

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



Dissertação

**Avaliação metabólica de ruminantes submetidos a diferentes formas
farmacêuticas de administração de cálcio e magnésio**

Gabriela Power Teixeira da Silva

Pelotas, 2016

Gabriela Power Teixeira da Silva

**Avaliação metabólica de ruminantes submetidos a diferentes formas
farmacêuticas de administração de cálcio e magnésio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Produção animal: produção de bovinos leiteiros).

Orientador: Dr. Cássio Cassal Brauner
Coorientadores: Dr. Marcio Nunes Corrêa
Dr. Rubens Alves Pereira

Pelotas, 2016

Gabriela Power Teixeira da Silva

**Avaliação metabólica de ruminantes submetidos a diferentes formas
farmacêuticas de administração de cálcio e magnésio**

.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do título de mestre em ciência animal, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19 de fevereiro

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner (Orientador)
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eduardo Schmitt
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Viviane Rohrig Rabassa
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu pai Luiz Pedro e a minha mãe Helena, por disporem mais estes dois anos me auxiliando no que fosse necessário. O conforto e as palavras de vocês nos momentos difíceis foram de extrema importância. Pai, obrigada por todo suporte sem medir esforços. Mãe, sempre disposta a tudo para ver o meu bem, muito obrigada!

Agradeço aos meus irmãos, Carolina e Thomaz Power pela confiança no meu potencial. A vocês, agradeço eternamente pelo companheirismo.

Ao meu tio João Power *in memoriam* que apesar da sua luta pela vida, sempre preocupou-se pelo meu bem-estar, e tanto quis que este sonho se concretizasse. .

Agradeço a Loiva Hovingh e Mario Oneide, amigos que muito me estimularam nessa caminhada.

Ao Jonas Witt Borba. Obrigada pela dedicação, carinho e paciência comigo. Obrigada por não me deixar desistir, e ter estado ao meu lado, me auxiliando em fases muito importantes desta caminhada.

Ao meu orientador Dr. Cássio Cassal Brauner, pela confiança no meu trabalho. Obrigada por todos ensinamentos e pela paciência que tivesse comigo.

Ao meu coorientador Dr. Marcio Nunes Corrêa, por ter sido meu exemplo profissional e pelas conversas as quais levarei para vida.

Ao meu coorientador Dr. Rubens Alves Pereira por dispor do seu conhecimento em prol deste projeto e por guiar-me na direção correta.

Aos meus amigos Filipe Corso, Luciano e Richard obrigada pela amizade que fortalecemos nesse tempo.

Minhas amigas, peças fundamentais neste período, Gabriela Bueno Luz, Márcia Pereira, Joice Brustolin e Maria Amélia Agnes Weiler, sem palavras para agradecer as diversas vezes que estenderam a mão à mim. Eternamente grata!

A todos os colegas e colaboradores do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária muito obrigada. Esta família que me acolheu dentro da UFPel com o maior carinho e dedicação, esta vitória é de todos nós. Em especial, as graduadas Joana, Taína e Laíse que trabalharam diretamente comigo e dedicaram do seu tempo para que conseguíssemos colher frutos deste trabalho. E aos pós-graduandos Josiane Feijó e Rafael Prietrich, pelo auxílio neste projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do meu mestrado por esse programa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –Cnpq- pela concessão da bolsa.

E, finalmente e não menos importante, a Deus por me dar todo suporte que necessitei. Obrigada!

Gracia a todos!

“Ninguna fuerza abatirá tus sueños, porque ellos se nutren con su propia luz. Se alimentan de su propia pasión.”

Atahualpa Yupanqui

RESUMO

SILVA. Gabriela Power Teixeira. **Avaliação metabólica de ruminantes submetidos a diferentes formas farmacêuticas de administração de cálcio e magnésio.** 2016.56f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Hipocalcemia é uma das enfermidades que mais acomete ruminantes no periparto, sendo considerada como uma “doença de produção”, com alto impacto econômico. Diante disto, foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar a concentração sérica de cálcio total (Cat), cálcio ionizado (Cai), magnésio (Mg) e o metabolismo de ovelhas a partir de duas formas farmacêuticas de administração de cálcio e magnésio. Foram utilizadas 24 ovelhas pós-parto da raça Corriedale divididas em quatro grupos. Os animais foram pesados previamente e divididos homogeneamente pelo peso: grupo dispositivo CaMg (base polimérica + formiato de cálcio + cloreto de Mg), grupo dispositivo controle (base polimérica), grupo oral CaMg (água destilada + fonte de cálcio + fonte de Mg) e grupo oral controle (água destilada). Até a hora 6 as coletas tiveram intervalo de 30 minutos e após nas horas 12, 24 e 48 para avaliação das concentrações de Cat, Mg, proteínas totais (PPT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamiltranspeptidase (GGT), ureia e albumina. As concentrações de Cai foram estimadas através da seguinte fórmula:
$$\frac{6 \cdot \text{Cat} - ((0,19 \cdot \text{PPT}) + \text{albumina})}{3 \cdot ((0,19 \cdot \text{PPT}) + \text{albumina}) + 6}$$
 Para avaliação de pH urinário foi realizada coleta de urina nos momentos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. As concentrações séricas de Cat e de Cai do grupo dispositivo CaMg (DCaMg) foi maior que as concentrações do grupo dispositivo controle (DC). Os grupos oral CaMg (OCaMg) e grupo oral controle não diferiram entre si. Os DCaMg e OCaMg. As concentrações séricas de Mg do DCaMg foi maior que o DC. Os níveis sanguíneos de Mg nos DCaMg e OCaMg não diferiram entre si. As concentrações séricas de PPT, AST, GGT, Albumina, Ureia e pH urinário não diferiram entre os grupos. Conclui-se que o dispositivo intravaginal torna-se uma alternativa potencial para aumentar a concentração sérica de Czat considerável e serve de maneira eficiente para a prevenção e/ou tratamento de hipocalcemia em ruminantes.

Palavras chave: hipocalcemia, formiato de cálcio, dispositivo intravaginal

ABSTRACT

SILVA. Gabriela Power Teixeira. **Metabolic availability ruminant submitted different pharmaceutical forms of administration of calcium and magnesium.** 2016. 56f. Thesis (Master). Graduate Program in Animal Sciences. Federal University of Pelotas, Brazil.

Milk Fever it is one of the diseases that more attack dairy cows in the transition period, being considered as a “production of disease”, with high economic impact. Given this, was conducted a study, which the aim was evaluate the serum concentration of total calcium (Cat), ionized calcium (Cai), magnesium (Mg) and metabolism the sheep from two pharmaceutical forms the utilization of calcium and magnesium. In this study were used 24 sheep of Corriedale breed, in post-partum, divided into four groups. Previously all the animals were weighted and divided, homogeneously: group intravaginal device DCaMg (polymer-based + calcium formate + magnesium chloride), control device DC (polymer-based), OCaMg (distilled water + calcium formate + magnesium chloride), OC (distilled water). The blood samples were collected at 6 hours at 30 minute intervals and after 12, 24 and 48 hours, for the evaluation of Cat, Mg, total protein (PPT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), urea, creatinine and albumin concentrations. Cai concentrations were estimated by the following formula: $6.Cat - ((0,19.PPT) + albumin) / 3 / ((0,19.PPT) + albumin + 6$. To assess the urinary pH for later comparison between the treatments, was realized urine collection at 0, 3, 6 and 12 hours. The serum concentrations of total calcium and ionized calcium of DCaMg group was higher than the DC. The OCaMg and OC did not differ. The DCaMg and OCaMg did not differ. The serum concentrations of Mg of DCaMg group was higher than the DC. Blood levels of Mg in OCaMg and OC did not differ, and the DCaMg did not differ from the OCaMg. Serum concentrations of PPT, AST, GGT, albumin, urea and pH did not differ between groups. Overall, the intravaginal device makes a potential alternative to ensure a considerable bioavailability of calcium and serves as efficient way for prevention and/or hypocalcemia treatment in ruminants.

Keywords: milk fever, calcium formate, intravaginal device

SUMÁRIO

1.0	Introdução Geral	10
2.0	Objetivo Geral	15
2.1	Objetivo Específicos	15
3.0	Projeto de Pesquisa	16
4.0	Relatório de Trabalho de Campo	32
5.0	Artigo1	34
6.0	Conclusão Geral	49
7.0	Referências	50

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1: Concentrações séricas de cálcio total de ovelhas da raça Corriedale submetidas a administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio durante experimento 46
- Figura2: Concentrações séricas de cálcio ionizado de ovelhas da raça Corriedale submetidas a administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio durante experimento 47
- Figura 3: Concentrações séricas de magnésio de ovelhas da raça Corriedale submetidas a administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio durante experimento 47

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1:	Pesos individuais e as médias de cada grupo, distribuídos homogeneamente.	34
Tabela 2:	Valores médios \pm erro-padrão de Cat, Cai e Mg.	47
Tabela 3:	Médias \pm erro-padrão de parâmetros metabólitos de ovelhas da raça Corriedale submetidas a administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio durante experimento	47

1. Introdução Geral

Durante o parto de vacas leiteiras ocorrem mudanças nutricionais e hormonais, tornando uma fase estratégica para a vida produtiva, quando medidas podem ser adotadas a fim de obter-se maior produtividade, reduzir os transtornos metabólicos e, conseqüentemente, diminuir o número de descartes involuntários (Ortolani, 2009). O cálcio (Ca^{2+}) é o terceiro íon mais abundante no organismo e desempenha um papel importante na função celular normal, transmissão neural, estabilidade da membrana, estrutura óssea, coagulação do sangue e sinalização intracelular (Liamis *et al.*, 2009).

É uma doença metabólica que acomete principalmente bovinos e ovinos ocorrendo quando os mecanismos homeostáticos não conseguem manter a concentração sérica de Ca^{2+} dentro dos limites fisiológicos, normalmente no início da lactação por se tratar da fase de maior exigência dos animais. (Horst *et al.*, 1997). Muitas vezes é fatal em ovelhas adultas durante o final da gestação e início da lactação (Cockcroft, Whiteley 1999). Hipocalcemia é uma síndrome que ocorre com uma incidência variável em ovelhas, sendo influenciada tanto por fatores ambientais quanto por predisposição genética associado a queda do Ca^{2+} . Yates, Hunt (1986) relataram que as ovelhas têm uma demanda de cálcio elevada para o feto em desenvolvimento, porém a demanda para lactação é relativa pequena.

Em vacas leiteiras, em torno de 25-54% apresentam hipocalcemia subclínica (Reinhardt *et al.*, 2011). Desequilíbrios alimentares, como o sobrepeso no pré-parto, predisõem muito a hipocalcemia (Jacques, 2011), estando associada à diminuição da ingestão de alimentos contribuindo para o desenvolvimento deste transtorno, acometendo as vacas durante o final da gestação ou início da lactação (Brozos *et al.*, 2011). Além disso, ocorre a diminuição da motilidade ruminal e abomasal, tornando o animal propenso a alterações como deslocamento de abomaso (Goff, 2008; Kimura *et al.*, 2006; Reinhardt *et al.*, 2011). Situações como gestações gemelares, quadros de hipomagnesemia, hipofosfatemia podem predispor à hipocalcemia (Goff, 2008).

O pouco tempo para adaptação e a diminuição da ingestão de matéria seca (IMS) no parto fazem com que a resorção (desmineralização) óssea seja o principal mecanismo compensatório do organismo e a base fisiológica de controle da doença (Corbellini, 1998; Jacques, 2011). Segundo Ellenberger *et al.*, (1932) no

início da lactação todos mamíferos perderão 9-13% do seu esqueleto no primeiro mês devido à osteoporose lactacional que visa manter a normocalcemia.

