 7, 21 e 30 após o parto;

<sup>4</sup> Média grupo refere-se a média geral dos grupos e a diferença significativa desta média foi demonstrada com as letras minúsculas <sup>a-d</sup>;

<sup>5</sup> Grupo\*Período refere-se à interação do grupo em relação aos dias de coleta de sangue. Foram considerados valores significativos de P<0,05.

## 4. Discussão

Existem vários estudos avaliando o uso da associação de cianocobalamina e butafosfan no pós-parto de vacas leiteiras <sup>(5,6,8,10)</sup>, entretanto, não há padronização no protocolo utilizado, variando o número de doses e dias pós-parto. Com isto, buscou-se neste estudo avaliar qual o melhor número de doses e intervalo entre estas para que se tenha efeitos positivos sobre o BEN e produção de leite. Os estudos de Schären et al. <sup>(15)</sup> e Pereira et al. <sup>(5)</sup> observaram aumento na produção de leite dos animais tratados com a associação cianocobalamina e butafosfan utilizando 6 e 4 aplicações, respectivamente. No presente estudo, também foi observado uma maior produção de leite nos animais do grupo T4, assim como o estudo de Pizoni et al., <sup>(10)</sup> que utilizou o mesmo protocolo com apenas 3 aplicações, ou seja, com menor custo de tratamento e menos manejos do que os estudos com 4 e 6 aplicações.

Cabe ressaltar que quanto maior a produção de leite das vacas, maiores serão as exigências nutricionais e com isso tendem a ter uma maior mobilização lipídica do que vacas com menor produção, o que pode ser observado pelos níveis elevados de AGL e BHB no sangue <sup>(17)</sup>, bem como, a hiperatividade hepática, que pode ser observada pelos maiores níveis da enzima AST <sup>(18)</sup>. Assim, acredita-se que os animais com maior produção de leite podem ser beneficiados metabolicamente quando suplementados, como observado no presente estudo, onde os animais do grupo T4, mesmo apresentando maior produção de leite, não tiveram diferença nas concentrações de AGL e BHB em comparação aos demais grupos, ou seja, não apresentaram um BEN de alta intensidade. Inclusive, o grupo T4 apresentou menor nível da enzima AST em comparação ao grupo GC. Com isso, considera-se que o protocolo administrado no grupo T4 auxiliou o metabolismo energético e hepático dos animais.

Além disso, sabe-se que os animais que produzem mais leite tendem a aumentar o consumo para atender as exigências energéticas <sup>(19)</sup>, intensificando o catabolismo de aminoácidos, com provável aumento dos níveis de ureia plasmática <sup>(20)</sup>. Entretanto, no presente estudo, os grupos T4 e GC apresentaram menores concentrações de ureia, reforçando a suposição que o tratamento com a associação de cianocobalamina e butafosfan no grupo T4, provavelmente, tenha auxiliado no metabolismo energético, como demonstrado no estudo com ovelhas de Pereira *et al.* <sup>(16)</sup> e assim refletindo num menor catabolismo proteico, já que mesmo com os níveis mais baixos de ureia, manteve a maior produção de leite, sem alterações prejudiciais nos demais parâmetros bioquímicos. Já para o grupo GC, presume-se que esteja relacionado com a menor produção.

Ainda, acredita-se que o tratamento com associação de cianocobalamina e butafosfan possa auxiliar na homeostase do Ca, já que no presente estudo, foi possível observar que os animais do grupo T4, mesmo apresentando maior produção de leite, não apresentaram redução deste mineral nos dias avaliados. Sabe-se que o fosfato orgânico constitui moléculas energéticas como o ATP e adenosina difosfato (ADP) e para a reabsorção óssea, é necessário ativar a enzima adenilato ciclase, que sintetiza a partir de ATP, o segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico) <sup>(21)</sup>. Com isso, acredita-se que a maior disponibilidade de fósforo orgânico favoreceu a cascata de sinalização para ativação da mobilização óssea, que é regulada pelo paratormônio (PTH), contribuindo com o metabolismo do cálcio <sup>(22)</sup>.

Em relação aos demais parâmetros avaliados (P, magnésio, glicose, PON, GGT e peso) não se observou diferença significativa, assim como em outros trabalhos usando a associação de cianocobalamina e Butafosfan <sup>(10,5)</sup>. Quanto ao ECC, apesar da diferença entre grupos, esta não foi expressiva ao ponto de gerar diferenças no peso corporal, com variação mínima entre os tratamentos avaliados.

## 5. Conclusão

A partir deste estudo, conclui-se que a suplementação da associação de cianocobalamina e butafosfan com aplicações nos dias 0, 3 e 7 no pós-parto de vacas da raça Holandesa é capaz de aumentar a produção de leite e contribui para um melhor metabolismo energético e hepático dos animais.

## Declaração de conflito de interesses para cada autor

Os autores não têm interesses financeiros conflitantes.

## Contribuições do autor

*Conceituação:* Corrêa, M.N. *Curadoria de dados:* Barbosa, M.W.M e Londero, U.S. *Análise Formal:* Londero, U.S. *Aquisição de financiamento:* Corrêa, M.N. *Investigação:* Krusser, R.H. *Metodologia:* Krusser, R.H; Barbosa, A.A e Carpinelli, N. *Gerenciamento do projeto:* Corrêa, M.N. *Recursos:* Krusser, R.H. *Software:* Barbosa, M.W.M. *Supervisão:* Krusser, R.H; Barbosa, A.A. *Validação:* Da Silva, T.C. *Visualização:* Da Silva, T.C. *Redação – revisão e edição:* Da Silva, T.C; Feijó, J.O; Rabassa, V.R; Del Pino, F.A.B

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e propriedade Leite Sul pelo empréstimo dos animais.