A causa da patogenia está associada a uma resposta refratária a ação do paratormônio (PTH) sobre as células responsáveis pela desmineralização óssea (osteoclastos), células do intestino responsáveis pela absorção e células do rim responsáveis pela reabsorção de Ca^{2+} nos túbulos renais. (Jacques, 2011). Altos níveis de Ca^{2+} estimulam um receptor que leva a um rápido, mas transitório, aumento do Ca^{2+} intracelular, inibindo a liberação do PTH. Em contrapartida, a síntese e secreção do PTH aumenta quando o nível de Ca^{2+} extracelular é baixo (Potts *et al.*, 1998). O PTH regula a mobilização de Ca^{2+} ósseo quando ocorre essa redução, promovendo reabsorção nos túbulos renais de Ca^{2+} . Mas, apenas pequenas quantidades são reabsorvidas, pois uma quantidade mínima de Ca^{2+} é eliminada na urina (Goff, 2008). Já a 1,25 dihidroxivitamina D estimula a absorção intestinal de Ca^{2+} da dieta, porém só é produzida pelo rim frente ao aumento do PTH, e entra em ação após 1 a 2 dias, constituindo um sistema de *feedback* mais demorado (Potts *et al.*, 1998).

O tratamento preconizado para a hipocalcemia é a infusão de borogluconato de cálcio (Ca) endovenoso (EV) (González, 2000), o que pode levar a uma hipercalcemia e após um declínio acentuado levando a fase transitória hipocalcêmica (Blanc *et al.*, 2014) ou usa-se Ca^{2+} subcutâneo, porém essa forma de administração tem resposta mais lenta quando comparada à via endovenosa, devido à menor absorção (Brozos *et al.*, 2011) além de causar necrose quando usada fórmula comercial contendo glicose na composição. O Ca^{2+} administrado por via oral (VO) também é uma forma de tratamento (Oetzel, 2013). Resumidamente, na suplementação oral a capacidade da vaca utilizar o transporte ativo de Ca^{2+} em células intestinais é inadequada para ajudá-la a manter concentrações de Ca^{2+} sanguíneos normais. Mas em grandes quantidades de Ca^{2+} solúvel oralmente é possível que haja um transporte passivo de Ca^{2+} para a corrente sanguínea, o qual ocorre de um meio mais concentrado para um meio menos concentrado, porém só em doses elevadas de Ca^{2+} , entre 50 e 125g de Ca^{2+} /dose, contudo, os benefícios da adição de Ca^{2+} por VO parecem justificar a despesa adicional (Goff, 2008). Tratamento oral é eficaz dentro de 30 minutos e mantém até 4-6 horas (Oetzel, 2013). Blanc *et al.*, (2014) observou aumento nas concentrações sanguíneas de Ca^{2+} maiores em animais que receberam por VO em relação ao grupo controle que

não recebia nenhuma fonte de Ca^{2+} , porém Melendez (2002) não verificou efeito da administração VO nas horas 2, 3, 4, 6 e 9 após o parto.

Além do tratamento, existem ferramentas utilizadas no pré-parto com finalidade de prevenir a hipocalcemia no pós-parto imediato. Exemplo disto é o uso da dieta aniônica (dietas ricas em cloro e enxofre) que exerce um efeito iônico, influenciando o pH sanguíneo, o qual modula os níveis séricos e regulação dos hormônios responsáveis pela calcemia. (Block, 1994). Ramos-Nieves *et al.*, (2009) afirmam que dieta aniônica não diminui hipocalcemia subclínica em alguns casos, além de possuir baixa palatabilidade, e quando fornecida próximo ao parto, pode reduzir a IMS e agravar ainda mais o BEN, comum neste período (Cavalieri & Santos 2001).

Além do método preventivo supramencionados, outras alternativas veem sendo pesquisadas com finalidade de reduzir perdas econômicas causadas pela doença, principalmente em carácter subclínico. Substâncias quelantes, as quais removem cátions da circulação, estimulando secreção e ação do PTH ainda no pré-parto (Jorgensen *et al.*, 1999), como os compostos derivados do ácido tetracético, o etilenodiaminotetracético dissódico (Na_2EDTA) (Hansen *et al.*, 2003; Mellau L.S.B. *et al.*, 2001). Todavia, ainda não se sabe ao certo qual o momento exato para iniciar esta adaptação, além do mais o Na_2EDTA na forma injetável têm seu uso limitado devido aos grandes volumes necessários para infusão endovenosa, não oferecendo praticidade para sua implementação em rebanhos comerciais. Outro método estudado com o intuito de reduzir o Ca^{2+} disponível para absorção envolve a incorporação de zeólitos (silicato de alumínio de sódio) na ração, uma vez que estes se ligam ao Ca^{2+} reduzindo a absorção ainda no pré-parto consequentemente ativando a mobilização de Ca^{2+} pós-parto. Contudo, este método necessitaria que grandes quantidades sejam ingeridas diariamente (0,25 a 1 quilograma dia durante duas semanas antes do parto), o que poderia trazer efeitos negativos também sobre a absorção do fósforo (P) (Jorgensen, R.J.; US Pat. 6890550B1). Outra alternativa, envolve a administração de óleos vegetais que se ligam ao Ca^{2+} formando um sabão insolúvel e impedindo a absorção de Ca^{2+} da dieta. Este método tem sido utilizado com sucesso apenas em bovinos alimentados com dietas que contêm 30-50 g de Ca^{2+} /dia (Wilson, 2003). Segundo Martin-Tereso (US Pat. 2009/0202671) o farelo de arroz também pode servir como alternativa de prevenção da hipocalcemia, pois possui em sua constituição ácido fítico, um antagonista da absorção de Ca^{2+} pois

seus grupos fosfato se ligam a um íon de Ca^{2+} , diminuindo os níveis de Ca^{2+} no pré-parto. Contudo, a fitase, enzima presente na flora ruminal degrada este ácido, havendo a necessidade de protegê-lo com revestimento by-pass para que chegue intacto ao duodeno, o que acaba onerando o produto e limitando a sua utilização. A vitamina D ativa também é uma alternativa de prevenção, porém deve ser administrada entre 24 e 96 hs antes do parto, o que é difícil de determinar. Seu análogo (24F-1,25(OH)₂ D₃), pode ser administrado em até 6 dias antes do parto mas possui riscos de hipercalcemia, intoxicação e inibição da produção endógena da vitamina D, além de causar dano renal. A administração intravaginal de 1,25 (OH)₂ D₃ (Vit. D₃) na forma de cristal dissolvido em etanol (na proporção de 1mg/mL), também tem sido utilizada, porém causa uma diminuição das concentrações sanguíneas de magnésio (Mg).

O uso de sais de Ca^{2+} em bolus, soluções em gel ou aquosas tem sido outra alternativa de prevenção da enfermidade. Dos sais de Ca^{2+} , o citrato de sódio é mais solúvel que o carbonato de cálcio (Hanzlik *et al.*, 2005) apresentando maior disponibilidade sanguínea (Heeler *et al.*, 1999). O formiato de cálcio é um sal altamente solúvel com 30,8% do peso do Ca^{2+} . O cloreto de cálcio aumenta concentração no sangue e a capacidade de resposta ácida em vacas, porém é cáustico para vias aéreas (Oetzel, 2013). Em gel causa inflamação no abomaso e necrose (Lh Mcintyri *et al.*, 2002). O propionato de cálcio possui absorção lenta e a dose deve ser bastante alta do cálcio elementar, entre 75 e 125 g. Carbonato de cálcio não possui boa disponibilidade sanguínea e provoca resposta alcalina, pois forma bicarbonato, opção melhor como tratamento no pós-parto ao invés de método profilático (Oetzel, 2013).

A diminuição do Mg no organismo pode agravar ainda mais o quadro da doença, pelo fato do Mg ser um cofator de ligação do PTH ao receptor (Goff, 2008). O íon Mg garante a atividade completa do receptor de PTH, por atuar como cofator em um sítio de ligação presente na Adenilciclase e na fosfolipase C (Corbellini, 1998; Goff, 2006; Houe *et al.*, 2001, assim métodos profiláticos que causem a diminuição deste elemento, não são benéficos para a saúde pós-parto de vacas leiteiras.

Isto posto, as tecnologias para prevenção de hipocalcemia tendem a emergir para que se busque soluções viáveis principalmente à quadros subclínicos que agravam as perdas da produção. O desenvolvimento de novas formas farmacêuticas

para uso veterinário bem como as vias de administração possuem papel extremamente importante para a produção de ruminantes, visto que estas espécies apresentam barreiras de absorção de fármacos (ambiente ruminal) que requerem terapias mais longas ou até mesmo apresentações que suportem a passagem por estas barreiras. Dispositivos de liberação modificada possuem benefícios neste ponto. Já existem estudos que demonstram a modificação de medicamentos como o uso de comprimidos com antibióticos depositados no rumem liberando o fármaco gradativamente (Sheth P, Stiel D.; US Pat. 3773921), revestimentos de nutriente e fármacos que permite a liberação no abomaso e intestino delgado sendo insolúvel em $\text{pH} \geq 6$ e solúvel em $\text{pH} \leq 3$ (Roth , H. H., *et al.*, US Pat. 4199561) e sistema que liberam determinada concentração em um certo período constituído de uma parede semipermeável onde o princípio ativo localizado no interior é sensível ao pH ruminal (Eckenhoff J. B. *et al.*, US Pat. 4595583).

Outra via opcional de administração de fármacos, a via intravaginal (VI), não possui só efeito local, mas também sistêmico por sua superfície apresentar elevado suprimento sanguíneo, diminuição do efeito de primeira passagem e relativa permeabilidade a alguns fármacos (Machado, 2012). A microflora vaginal normal produz ácido láctico suficiente para manter o ambiente em pH de 3,5-4,5 (Machado, 2012), o que facilita a dissolução do dispositivo, visto que necessita uma pH baixo para que isto ocorra. A VI, já em sido utilizada para administração de agentes antimicrobianos (Malcolm K. *et al.*, US Pat. 6951654) e sistema de liberação lenta do tipo reservatório (Wong P. S.; US Pat. 4286587). Os dispositivos têm tamanhos e formas que possibilita sua inserção e retenção no interior da vagina. Para a fabricação de sistemas de liberação de fármacos, o uso de polímeros biodegradáveis tem sido a preferência por serem compostos de fácil moldagem e assimiláveis pelo organismo animal. Além da maior biocompatibilidade quando comparados aos materiais sintéticos, possuem também um menor custo de preparação e otimização dos efeitos terapêuticos da substância ativa permitindo o uso de menores dosagens, redução da frequência de administração, além de possibilitar a projeção de diferentes formatos e tamanhos (Pereira, R. A. *et al.*; BR Pat. 1020140291687).

2.0. Objetivo Geral

Avaliar a concentração de cálcio e o metabolismo de ovelhas a partir de diferentes alternativas farmacêuticas de administração de cálcio.

2.1. Objetivos Específicos

- 1) Determinar a biodisponibilidade de cálcio a partir da administração de formiato de cálcio pelas vias oral e intravaginal;
- 2) Avaliar possíveis efeitos hepáticos e renais após a administração de formiato de cálcio por duas vias diferentes;
- 3) Determinar o perfil metabólico dos animais através de análises bioquímicas de AST, GGT, PPT, Ureia, Cálcio total, Cálcio Ionizado, Magnésio e Albumina.

3. . Projeto de pesquisa

DISPONIBILIDADE DE CÁLCIO A PARTIR DE DIFERENTES VIAS DE ADMINISTRAÇÃO EM OVINOS

Equipe:

Pesquisadores colaboradores:

Francisco Augusto Burkert Del Pino

Marcio Nunes Corrêa

Viviane Rabassa

Cássio Cassal Brauner

Eduardo Schmitt

Rogério Bermudes

Rubens Alves Pereira

Joabel Tonello dos Santos

Carolina Bepalhok Jacometo

Alunos Pós-Graduação:

Alexandre Ferreira Bilhalva

Andressa Stein Maffi

Antonio Amaral Barbosa

Camila Pizoni

Flávia Plucani do Amaral

Josiane de Oliveira Feijó

Iusca Sampaio Finger

Maria Amélia Agnes Weiller

Mozer Manetti de Ávila

Rafael Herbstrith Krusser

Alunos Graduação:

Alice de Moura Benites

Diego Wobido
Gabriela Bueno Luz
Jéssica Halfen
Joana Piagetti Noschang
Laíse Quevedo Gheller
Larissa Alt Tavares
Lucas Augusto Hasse
Lucas Jackson de Souza
Mauricio Cardozo Machado
Monique da Silva Costa
Nathaly Carpinelli
Otávio de Carvalho Madruga
Otávio Zacher Buchain
Tiago Garlet
Vinicius Montagna Copes

Pelotas, Fevereiro de 2016.

1. Caracterização do problema:

Paresia puerperal, febre do leite ou mais conhecida como hipocalcemia, é uma das enfermidades que mais acomete vacas leiteiras no período de transição que possui alto impacto econômico, classificada como “doença de produção” (Brozos *et al.*, 2011). Neste período, ocorrem mudanças nutricionais, hormonais e por isso é considerado estratégico para a vida produtiva da vaca leiteira especialmente por tratar-se da fase que medidas podem ser adotadas a fim de obter-se maior produtividade, menor taxa de transtornos metabólicos e, conseqüentemente, menor número de descartes involuntários (Ortolani, 2009). O cálcio (Ca) é o terceiro íon (Ca^{2+}) mais abundante no corpo e desempenha um papel importante sobre a função celular normal, transmissão neural, a estabilidade da membrana, estrutura óssea, coagulação do sangue e sinalização intracelular (Liamis *et al.*, 2009).

A hipocalcemia é uma doença metabólica que acomete principalmente bovinos e ovinos na qual os mecanismos homeostáticos do organismo não conseguem manter a concentração sérica de Ca^{2+} dentro dos limites fisiológicos, normalmente no início da lactação por se tratar da fase de maior exigência dos animais. (Horst *et al.*, 1997). Os requerimentos nutricionais das fêmeas aumentam durante as últimas semanas antes do parto, quando se acelera o desenvolvimento fetal em torno de 70% do seu crescimento (Jacques, 2011). Ocorre geralmente em vacas com três ou mais gestações e principalmente de alta produção, devido a maior produção, assim maior demanda de cálcio para a glândula e maior predisposição a hipocalcemia e para uma série de outras doenças ou transtornos que reduzem consideravelmente a produção leiteira (Curtis *et al.*, 1984 & Jacques, 2011). Em torno de 25-54% de vacas leiteiras apresentam hipocalcemia subclínica (Reinhardt *et al.*, 2011). Vacas em segunda ou mais lactações tendem a ter hipocalcemia em 50% a mais que primíparas (Oetzel, 2013). Desequilíbrios alimentares, como o sobrepeso no pré-parto, predispõem muito a hipocalcemia (Jacques, 2011), estando associada à diminuição da ingestão de alimentos contribuindo para o desenvolvimento deste transtorno, acometendo as vacas durante o final da gestação ou início da lactação (Brozos *et al.*, 2011). Além disso, ocorre a diminuição da motilidade ruminal e abomasal, tornando o animal propenso a alterações como deslocamento de abomaso (Goff, 2008; Kimura *et al.*, 2006; Reinhardt *et al.*, 2011; Curtis *et al.*, 1983). Situações como gestações gemelares,

quadros de hipomagnesemia, hipofosfatemia podem predispor à hipocalcemia (Goff, 2008).

Como prevenção a fim de evitar perda na produção, o uso da dieta aniônica (dietas ricas em fósforo, cloro e enxofre) exercem um efeito iônico, tendo influência no pH sanguíneo, determinando assim, os níveis séricos e regulação dos hormônios responsáveis pela calcemia. (Block, 1994). A dieta tem como função aumentar a reatividade do PTH, fazendo com que no momento em que o animal necessite de altos índices de Ca^{2+} , o metabolismo sofra menos consequências devido à adaptação prévia administrada na dieta pré-parto (Horst *et al.*, 1997). Ramos-Nieves *et al.*, (2009) afirmam que dieta aniônica não diminui hipocalcemia subclínica em alguns casos. Outrossim, possui baixa palatabilidade, e quando fornecida próximo ao parto, pode reduzir a ingesta alimentar e agravar ainda mais o BEN, comum neste período (Cavaliere & Santos 2001). Goff(2008) relata que o sal aniônico diminuiu apenas em 1% os sinais clínicos.

Diante isto, outros métodos preventivos veem sendo pesquisados com finalidade de reduzir perdas econômicas causadas pela doença, principalmente em carácter subclínico. Substâncias quelantes, as quais removem o Ca^{2+} da circulação, (Jorgensen *et al.*, 1999, Hansen *et al.*, 2003; Mellau L.S.B. *et al.*, 2001), como o etilenodiaminotetracético dissódico por EV (Na_2EDTA), incorporação de zeólitos na ração ligando-se ao Ca^{2+} para que não haja absorção (US6890550B1 e US7235256B2), administração de óleos vegetais que se ligam ao Ca^{2+} , formando um sabão insolúvel e impedindo a absorção de Ca da dieta. (Wilson, 2003). Segundo a patente US2009/0202671 o farelo de arroz possui em sua constituição ácido fítico, um antagonista da absorção de Ca pois seus grupos fosfato se ligam a um íon de Ca^{2+} , diminuindo os níveis de Ca^{2+} no pré-parto. A vitamina D ativa, cujo papel na homeostase é absorção intestinal de Ca^{2+} , é um método preventivo da hipocalcemia, porém sua administração de ser feita entre 24 e 96 hs antes do parto, o que é difícil de determinar, tornando-se um problema. (Goff, 2008). A administração de PTH também tem sido estudada, mas seu custo é elevado e sua administração não garante prevenção do quadro subclínico administrando-o antes de 60 horas pré-parto. (Goff, 2008).

O uso de sais de cálcio em bolus, soluções em gel ou aquosas tem sido outra alternativa quando se objetiva prevenção da enfermidade. Dos sais de Ca^{2+} , o citrato de sódio é o sal mais solúvel que o carbonato de cálcio (Hanzlik *et al.*, 2005)

apresentando maior disponibilidade (Heeler, 1999). O formiato de cálcio é um sal altamente solúvel, 30,8% do peso do Ca^{2+} . Para ser absorvido deve ser na forma solúvel ou os íons Ca^{2+} dissolvidos em água. É absorvido, em mulheres, pelo trato gastrointestinal pela combinação de transporte ativo e difusão passiva, onde o componente ativo é saturado (estimulado pela $1,25 \text{ DH-D3}$ no jejuno e duodeno proximal). No jejuno e íleo distal ocorrem processos mais longos, pois o trânsito é lento e permitindo a absorção de grande cargas de Ca^{2+} que saturam no processo ativo, sendo mais solúvel que o carbonato. Dose, taxa de esvaziamento gástrico, taxa de desintegração e dissolução da forma influenciam a absorção (Hanzlik *et al.*, 2005). O cloreto de cálcio aumenta concentração no sangue e aumenta capacidade de resposta ácida em vacas (ativando mobilização de cálcio das reservas), porém é cáustico para vias aéreas. (Oetzel, 2013). Em gel causa inflamação no abomaso e necrose (Intyri, 2002). O propionato de cálcio possui absorção lenta e a dose deve ser bastante alta do cálcio elementar, entre 75 e 125 g (Oetzel, 2013). Carbonato de cálcio não possui boa disponibilidade e provoca resposta alcalina, pois forma bicarbonato, opção melhor como tratamento no pós-parto ao invés de método profilático (Oetzel, 2013). Sampson *et al.*; 2009 utilizou em seu estudo um produto comercial contendo associação de cloreto de cálcio e sulfato de cálcio a fim de determinar o efeito sobre a homeostase do cálcio imediatamente após o parto. Ele observou aumento significativo nos níveis de Ca^{2+} no soro e diminuiu valores de pH da urina. Oetzel *et al.*, 2013 salienta que fornecendo uma quantidade típica de cloreto de cálcio (por exemplo, 50 g de cálcio elementar), em uma pequena dose oral proporciona a melhor absorção do que a administração de 100 g de cálcio elementar a partir do cloreto de cálcio na água, resultando no sangue excessivos níveis de Ca^{2+} podendo desligar os mecanismos de homeostase e estimular a calcitonina para proteger da hipercalcemia.

Isto posto, as tecnologias para prevenção de hipocalcemia tendem a emergir para que se busque soluções viáveis principalmente à quadros subclínicos que agravam as perdas da produção. O desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para uso veterinário bem como as vias de administração possuem papel extremamente importante para espécies ruminantes, visto que estas são compostas de barreiras de absorção de fármacos (ambiente ruminal) que requerem terapias mais longas ou até mesmo maneiras que suportem a passagem ou até não passagem por estas barreiras. Dispositivos de liberação modificada são positivos

neste ponto. Já existem estudos que demonstram a modificação de medicamentos como o uso de comprimidos com antibióticos depositados no rumem liberando o fármaco gradativamente (US3773921), revestimentos de nutriente e fármacos que permite a liberação no abomaso e intestino delgado sendo insolúvel em $\text{pH} \geq 6$ e solúvel em $\text{pH} \leq 3$ (US4199561), sistema de liberação que liberava apenas determinada concentração em um certo período constituindo uma parede semipermeável onde o princípio ativo localizado no interior era sensível ao pH ruminal (US4595583).

Outra via opcional de administração de fármacos, a via intravaginal, não possui só efeito local, mas também sistêmico, por sua superfície apresentar elevado suprimento sanguíneo, diminuição do efeito de primeira passagem e relativa permeabilidade a alguns fármacos. A microflora normal produz ácido láctico suficiente para manter as secreções vaginais em pH de 3,5-4,5 (Machado, 2012). Segundo o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto, correspondente ao Estatuto do Medicamento, define-se forma farmacêutica como “o estado final que as substâncias ativas apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado”. Esta via já em sido utilizada para administração de agentes antimicrobianos (US 6951654), sistema de liberação lenta do tipo reservatório (US4286587). Os dispositivos têm tamanhos e formas que possibilita sua inserção e retenção no interior da vagina. Para a fabricação de sistemas de liberação de fármacos, o uso de polímeros biodegradáveis tem sido a preferência por serem compostos de fácil moldagem e assimiláveis pelo organismo animal. Além da maior biocompatibilidade quando comparados aos materiais sintéticos, possuem também um menor custo de preparação, otimização dos efeitos terapêuticos da substância ativa permitindo o uso de menores dosagens, redução da frequência de administração, além de possibilitar a projeção de diferentes formatos e tamanhos (BR1020140291687).

2. Objetivos e hipótese

2.1. Objetivo geral

Avaliar a biodisponibilidade de cálcio e o metabolismo de ovelhas a partir de diferentes alternativas de administração de formiato de cálcio.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar a biodisponibilidade de cálcio a partir da administração de formiato de cálcio pelas vias oral e intravaginal;
- 2) Avaliar possíveis efeitos hepáticos e renais após a administração de formiato de cálcio pelas diferentes vias;
- 3)) Determinar o perfil metabólico dos animais através de análises bioquímicas de AST, GGT, Ureia, Cálcio total, Albumina.

2.3. Hipótese

A biodisponibilidade de cálcio pode ser maior quando o formiato de cálcio é administrado através de um dispositivo intravaginal quando comparado à via oral.