## Referências

1. Pascottini O.B, Leroy J.L.M.R, Opsomer G. Metabolic Stress in the Transition Period of Dairy Cows: Focusing on the Prepartum Period. *Animals*. v.10, p.1419, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10081419>
2. Pérez-Báez J, Risco C, Chebel R, Gomes G, Greco L, Tao S, Thompson I.M, do Amaral B.C, Zenobi M.G, Martinez N, Staples C.R, Dahl G.E, Hernández J.A, Santos J.E.P, Galvão K.N. Association of dry matter intake and energy balance prepartum and postpartum with health disorders postpartum: Part I. Calving disorders and metritis. *Journal Dairy Science*. v.102, p. 9138-9150, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15879>.
3. Grummer R.R, Mashek D.G, Hayirli A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. v.20, p. 447-70, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.013>
4. Esposito G, Irons P.C, Webb E.C, Chapwanya A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*. v.144, p.60-71, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>
5. Pereira R.A, Silveira P.A.S, Montagner P, Schneider A, Schmitt E, Rabassa V.R, Pfeifer, L.F, Del Pino, F.A, Pulga, M.E, Corrêa, M.N. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk production in dairy cows. *Animal*. v.7, p.1143-1147, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731113000013>
6. Füll M, Deniz A, Westphal B, Illing C, Constable P.D. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of dairy Science*. v.93, p.4155-64, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2914>
7. Kreipe L, Deniz A, Bruckmaier R.M, van Dorland H.A. First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows. *Journal of dairy Science*. v.94, p.4904-4914, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4080>
8. Rollin E, Berghaus R.D, Rapnicki P, Godden S.M, Overton M.W. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum  $\beta$ -hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *Journal of dairy Science*. v.3, p.978-87, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2508>
9. McDowell LR. Minerals in animal and human nutrition. *Minerals in animal and human nutrition*. 2ed, 1992
10. Pizoni C, Izquierdo V, Klaus R, Santos E dos, Vieira L.V, Barbosa A.A, Cardoso, K, Velasquez, B, Del Pino, F, Rabassa, V, Brauner, C, Corrêa, M.N. Use of Butaphosphan with Cyanocobalamin in High Producing Cows and Associations with Milk Yield and Dry Matter Intake. *Research, Society and Development*. v.11, p. e48311427045, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27045>
11. Tabeleão V.C, Schwegler E, Pereira R.A, Krause A.R.T, Montagner P, Feijó J.O, A. Schneider, E. Schmitt, C.C. Brauner, V.R. Rabassa, F.A.B. Del Pino, M.N. Corrêa. Combinação de butafosfan e cianocobalamina no metabolismo da glicose em vacas leiteiras após o parto. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.69, p. 317-324, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8453>

12. Wildman E.E, Jones I.G.M, Wagner P.E, Boman R.L, Troutt H.F, Lesch T.N. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. *Journal of dairy Science*. v.65, p.495-501, 1982. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82223-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223-6)
13. Heinrichs A.J, Rogers G.W, Cooper J.B. Predicting Body Weight and Wither Height in Holstein Heifers Using Body Measurements *Journal of dairy Science*. v.75, p.3576-3581, 1992. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78134-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78134-X)
14. Schneider A, Corrêa M.N, Butler W.R. Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. *Research in Veterinary Science*. v.95, n.1, p. 269-271. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.010>
15. Schären M, Snedec T, Riefke B, Slopianka M, Keck M, Gruendemann S, J. Wichard, N. Brunner, S. Klein, K.B. Theinert, F. Pietsch, A. Leonhardt, S. Theile, F. Rachidi, A. Kaiser, G. Köller, E. Bannert, J. Spilke, A. Starke. Aspects of transition cow metabolomics-Part I: Effects of a metaphylactic butaphosphan and cyanocobalamin treatment on the metabolome in liver, blood, and urine in cows with different liver metabolotypes. *Journal of dairy Science*. v.104, p. 9205-926, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19055>
16. Pereira R.A, Fensterseifer S, Barcelos V.B, Martins C.F, Schneider A, Schmitt E, Pfeifer L.F.M, Del Pino F.A.B. Metabolic parameters and dry matter intake of ewes treated with butaphosphan and cyanocobalamin in the early postpartum period. *Small Ruminant Research*. v.114, p.140-145. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.05.016>
17. Wathes D.C, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris D.G, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*. v.68, p.S232-S241. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.006>
18. Wang D, Yu D, Zhao C, Xia C, Xu C, Wu L. Subclinical ketosis risk prediction in dairy cows based on prepartum metabolic indices. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.73, p.11-17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12079>
19. Luiz Chizzotti M, de Campos Valadares Filho S, Ferreira Diniz Valadares R, Helena Martins Chizzotti F, Inácio Marcondes M, Alves Fonseca M. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.36, p.138-146, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000100017>
20. Andjelić B, Djoković R, Cincović M, Bogosavljević-Bošković S, Petrović M, Mladenović J, Čukić. A. Relationships between Milk and Blood Biochemical Parameters and Metabolic Status in Dairy Cows during Lactation. *Metabolites*. v.12, p.733, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo12080733>
21. Singh J, Hundal J.S, Sharma A, Singh U, Sethi A.P.S, Singh P. Phosphorus Nutrition in Dairy Animals: A Review Cite this paper Phosphorus Nutrition in Dairy Animals: A Review. v.7, p.3518-3530, 2018. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.397>
22. Goff, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*. v.176, p. 50-57. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.020>
23. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 2001. NRC.