3. Metodologia

3.1. Instalações

O presente estudo será realizado na fazenda experimental da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O Centro Agropecuário da Palma conta com 1257 hectares, localizada no distrito Capão do Leão/RS.

Os animais serão mantidos em sistema extensivo de produção sob mesmas condições de manejo e alimentação

3.2. Animais

Serão utilizadas 23 ovelhas da raça Corriedale divididas entre 4 grupos. Os animais serão pesados e divididos aleatoriamente.

Grupo dispositivo tratamento (GDT), que receberá dispositivo intravaginal contendo formiato de cálcio e cloreto de magnésio, n=6.

Grupo dispositivo controle (GDC), que receberá dispositivo intravaginal base (sem substâncias ativas), n=6.

Grupo oral tratamento (GOT), que receberá solução oral contendo formiato de cálcio e cloreto de magnésio, n=6.

Grupo oral controle (GOC), que receberá apenas água purificada como placebo, n=6.

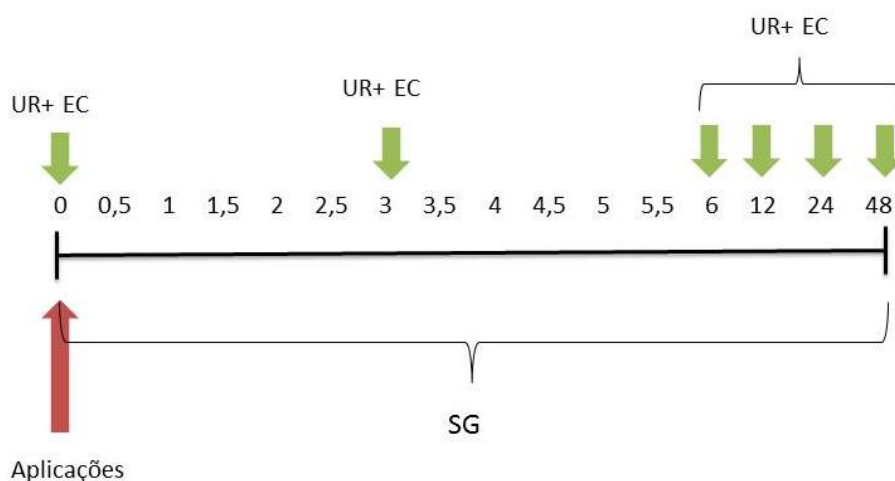
As administrações serão feitas no momento zero. Os grupo 1 e 2 (grupos que receberão os dispositivos intravaginais) terão início no primeiro dia às 9 horas

terminando no dia 3 às 9 horas. Os grupos 3 e 4 (grupos que receberão soluções orais) iniciarão às 6 horas do dia 2 e finalizarão às 6 horas do dia 4.

A descrição detalhada das etapas de preparação dos dispositivos poliméricos será mantida em sigilo, pelo potencial de inovação que este projeto representa. Apenas podemos mencionar que os dispositivos do GDT terão 15g de formiato de cálcio e 5,7g de cloreto de magnésio, já os dispositivos do GDC, não terão em sua composição os sais. As soluções orais do GOF terão 15 g de formiato de cálcio e 5,7 g de cloreto de magnésio dissolvidos em 50 ml de água destilada. O GOC receberá apenas 50 ml de água destilada. Serão aplicadas por via oral com o auxílio de uma seringa de 60 ml, evitando perdas.

3.3. Coletas das amostras

As amostras sanguíneas serão coletadas por punção na veia jugular com tubos Vacutainer contendo ativador de coágulo, após centrifugadas a 3000rpm, com finalidade de se separar o soro para análise de Cat, Mg, proteínas totais (PPT), AST e gamaglutamiltranspeptidase (GGT), ureia, creatinina e albumina nos seguintes momentos em relação aos tratamentos: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 12; 24 e 48 horas. Para avaliar pH de urina o método usado para coleta será por asfixia nos momentos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas em relação aos tratamentos. O pH será avaliado por peagâmetro de bancada modelo Tecnopon mPA 210. Nos mesmos momentos serão feitos exame clínicos de todos os animais.



Legenda:

- UR: coleta de urina-avaliar pH
- EC: exame clínico
- SG: coleta de sangue

3.4. Análises sanguíneas

Serão realizadas análises das concentrações de Cat, Mg, PPT, ureia, AST e GGT e albumina mensurados através de método colorimétrico por Kits por leitura no analisador bioquímico automático modelo Labmax Pleno. As concentrações de cálcio ionizado (Ca^{2+}) serão estimadas pela seguinte fórmula: $(6 \cdot \text{Cat} - ((0,19 \cdot \text{PPT}) + \text{albumina}) / 3) / ((0,19 \cdot \text{PPT}) + \text{albumina} + 6)$ (Labtest).

3.5. Análise Estatística

Os dados serão analisados utilizando análise de medidas repetidas (ANOVA) no programa NCSS (2005), considerando-se como efeito aleatório o animal, assim como efeitos fixos de tratamento (GDF, GDC, GOF, GOC), período (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 12; 24 e 48 horas) e as interações entre tratamento, período e animais (Full Model). As comparações entre médias serão submetidas ao teste de Tukey-Kramer.

4. Resultados e Impactos esperados

Espera-se que com esse trabalho possa ser viabilizado o uso estratégico de um dispositivo intravaginal contendo formiato de cálcio e cloreto de magnésio, visto o aumento dos níveis de cálcio disponível na circulação sanguínea, bem como baixos níveis de AST, GGT e ureia comprovando segurança da administração intravaginal, além de produzir uma dissertação de mestrado, publicar pelo menos 1 artigo em revistas de circulação internacional e 1 nacional, classificadas na área de zootecnia como entre "A1" e "B1" no Sistema de Classificação de Periódicos, Anais e Revistas da CAPES. Divulgar os resultados em congressos da área em âmbito nacional e internacional e divulgar os resultados em congressos da área em âmbito local e regional, tais como Congressos de Iniciação Científica e Encontros de Pós-graduação.

5. Qualificação da equipe envolvida

Para execução deste projeto trabalharemos com uma equipe multidisciplinar, com a participação de pesquisadores/professores de nossa instituição.

7. Referências:

BLOCK, E. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.5, p.1437-1450, 1994.

BROZOS, C.; MAVROGIANNI, V.S.; FTHENAKIS, G.C. Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 105–113, 2011.

CAVALIERI F.L.B.; SANTOS G.T. Balanço catiônico-aniônico em vacas leiteiras no pré-parto. 2011 Acesso em 13 de dezembro. 2015. Disponível em <<http://www.nupel.uem.br/balanco.pdf>>

CURTIS, C.R.; ERB, H.N.; SNIFFEN, C.J.; SMITH, A.D.; POWERS, P.A.; SMITH, M.S.; WHITE, M.E.; HILLMAN, R.B.; AND PEARSON, E.J. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. **J. Am Vet Med Assoc**. 183(5):559-61. 1983.

CURTIS, C.R.; ERB, N.H.; SNIFFEN, C.J.; SMITH, A.D. Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.817. 1984.

Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto; Estatuto do Medicamento. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.6/1124>. Acesso em: 11/12/2015.

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.

HANSEN, S. S.; NÖRGAARD, P.; PEDERSEN, C.; JÖRGENSEN, R. J.; MELLAU, L. S. B. The Effect of Subclinical Hypocalcaemia Induced by Na₂EDTA on the Feed Intake and Chewing Activity of Dairy Cows. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 193–205, 2003.

HANZLIK, R. P., FOWLER, S. C.; FISHER, D. H. Relative bioavailability of calcium from calcium formate, calcium citrate, and calcium carbonate. . **The journal of pharmacology and experimental therapeutics** 2005 Jun;313(3):1217-22.

ROTH, H. H., OWEN P. W. , CHIU. T. T.; A Dow Chemical Company. Coated nutrients and medicaments for veterinary use. Int. Cl. A61K 31/74. US 06 / 015,037. 26 fev. 1979. 22 abr. 1980. US4199561

HELLER, H. J.; STEWART, A.; HAYNES, S.; PARK, C. Pharmacokinetics of calcium absorption from two comercial calcium supplements. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 39, n. 11, p. 1151-1154, 1999.

HORST R.L., GOFF J.P., REINHARDT T.A. & BUXTON D.R.Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. **Journal Dairy Science**.80:1269-1280, 1997.

JACQUES, F.E.S.; Hipocalcemia Puerperal em vacas de Leite. Trabalho de Conclusão de Curso. Porto Alegre 2011. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/38728/000793606.pdf?sequence=1> Acesso em: 13/11/2015.

ECKENHOFF, J. B.; CORTESE, R. ; LANDRAU, F. A.; Delivery system controlled administration of beneficial agent to ruminants. Int. Cl. A61K 9/22. US 06/590,778. 19 mar. 1984, 17 jun. 1986. US4595583

MARTIN-TERESO, J. New York. Milk fever. Int. Cl. A23K 1/18. US 12 / 304,414. 14 de jun. 2007. 13 agos. 2009. US2009/0202671

JORGENSEN, R.J.; NYENGAARD, N.R.; DANIEL, R.C.W.; MELLAU, J.S.B.; ENEMARK, J.M. Induced hypocalcaemia by Na₂ EDTA infusion. A review. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, p.389-407, 1999.

MALCOLM, K.; WOOLFSON, D.; ELLIOTT, G.; SHEPHARD, M. Galen (Chemicals) Limited. Intravaginal drug delivery devices for the administration of an antimicrobial agent. Int. Cl. A61F 6/06. US 10/107,997. 27 mar. 2002, 4 out. 2005. US 6951654

KIMURA, K.; REINHARDT, T.A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89, n. 7, p.2588–2595, 2006.

LH MCINTYRE & SJ WESTON. An investigation of the safety of oral calcium formate in dairy cows using clinical, biochemical and histopathological parameters, **New Zealand Veterinary Journal**, 50:5, 195-198, 2002.

LIAMIS, G.; MILIONIS, H. J.; ELISAF, M. A review of drug-induced hypocalcemia. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 6; p. 635-642, 2009.

MACHADO, R. S. M. Desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica: a folha vaginal: experiência profissionalizante na vertente de farmácia comunitária e investigação. Relatório de estágio. Universidade da Beira Interior. 2012

MELLAU, L.S.B.; JORGENSEN, R.J.; ENEMARK, J.M.D. Plasma calcium, inorganic phosphate and magnesium during hypocalcaemia induced by a standardized EDTA infusion in cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.42, n.2, p.251-60, 2001.

OETZEL, G. R. Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, n.2, p. 447-455, 2013.

ORTOLANI, E.L. Enfermidades do Período de Transição. In: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7660/5433>. Acesso em: 09/10/2015.

PATRICK S. WONG. Alza Corporation. Vaginal drug delivery system made from polymer. Int. Cl. A61F 5/46.US 06/113,499. 1 set. 1981, 21 jan. 1980. US4286587

PEREIRA, R. A. ; CORREA, M. N. ; FEIJO, J. O. ; PINO, F. A. B. ; SCHMITT, E. . Dispositivo intravaginal para indução de hipocalcemia em ruminantes. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140291687, 24/11/2014, Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

RAMOS NIEVES, J. M.; THERING, B. J.; WALDRON, M. R.; JARDON, P. W.; OVERTON, T. R. Effects of anion supplementation to low-potassium prepartum diets on macromineral status and performance of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.11, p.5677-91, 2009.

REINHARDT, A.; LIPPOLIS, J. D.; MCCLUSKEY, B. J.; et al. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 122-124, 2011

JORGENSEN, R.J.; Innovation, Farum. Method of preventing parturient hypocalcemia in animals and compositions used therein. Int. Cl. A23K 1/175. US09/527,680. 17 de março 200. 10 maio 2005. US6890550B1

SHETH P. ; STIEL D. Hoffmann La Roche. Therapeutic compositions, Int. Cl. A61K 27/12. US 199,004. 15 nov. 1971, 20 nov. 1973. US3773921

WILSON, G.F. Development of a novel concept (Calcigard) for activation of calcium absorption capacity and prevention of milk fever. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 97, p. 77–82, 2003.

4. Relatório de atividade de campo:

4.1. Local

O presente estudo foi realizado na fazenda experimental da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) localizada no município de Capão do Leão/RS.

4.2. Animais, dieta e manejo

O período do estudo a campo foi do dia 17 a 20 de outubro de 2015. Os animais foram mantidos em sistema extensivo de produção sob mesmas condições de manejo e alimentação. O peso individual dos animais e as médias de cada grupo encontram-se na tabela 1. Foram utilizadas 24 ovelhas da raça Corriedale divididas entre 4 grupos contendo 6 animais em cada grupo. Grupo dispositivo CaMg (DCaMg) recebeu dispositivo intravaginal contendo formiato de cálcio e cloreto de magnésio, grupo dispositivo controle (DC) recebeu dispositivo intravaginal não contendo os sais, grupo oral CaMg (OCaMg) recebeu solução oral contendo sal formiato de cálcio e cloreto de magnésio e o grupo oral controle (OC) recebeu apenas água destilada.

As administrações foram feitas no momento zero e as amostras sanguíneas foram coletadas por punção na veia jugular com sistema *Vacutainer*[®] (BD Diagnostics[®], São Paulo, Brasil), contendo ativador de coágulo para análise de Cat, Cai, Mg, PPT, ureia, AST e GGT e albumina de 30 em 30 minutos até as 6 horas e após, nos momentos 12, 24 e 48. Para avaliar pH de urina o método usado para coleta foi por asfixia nos momentos 0, 3, 6, 12 24 e 48 horas em relação aos tratamentos. O pH foi avaliado por peagâmetro de bancada modelo Tecnopon mPA 210[®] (Ms Tecnopon Instrumentação[®], São Paulo, Brasil). Nos mesmos momentos foram realizados exame clínicos de todos os animais a fim de acompanhar sanidade dos animais. Foram mensuradas a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal, movimentos ruminais, tempo de perfusão capilar (TPC) e coloração das mucosas oral, ocular e vaginal.

Foram realizadas análises das concentrações de Cat, Mg, PPT, ureia, AST e GGT e albumina através de kits colorimétricos (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil) por leitura no analisador bioquímico automático modelo Labmax Plenno[®] (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil).

As concentrações de Cai foram estimadas pela seguinte fórmula: $(6.Cat - ((0,19.PPT) + albumina) / 3) / ((0,19.PPT) + albumina + 6)$ (Labtest, Lagoa Santa/MG, Brasil).

Tabela1: Pesos individuais e as médias de cada grupo, distribuídos homogeneamente.

:

DCaMg		DC		OCaMg		OC	
Identificação	Peso (Kg)	Identificação	Peso(Kg)	Identificação	Peso(Kg)	Identificação	Peso (Kg)
12	45,2	166	54,2	244	54,0	41	53,6
16	43,7	165	52,0	242	52,0	31	50,2
14	56,4	161	48,0	245	47,6	34	47,2
13	52,6	162	45,6	243	45,5	44	45,3
15	48,4	163	44,1	241	44,0	43	43,7
17	46,0	164	43,3	214	43,0	42	42,7
Média	48,71	Média	47,86	Média	47,68	Média	47,11

5. Artigo 1

Este artigo foi formatado em conformidade com as normas da revista Animal

Avaliação metabólica de ruminantes submetidos a diferentes formas farmacêuticas de administração de cálcio e magnésio

G. P. T. da Silva¹, R. A. Pereira¹, L. Q. Gheller¹, G. B. Luz¹, R. F. Prietsch¹, A. F. Bilhalva¹, J. Feijó¹, M. N. Correa¹, F. A. B. Del Pino¹, C. C. Brauner¹

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

Abstract :

Milk Fever it is one of the diseases that more attack dairy cows in the transition period, being considered as a “production of disease”, with high economic impact. Given this, was conducted a study, which the aim was evaluate the serum concentration of total calcium (Cat), ionized calcium (Cai), magnesium (Mg) and metabolism the sheep from two pharmaceutical forms the utilization of calcium and magnesium. In this study were used 24 sheep of Corriedale breed, in post-partum, divided into four groups. Previously all the animals were weighted and divided, homogeneously: group intravaginal device DCaMg (polymer-based + calcium formate + magnesium chloride), control device DC (polymer-based), OCaMg (distilled water + calcium formate + magnesium chloride), OC (distilled water). The blood samples were collected at 6 hours at 30 minute intervals and after 12, 24 and 48 hours, for the evaluation of Cat, Mg, total protein (PPT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), urea, creatinine and albumin concentrations. Cai concentrations were estimated by the following formula: $(6.Cat - ((0,19.PPT) + albumin) / 3) / ((0,19.PPT) + albumin + 6)$. To assess the urinary pH for later comparison between the treatments, was realized urine collection at 0, 3, 6 and 12 hours. The serum concentrations of total calcium and ionized calcium of DCaMg group was higher than the DC. The OCaMg and OC did not differ. The DCaMg and OCaMg did not differ. The serum concentrations of Mg of DCaMg group was higher than the DC. Blood levels of Mg in OCaMg and OC did not differ, and the DCaMg did

35 not differ from the OCaMg. Serum concentrations of PPT, AST, GGT, albumin, urea
36 and pH did not differ between groups. Overall, the intravaginal device makes a
37 potential alternative to ensure a considerable bioavailability of calcium and serves as
38 efficient way for prevention and/or hypocalcemia treatment in ruminants.

39
40

41 **Palavras-chave**

42 Hipocalcemia, formiato de cálcio, cloreto de magnésio, dispositivo intravaginal

43

44 **Implicações:**

45 Este estudo tem por finalidade fornecer à sociedade científica, uma busca de
46 resultados sobre o uso do formiato de cálcio por via intravaginal para ação
47 terapêutica/profilática de hipocalcemia, tanto em vacas como em ovelhas,
48 principalmente no período imediato após o parto.

49

50 **Introdução:**

51 A hipocalcemia é uma doença metabólica que acomete principalmente
52 bovinos e ovinos na qual os mecanismos homeostáticos do organismo não
53 conseguem manter a concentração sérica de cálcio (Ca^{2+}) dentro dos limites
54 fisiológicos ocorrendo geralmente no final da gestação e início da lactação (Horst *et*
55 *al.*, 1997). Por ser fase de maior exigência dos animais, devido o período gestacional
56 ocorrem aumento das necessidades nutricionais e, conseqüentemente, incremento
57 de nutrientes para o produção de colostro e manutenção do organismo (Goff, 2008).
58 As necessidades nutricionais das fêmeas aumentam durante as últimas semanas
59 antes do parto, quando se acelera o desenvolvimento fetal (Jacques, 2011). Por este
60 motivo, fatores como a idade, alta produção e partos gemelares são os principais
61 fatores de risco à hipocalcemia (Goff, 2006). Além disto, a diminuição do Mg no
62 organismo pode agravar ainda mais o quadro da doença, pelo fato do Mg ser um
63 cofator de ligação do PTH ao receptor (Goff, 2008). O íon Mg garante a atividade
64 completa do receptor de PTH, por atuar como cofator em um sítio de ligação
65 presente na Adenilciclase e na fosfolipase C (Corbellini, 1998; Goff, 2006; Houe *et*
66 *al.*, 2001, assim métodos profiláticos que causem a diminuição deste elemento, não
67 são benéficos para a saúde pós-parto de vacas leiteiras.

68 Em vacas leiteiras, em torno de 25-54% destes animais apresentam
69 hipocalcemia subclínica (Reinhardt *et al.*, 2011), tendo este valor suma importância
70 nas perdas econômicas do rebanho. Em ovinos Henze *et al.* (1994) evidenciaram
71 que cerca de 50% das ovelhas gestantes apresentam concentrações plasmáticas de
72 cálcio total menores que 8,4 mg/dL nas últimas semanas da gestação, enquanto
73 ovelhas saudáveis não gestantes possuem média de 10 mg/dL.

74 Com o objetivo de reduzir perdas relacionadas à hipocalcemia, diversas
75 técnicas são disponíveis para a utilização. O uso da dieta aniônica (dietas ricas em
76 cloro e enxofre) exerce um efeito iônico, tendo influência no pH sanguíneo,
77 determinando assim, os níveis séricos e regulação dos hormônios responsáveis pela
78 calcemia (Jacques, 2011; Martins *et al.*, 2016). No entanto, Blanc *et al.*, (2014)
79 afirmam que dieta aniônica não diminui hipocalcemia subclínica em alguns casos,
80 além de ser uma prática que exige maior manejo dos animais, o que dificulta a
81 adoção por parte dos produtores. A incorporação de zeólitos (Goff, 2008),
82 administração de óleos vegetais que se ligam ao Ca^{2+} formando um sabão insolúvel
83 com função de absorver Ca^{2+} da dieta (Wilson, 2003), vitamina D ativa (Goff, 2008) e
84 administração de sais de cálcio em bolus como citrato de cálcio, carbonato de cálcio,
85 cloreto de cálcio, formiato de cálcio e propionato de cálcio. (Hanzlik *et al.*, 2005,
86 Blanc *et al.*, 2014; Oetzel 2013), são outras ferramentas que podem ser utilizadas
87 com o mesmo objetivo de reduzir a hipocalcemia.

88 Diante desta diversidade de sais de cálcio disponíveis para administração
89 em ruminantes, o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para uso
90 veterinário bem como a busca de diferentes vias de administração possuem papel
91 importante em pesquisas de métodos de prevenção e tratamento da hipocalcemia,
92 principalmente porque os ruminantes apresentam uma barreira de absorção de
93 fármacos particular, o ambiente ruminal, demandando terapias mais longas ou até
94 mesmo formas farmacêuticas que suportem a passagem pelo rúmen, sem sofrerem
95 qualquer alteração ou degradação Assim, dispositivos de liberação modificada com
96 revestimentos que resistam ao ambiente ruminal, ou formas farmacêuticas aplicadas
97 a outras vias de administração em ruminantes, são alternativas que tem sido
98 estudadas para tentar contornar estes entraves garantindo a eficiências dos métodos
99 de prevenção e a eficácia das terapias.

100 A via intravaginal é uma via potencial para a administração de fármacos,
101 podendo ser usada não somente para efeito local, mas também sistêmico, pois sua

102 superfície apresenta elevada vascularização sanguínea, não sofre efeito de
103 passagem pelo rúmen e tem significativa permeabilidade a alguns fármacos. Além
104 disso, a microflora normal produz ácido láctico suficiente para manter o pH de 3,5-
105 4,5 (Machado, 2012), o qual pode facilitar o processo de absorção. Por isso, esta via
106 pode ser usada em bovinos e ovinos para a administração de algumas substâncias
107 de interesse, como já é utilizada para a administração de hormônios.

108 A hipótese deste estudo é de que a disponibilidade de cálcio pode ser maior
109 quando o formiato de cálcio é administrado através de um dispositivo intravaginal
110 quando comparado à via oral.

111 Diante deste cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar a disponibilidade de
112 cálcio a partir da administração de duas formas farmacêuticas (oral e intravaginal)
113 contendo formiato de cálcio e cloreto de magnésio e o efeito sobre o metabolismo de
114 ruminantes, utilizando ovelhas como modelo experimental. .

115

116 **Material e Métodos:**

117

118 *Bem estar animal:*

119 O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de
120 Pelotas aprovou todos os procedimentos realizados neste experimento estando este
121 registrado sob o número 2563.

122

123 *Animais, protocolo experimental e tratamentos:*

124 O experimento foi conduzido na Fazenda experimental da Universidade
125 Federal de Pelotas (UFPel), localizada em Capão do Leão/RS, no sul do Brasil. Os
126 animais foram mantidos, sob mesmas condições de manejo durante todo o
127 experimento. Eram alocados nas baias conforme os grupos apenas com água *ab*
128 *libidum* durante as coletas intensas que iam até a hora 6. Após este período eram
129 então liberadas para pastejar em uma parcela única para todos os tratamentos,
130 sendo reunidas novamente para a realização das demais coletas. Foram utilizadas
131 24 ovelhas pós-parto lactantes da raça Corriedale previamente pesadas e divididas
132 de forma homogênea em 4 grupos, com peso inicial médio de 47,5 kg. O grupo
133 dispositivo CaMg (DCaMg), recebeu dispositivo intravaginal contendo formiato de
134 cálcio e cloreto de magnésio (n=6); o grupo dispositivo controle (DC), que recebeu
135 dispositivo intravaginal base (sem substâncias ativas) (n=6); grupo oral CaMg

136 (OCaMg), recebeu solução oral contendo formiato de cálcio e cloreto de magnésio
137 (n=6); e o grupo oral controle (OC), que recebeu por via oral apenas água purificada
138 como placebo (n=6). Os dispositivos utilizados para os tratamentos possuem a forma
139 de projétil e tamanho que possibilitou sua inserção e retenção no interior da vagina
140 de uma ovelha.

141 A descrição detalhada das etapas de preparação dos dispositivos
142 poliméricos será mantida em sigilo, pelo potencial de inovação que este projeto
143 representa.

144 As soluções orais foram preparadas da seguinte forma: foram pesados 15g
145 de Formiato de Ca e 5,7g de Cloreto de Mg e em seguida dissolvidos em 50 ml de
146 água destilada em agitador magnético[®] TMA10CFI (Thelga, Belo Horizonte, Brasil).
147 Foram administradas por via oral com o auxílio de uma seringa de 60 ml, evitando
148 assim possíveis perdas, enquanto os dispositivos intravaginais foram administrados
149 por via intravaginal de maneira totalmente asséptica.

150

151 *Coletas de sangue, de urina e exame clínico:*

152 As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular,
153 utilizando-se o sistema *Vacutainer*[®] (BD Diagnostics, São Paulo, Brasil), sem
154 anticoagulante, para obtenção do soro por centrifugação a 3000rpm em centrífuga
155 de tubos para avaliação das concentrações de cálcio total (Cat), magnésio (Mg),
156 proteínas totais (PPT), aspartato aminotransferase (AST),
157 gamaglutamiltranspeptidase (GGT), ureia e albumina. Durante as 6 primeiras horas
158 após a administrações das soluções orais e dos dispositivos intravaginais, as
159 coletas foram realizadas com intervalo de 30 minutos. Após, foram coletas amostras
160 nas horas 12, 24 e 48. Para avaliação de pH urinário foi realizada coleta de urina
161 nos momentos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas em relação aos tratamentos. O pH foi
162 avaliado por peagâmetro de bancada modelo Tecnopon mPA 210[®] (Ms Tecnopon
163 Instrumentação[®], São Paulo, Brasil). Nos mesmos momentos foram realizados
164 exame clínicos de todos os animais a fim de acompanhar sanidade dos animais.
165 Foram mensuradas a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR),
166 temperatura retal, movimentos ruminiais, tempo de perfusão capilar (TPC) e
167 coloração das mucosas oral, ocular e vaginal.

168

169 *Análises Bioquímicas:*

170 As concentrações séricas de Cat, Mg, PPT, ureia, AST e GGT e albumina
171 foram mensuradas através de método colorimétrico por Kits (Labtest[®], Lagoa Santa,
172 Brazil) através de leitura em analisador bioquímico automático modelo Labmax
173 Plenno[®] (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil).

174 As concentrações de cálcio ionizado (Cai) foram estimadas através da
175 seguinte fórmula: $(6.Cat - ((0,19.PPT) + albumina) / 3) / ((0,19.PPT) + albumina + 6$
176 (Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil).

177

178 *Análises estatísticas:*

179 Os dados foram analisados utilizando análise de medidas repetidas
180 (ANOVA) no programa NCSS (2005), considerando-se como efeito aleatório o
181 animal, assim como efeitos fixos de tratamento (DCaMg, DC, OCaMg, OC), período
182 (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 12; 24 e 48 horas) e as interações entre
183 tratamento, período e animais (Full Model). As comparações entre médias foram
184 submetidas ao teste de Tukey-Kramer.

185

186 **Resultados:**

187 Sobre as concentrações séricas de Cat, houve efeito do tratamento ($P=0,05$)
188 e interação entre coleta e tratamento nos grupo que receberam dispositivo
189 intravaginal ($P=0,0007$), figura 1. Os grupos OCaMG e OC não diferiram ($P>0,05$)
190 entre si, assim como o DCaMg não diferiu do OCaMg ($P>0,05$). Nas concentrações
191 de Cai houve apenas efeito do tratamento ($P=0,03$), figura 2. Os grupos OCaMg e
192 OC não diferiram ($P>0,05$) entre si. Não houve diferença significativa entre o grupo
193 DCaMg e OCaMg ($P>0,05$). Em relação as concentrações séricas de Mg, houve
194 efeito do tratamento ($P=0,002$) e interação entre coleta e tratamento nos grupo que
195 receberam dispositivo intravaginal ($P=0,04$), figura 3. Os grupos OCaMG e OC não
196 diferiram ($P>0,05$) entre si. Não houve diferença significativa entre os grupos DCaMg
197 e OCaMg ($P>0,05$). As médias apresentam-se na tabela 1.

198 As concentrações séricas de PPT, AST, GGT, Albumina, Ureia e pH urinário
199 não diferiram entre os grupos (tabela 2). Após a administração dos dispositivos
200 intravaginais contendo os sais de cálcio e magnésio, os animais apresentaram
201 sintomas clínicos de vaginite.

202

203 **Discussão:**

204 Diante dos resultados de Cat e Cai, que diferiu entre os grupos DCaMg e
205 DC, comprovou-se que o uso de dispositivo intravaginal contendo formiato de cálcio
206 pode ser um método alternativo eficiente de fornecimento de cálcio por propiciar
207 significativa absorção, possivelmente pela alta vascularização vaginal, a qual
208 permite uma relativa permeabilidade de substâncias (Machado, 2012). Ainda vale
209 salientar, que o favorecimento na absorção de Ca^{2+} pela via intravaginal aumenta a
210 disponibilidade sanguínea pelo fato de não haver passagem pelo rúmen, não
211 havendo assim degradação pela flora ruminal e/ou inativação parcia. Desta forma, o
212 fornecimento de Ca^{2+} através de dispositivos intravaginais pode ser uma alternativa
213 (ferramenta) viável para facilitar o manejo preventivo de hipocalcemia em
214 ruminantes.

215 Não houve diferença estatística entre os grupos DCaMg, OCaMg e OC,
216 comprovando que a via intravaginal tem eficiência similar à via oral (VO) disponível
217 comercialmente, visto que o formiato de cálcio por VO já foi comprovado ter
218 biodisponibilidade considerável em humanos (Hanzlik *et al.*, 2005). Em mulheres, os
219 mesmos autores administraram formiato de cálcio por VO e observaram aumento do
220 cálcio sérico em 9% aos 30 minutos, 15% aos 60 minutos e 60% aos 270 minutos
221 após a administração, quando comparado com o carbonato e citrato de cálcio
222 demonstrando que como fonte de cálcio, o formiato apresenta uma eficácia
223 significativa no aumento gradativo dos níveis calcêmicos. De forma semelhante,
224 nosso trabalho revelou que os animais que receberam dispositivo intravaginal com
225 formiato de cálcio e cloreto de magnésio manteve por mais tempo os níveis de cálcio
226 total e de cálcio ionizado, quando comparado aos demais grupos, sendo assim,
227 considerando um animal que está passando por um momento desafiador da
228 metabolização do cálcio, a forma intravaginal pode ter potencial maior de utilização.

229 Oetzel (2013) relatou em seu estudo que o tratamento oral é eficaz dentro de
230 30 minutos, persistindo por até 4-6 horas (hs), o que concorda com nossos
231 resultados quando as administrações foram feitas por via oral e intravaginal,
232 permitindo que esta última possa figurar entre as possíveis alternativas de
233 administração de sais de cálcio para prevenção/tratamento de hipocalcemia (Figura
234 1 e 2). Além disso, deve-se considerar algumas inconsistências que existem sobre a
235 investigação da administração oral, onde há resultados com aumento dos níveis
236 séricos de cálcio (Blanc *et al.*, 2014) enquanto outros que não encontraram a mesma
237 tendência até 9h após o parto (Melendez, 2002). Nossos resultados demonstram

238 que o DCaMg manteve os níveis séricos de cálcio até as 6 hs acima dos níveis do
239 OCaMg, contudo os dois grupos tiveram os níveis dentro dos padrões fisiológicos
240 considerados normocalcêmicos para concentrações de Cai (acima de 4,25 md/dL) o
241 que demonstra boa disponibilidade do formiato de cálcio quando administrado por
242 via intravaginal (Radostits et al. 2002).

243 As concentrações séricas de Mg maiores no grupo DCaMg do que no DC
244 demonstram que ao passo que o dispositivo intravaginal é benéfico para
245 disponibilidade de cálcio, também tem boa disponibilidade para o magnésio. Não
246 houve diferença significativa entre os grupos DCaMg e OCaMg, sendo assim, o
247 dispositivo intravaginal um bom método de absorção de Mg, bem como foi
248 comprovado para o Ca^{2+} . Considerando a importância do papel do Mg na prevenção
249 da hipocalcemia, pela questão da diminuição do Mg no organismo agravar ainda
250 mais o quadro da doença, pelo fato de ser um cofator de ligação do PTH ao receptor
251 (Goff, 2008)

252 Os resultados da Tabela 3, revelam que não houve efeito da utilização dos
253 dispositivos bem como das soluções orais sobre os níveis séricos de PPT, AST,
254 GGT, Albumina, Ureia e pH sanguíneo. Os níveis de PPT, AST, GGT, albumina e
255 ureia estiveram dentro do fisiológico (Radostits et al. 2002), animais sadios
256 apresentam intervalos de 260 a 350 UI para AST e até 70 UI para GGT (Blood &
257 Radostits, 1989), albumina e ureia para ovinos são, respectivamente, de 2,6 a 4,2
258 g/dL e 17 a 45 mg/dL (González et al., 2006), . Para todos os grupos demonstrou-se
259 o não comprometimento hepático e renal dos animais, evidenciando que as duas
260 formas farmacêuticas são seguras para serem utilizadas na prevenção/terapia da
261 hipocalcemia. Scott (2000), observou inflamação e necrose do abomaso em vacas
262 de diferentes lactações abatidas 6 hs antes do último tratamento com formiato oral,
263 sendo que neste trabalho foi utilizado um protocolo de 4 administrações de uma
264 solução comercial oral, com intervalos de 12 hs entre cada dose. A partir disso, o
265 uso do formiato de cálcio pela via intravaginal pode ser um método de administração
266 de fontes de cálcio mais seguro que por via oral, visto que essa via pode evitar
267 lesões de rúmen e abomaso ao passo que a substância ativa não entra em contato
268 com estes órgãos.

269 Pela via oral, Oetzel (2013) sugere a utilização de um protocolo de
270 administração constituído de 4 doses em intervalos de 12 hs, sendo a primeira dose
271 aproximadamente 12 hs antes do parto. Este protocolo, apresenta dificuldades de

272 manejo para ser colocado em prática. Primeiramente, a difícil previsão do momento
273 certo do parto, para a administração da primeira dose (12 hs pré-parto) e, em
274 segundo lugar a difícil administração da dose correta por VO oral em vacas, devido a
275 necessidade de contenção dos animais e dos cuidados para não ocorrer falsa via.
276 Diante disso, o dispositivo intravaginal, torna-se um método fácil de aplicação e
277 utilizando-o logo após o parto, coma fonte de cálcio sendo o formiato, tem boa
278 disponibilidade sanguínea e rápida absorção. ao ponto que mantém os níveis de
279 acima dos valores prejudiciais ao animal até 6 hs.

280 As vantagens do dispositivo intravaginal contendo fontes de cálcio e de
281 magnésio, assim como são benéficas para ovinos, também estende-se para
282 bovinos, especialmente vacas leiteiras. Em nosso estudo usamos pequenos
283 ruminantes como modelo experimental a fim de termos maior controle sobre o
284 manejo durante os dias do experimento. Contudo, esta alternativa farmacêutica pode
285 ser muito bem extrapolada para vacas leiteiras.

286 A administração de alguns métodos têm sido estudadas com o intuito de
287 prevenir a hipocalcemia, porém cada método já em estudo possui seus efeitos
288 deletérios ou até mesmo dificuldades para a prática dos manejos. Com isto, o
289 dispositivo intravaginal a base de formiato de cálcio e cloreto de magnésio torna-se
290 uma alternativa potencial para garantir uma disponibilidade considerável de cálcio e
291 servir de maneira eficiente para a prevenção e/ou tratamento de hipocalcemia em
292 ruminantes.

293 Diante desta diversidade de sais de cálcio disponíveis para administração
294 em ruminantes, o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para uso
295 veterinário, bem como a busca de diferentes vias de administração possuem papel
296 importante em pesquisas de métodos de prevenção e tratamento da hipocalcemia,
297 principalmente porque os ruminantes apresentam uma barreira de absorção de
298 fármacos particular, o ambiente ruminal, demandando terapias mais longas ou até
299 mesmo formas farmacêuticas que suportem a passagem pelo rúmen, sem sofrerem
300 qualquer alteração ou degradação. Isso posto, dispositivos de liberação modificada
301 com revestimentos que resistam ao ambiente ruminal, ou formas farmacêuticas
302 aplicadas a outras vias de administração em ruminantes, são alternativas que tem
303 sido estudas para tentar contornar estes entraves garantindo a eficiências dos
304 métodos de prevenção e a eficácia das terapias.

305 A via intravaginal é uma via potencial para a administração de fármacos,
306 podendo ser usada não somente para efeito local, mas também sistêmico, pois sua
307 superfície apresenta elevada vascularização sanguínea, não sofre efeito de
308 passagem ruminal e tem significativa permeabilidade a alguns fármacos. Além disso,
309 a microflora normal produz ácido láctico suficiente para manter o pH de 3,5-4,5
310 (Machado, 2012), o qual pode facilitar o processo de absorção. Por isso, esta via
311 pode ser usada em bovinos e ovinos para a administração de algumas substâncias
312 de interesse, como já é utilizada para a administração de hormônios.

313 Conclui-se que a administração de fontes de cálcio e magnésio por via
314 intravaginal é tão benéfica sobre a disponibilidade sanguínea quanto a
315 administração por via oral, principalmente quando o cálcio é proveniente de uma
316 fonte de alta disponibilidade, como o formiato.

317

318 **Agradecimentos:**

319 Os autores agradecem à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de
320 Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
321 Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro e à Fazenda da Palma (fazenda
322 experimental) pela disponibilidade da execução do projeto.

323

324 **Referências:**

325 BLANC C.D , VAN DER LISTA M , ALY S.S. , ROSSOW H.A., Silva-del-Rio N .
326 Blood calcium dynamics after prophylactic treatment of subclinical hypocalcemia with
327 oral or intravenous calcium, *J Dairy Sci.* 2014 Nov;97(11):6901-6. doi:
328 10.3168/jds.2014-7927. Epub 2014 Sep 6.

329

330 BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. **Veterinary Medicine.** 7th ed. London: Bailliere
331 Tindal, 1989. 1502 p.

332

333 GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical
334 hypocalcemia in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v.176, p. 50–57, 2008.

335

336 GOFF, J. P. Nutritional and Metabolic Effects on Immune Competence of the
337 Periparturient Cow. 2006 Disponível em: <http://dairy.ifas.ufl.edu/>. Aceso em: !7 de
338 nov. de 2015

339

340 GONZÁLES, F. H. D. et al. Uso de provas de campo e de laboratório clínico em
341 doenças metabólicas e ruminais dos bovinos. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da
342 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000.

343

344 HANZLIK, R. P., FOWLER, S. C.; FISHER, D. H. Relative bioavailability of calcium
345 from calcium formate, calcium citrate, and calcium carbonate. . **The journal of**
346 **pharmacology and experimental therapeutics** 2005 Jun;313(3):1217-22.

347

348 HENZE, P., BICKHARDT, K., FUHRMANN, H. The influence of the hormones insulin,
349 cortisol, growth hormone and total oestrogen on the pathogenesis of ketosis in
350 sheep. **Dtsch. tieraerztl. Wschr.**1994;101:61–65, v. 101, p.61–65, 1994.

351

352 HORST R.L., GOFF J.P., REINHARDT T.A. & BUXTON D.R.Strategies for
353 preventing milk fever in dairy cattle. **Journal Dairy Science.**80:1269-1280, 1997

354

355 JACQUES, F.E.S.; Hipocalcemia Puerperal em vacas de Leite. Trabalho de
356 Conclusão de Curso. Porto Alegre 2011. Disponível em:
357 <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/38728/000793606.pdf?sequence=1>
358 Acesso em: 13/11/2015.

359

360 MACHADO, R. S. M. Desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica: a folha
361 vaginal: experiência profissionalizante na vertente de farmácia comunitária e
362 investigação. Relatório de estágio. Universidade da Beira Interior. 2012

363

364 MARTINS CM, ARCARI MA, WELTER KC, GONÇALVES JL, SANTOS MV. Effect of
365 dietary cation-anion difference on ruminal metabolism, total apparent digestibility,
366 blood and renal acid-base regulation in lactating dairy cows. **Animal.** 2016

367

368 MELENDEZ P., DONOVAN A., RISCO C.A., HALL M.B., LITTELL R. & GOFF J.P.
369 2002. Metabolic responses of transition holstein cows fed anionic salts and
370 supplemented at calving with calcium and energy. **J. Dairy Sci.** 85(5): 1085-1092.

371

372 OETZEL, G. R. Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. **Veterinary**
373 **Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, n.2, p. 447-455, 2013.

374

375 RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica
376 veterinária: um tratado de doenças em bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.
377 9ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p.1278-1297, 2002.

378

379 REINHARDT, A.; LIPPOLIS, J. D.; MCCLUSKEY, B. J.; et al. Prevalence of
380 subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p.
381 122-124, 2011.

382

383 WILSON, G.F. Development of a novel concept (Calcigard) for activation of calcium
384 absorption capacity and prevention of milk fever. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.
385 97, p. 77–82, 2003.

386

387 **Tabelas:**388 Tabela 2- Valores médios \pm erro-padrão de Cat, Cai e Mg.

	Grupos				Valores de p
	DCaMg	DC	OCaMg	OC	
CaT	9,91 \pm 0,38 a	8,33 \pm 0,38 b	9,40 \pm 0,39 ab	9,37 \pm 0,43 ab	P=0.060665
Cai	6,05 \pm 0,23 a	5,04 \pm 0,23 b	5,43 \pm 0,23 ab	5,23 \pm 0,26 ab	P=0.040278
Mg	2,56 \pm 0,14 a	1,69 \pm 0,14 b	2,31 \pm 0,14 a	2,11 \pm 0,16 ab	P=0.003626

389 1= letras iguais em uma mesma linha significam que não houve diferença estatística. Letras
390 diferentes significam que ocorreu diferença significativa ao nível de 5%.

391

392 Tabela 3 – Médias \pm erro-padrão de parâmetros metabólitos de ovelhas da raça Corriedale
393 submetidas a administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio
394 durante experimento

Metabólitos	Grupo Dispositivo		Grupo Oral		Valores de p
	DCaMg	DC	OCaMg	OC	
PPT (mg/dL)	7,04 \pm 0,27	7,01 \pm 0,27	7,07 \pm 0,28	7,34 \pm 0,30	P=0.855117
Albumina (mg/dL)	2,29 \pm 0,10	2,35 \pm 0,10	2,60 \pm 0,10	2,42 \pm 0,11	P=0.201066
Ureia(mg/dL)	34,91 \pm 3,2	39,35 \pm 3,29	34,33 \pm 3,38	34,35 \pm 3,65	P=0.669488
AST(mg/dL)	157,5 \pm 13,26	183,93 \pm 13,26	173,50 \pm 13,62	170,73 \pm 14,71	P=0.579331
GGT(mg/dL)	52,88 \pm 3,71	51,11 \pm 3,71	45,66 \pm 3,81	41,68 \pm 4,11	P=0.197762
pH urinário	7,97 \pm 0,079	7,86 \pm 0,08	8,15 \pm 0,078	8,18 \pm 0,096	P=0.339978

395 PPT= Proteínas plasmáticas
396 AST= aspartato aminotransferase
397 GGT= gamaglutamiltranspeptidase
398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

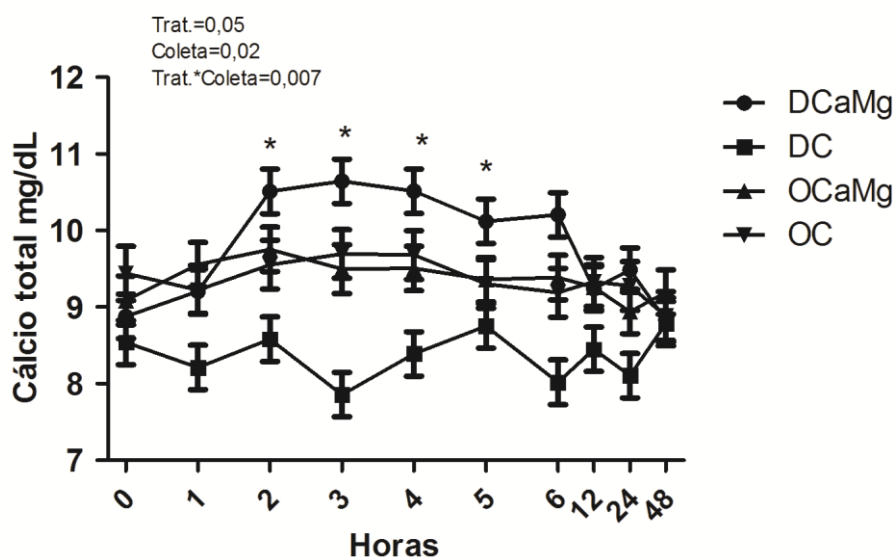
412

413

414

415

416

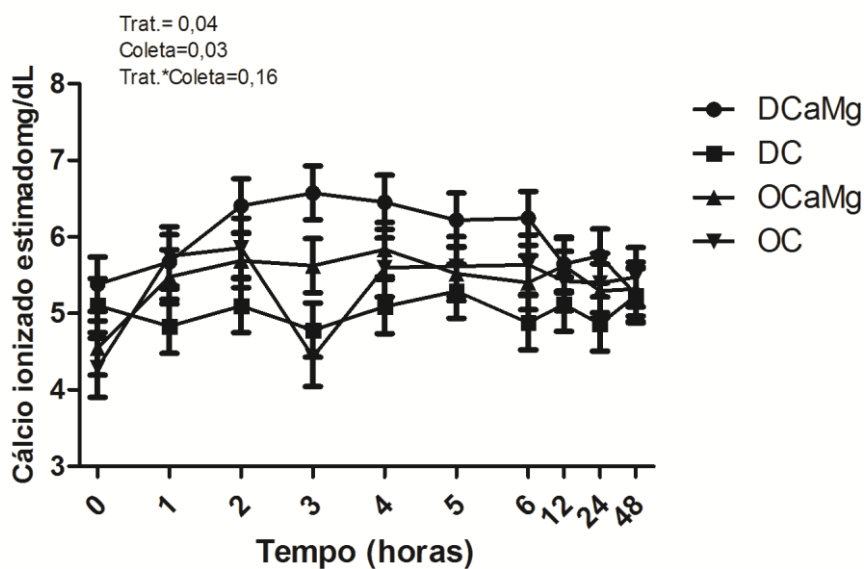
417 **Figuras:**

418

419 Figura 1. Concentrações séricas de cálcio total de ovelhas da raça Corriedale submetidas a
420 administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio durante
421 experimento

422 * P<0,05, pelo teste de Tuckey.

423

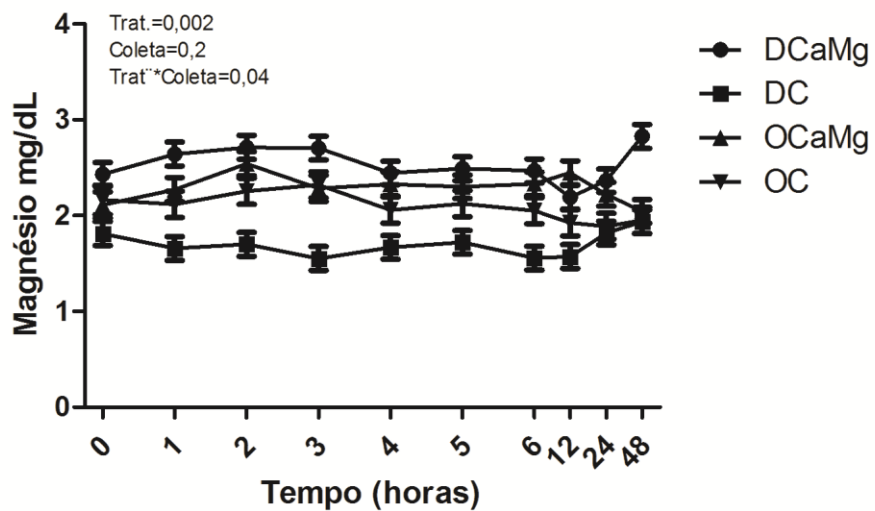


424

425 Figura 2. Concentrações séricas de cálcio ionizado de ovelhas da raça Corriedale submetidas a
426 administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio durante
427 experimento

428 * P<0,05, pelo teste de Tuckey

429



430

431 Figura 3. Concentrações séricas de magnésio de ovelhas da raça Corriedale submetidas a
432 administração de diferentes formas farmacêuticas de fontes de cálcio e magnésio durante
433 experimento

6. Conclusão Geral:

O dispositivo intravaginal contendo fontes de cálcio e de magnésio, possui boa disponibilidade para ovinos, podendo usar estes resultados para extrapolar para vacas leiteiras, tornando-se uma alternativa potencial para garantir uma biodisponibilidade considerável de cálcio, servindo de maneira eficiente e segura para a prevenção e/ou tratamento de hipocalcemia em ruminantes

7. . Referências:

BLANC C.D , VAN DER LISTA M , ALY S.S. , ROSSOW H.A., Silva-del-Rio N . Blood calcium dynamics after prophylactic treatment of subclinical hypocalcemia with oral or intravenous calcium, **J Dairy Sci.** 2014 Nov;97(11):6901-6. doi: 10.3168/jds.2014-7927. Epub 2014 Sep 6.

BLOCK, E. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.5, p.1437-1450, 1994.

BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. **Veterinary Medicine**. 7th ed. London: Bailliere Tindal, 1989. 1502 p.

BROZOS, C.; MAVROGIANNI, V.S.; FTHENAKIS, G.C. Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 105–113, 2011

CAVALIERI F.L.B. & SANTOS G.T. Balanço catiônico-aniônico em vacas leiteiras no pré-parto. 2011 Acesso em 13 de dezembro. 2015. Disponível em <<http://www.nupel.uem.br/balanco.pdf>>

CORBELLINI, C. N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras. Anais do Seminário Internacional sobre Deficiências Minerais em Ruminantes. Porto Alegre, 1998.

CURTIS, C.R., H.N. ERB, C.J. SNIFFEN, R.D. SMITH, P.A. POWERS, M.S. SMITH, M.E. WHITE, R.B. HILLMAN AND E.J. PEARSON. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. **J. Am Vet Med Assoc**. 183(5):559-61. 1983.

CURTIS, C.R.; ERB, N.H.; SNIFFEN, C.J.; SMITH, A.D. Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.817. 1984.

Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto; Estatuto do Medicamento. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.6/1124>. Acesso em: 11/12/2015

ECKENHOFF, J. B.; CORTESE, R. ; LANDRAU, F. A.; Delivery system controlled administration of beneficial agent to ruminants. Int. Cl. A61K 9/22. US 06/590,778. 19 mar. 1984, 17 jun. 1986. US4595583

ELLENBERGER, H.B.; NEWLANDER, J. A.; JONES, C.H., 1932. Calcium and phosphorus requirements of dairy cows. II. Weekly balances through lactation and gestation periods. Vermont Agricultural Experiment Station, Bulletin 342, June 1932.

GOFF, J. P. Nutritional and Metabolic Effects on Immune Competence of the Periparturient Cow. 2006 Disponível em: <http://dairy.ifas.ufl.edu/>. Acesso em: 17 de nov. de 2015

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.

GONZÁLES, F. H. D. et al. Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000.

HANSEN, S. S.; NÖRGAARD, P.; PEDERSEN, C.; JÖRGENSEN, R. J.; MELLAU, L. S. B. The Effect of Subclinical Hypocalcaemia Induced by Na₂EDTA on the Feed Intake and Chewing Activity of Dairy Cows. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 193–205, 2003.

HANZLIK, R. P., FOWLER, S. C.; FISHER, D. H. Relative bioavailability of calcium from calcium formate, calcium citrate, and calcium carbonate. . **The journal of pharmacology and experimental therapeutics** 2005 Jun;313(3):1217-22.

HELLER, H. J.; STEWART, A.; HAYNES, S.; PARK, C. Pharmacokinetics of calcium absorption from two comercial calcium supplements. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 39, n. 11, p. 1151-1154, 1999

HENZE, P. et al. The influence of the hormones insulin, cortisol, growth hormone and total oestrogen on the pathogenesis of ketosis in sheep. **Dtsch tieraerztl Wschr**, v. 101, p.61–65, 1994.

HORST R.L., GOFF J.P., REINHARDT T.A. & BUXTON D.R. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. **Journal Dairy Science**.80:1269-1280, 1997

JACQUES, F.E.S.; Hipocalcemia Puerperal em vacas de Leite. Trabalho de Conclusão de Curso. Porto Alegre 2011. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/38728/000793606.pdf?sequence=1>
Acesso em: 13/11/2015.

JAMES B. ECKENHOFF , RICHARD CORTESE , FELIX A. LANDRAU. Delivery system controlled administration of beneficial agent to ruminants. Int. Cl. A61K 9/22. US 06/590,778. 19 mar. 1984, 17 jun. 1986. US4595583

JAVIER MARTIN-TERESO, New York. Milk fever. Int. Cl. A23K 1/18. US 12 / 304,414. 14 de jun. 2007. 13 agos. 2009. US2009/0202671

JORGENSEN, R.J.; NYENGAARD, N.R.; DANIEL, R.C.W.; MELLAU, J.S.B.; ENEMARK, J.M. Induced hypocalcaemia by Na₂ EDTA infusion. A review. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, p.389-407, 1999.

KARL MALCOLM, DAVID WOOLFSON, GRANT ELLIOTT, MARTIN SHEPHARD. Galen (Chemicals) Limited. Intravaginal drug delivery devices for the administration of an antimicrobial agent. Int. Cl. A61F 6/06. US 10/107,997. 27 mar. 2002, 4 out. 2005. US 6951654

KIMURA, K.; REINHARDT, T.A.; GOFF, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89, n. 7, p.2588–2595, 2006.

LH MCINTYRE & SJ WESTON. An investigation of the safety of oral calcium formate in dairy cows using clinical, biochemical and histopathological parameters, **New Zealand Veterinary Journal**, 50:5, 195-198, 2002.

LIAMIS, G.; MILIONIS, H. J.; ELISAF, M. A review of drug-induced hypocalcemia. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 6; p. 635-642, 2009.

MACHADO, R. S. M. Desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica: a folha vaginal: experiência profissionalizante na vertente de farmácia comunitária e investigação. Relatório de estágio. Universidade da Beira Interior. 2012

MALCOLM, K.; WOOLFSON, D.; ELLIOTT, G.; SHEPHARD, M. Galen (Chemicals) Limited. Intravaginal drug delivery devices for the administration of an antimicrobial agent. Int. Cl. A61F 6/06. US 10/107,997. 27 mar. 2002, 4 out. 2005. US 6951654

MARTINS CM, ARCARI MA, WELTER KC, GONÇALVES JL, SANTOS MV. Effect of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism, total apparent digestibility, blood and renal acid-base regulation in lactating dairy cows. **Animal**. 2016

MARTIN-TERESO, J. New York. Milk fever. Int. Cl. A23K 1/18. US 12 / 304,414. 14 de jun. 2007. 13 agos. 2009. US2009/0202671

MELLENDEZ P., DONOVAN A., RISCO C.A., HALL M.B., LITTELL R. & GOFF J.P. 2002. Metabolic responses of transition holstein cows fed anionic salts and supplemented at calving with calcium and energy. **J. Dairy Sci.** 85(5): 1085-1092.

MELLAU, L.S.B.; JORGENSEN, R.J.; ENEMARK, J.M.D. Plasma calcium, inorganic phosphate and magnesium during hypocalcaemia induced by a standardized EDTA infusion in cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.42, n.2, p.251-60, 2001.

OETZEL, G. R. Oral calcium supplementation in peripartum dairy cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, n.2, p. 447-455, 2013.

ORTOLANI, E.L. Enfermidades do Período de Transição. In: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7660/5433>. Acesso em: 09/10/2015.

PATRICK S. WONG. Alza Corporation. Vaginal drug delivery system made from polymer. Int. Cl. A61F 5/46.US 06/113,499. 1 set. 1981, 21 jan. 1980. US4286587

PEREIRA, R. A. ; CORREA, M. N. ; FEIJO, J. O. ; PINO, F. A. B. ; SCHMITT, E. . Dispositivo intravaginal para indução de hipocalcemia em ruminantes. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140291687, 24/11/2014, Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

POTTS, J. T. & JUPPNER H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the

proteins, their genes, and receptors. In: Avioli LV, Krone SM editors. *Metabolic Bone Disease* 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1998:51- 94.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica veterinária: um tratado de doenças em bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p.1278-1297, 2002.

RAMOS NIEVES, J. M.; THERING, B. J.; WALDRON, M. R.; JARDON, P. W.; OVERTON, T. R. Effects of anion supplementation to low-potassium prepartum diets on macromineral status and performance of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.11, p.5677-91, 2009.

PATRICK S. WONG. Alza Corporation. Vaginal drug delivery system made from polymer. Int. Cl. A61F 5/46.US 06/113,499. 1 set. 1981, 21 jan. 1980. US4286587

REINHARDT, A.; LIPPOLIS, J. D.; MCCLUSKEY, B. J.; et al. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 122-124, 2011.

ROLF JESS JORGENSEN, RJ Innovation, Farum. Method of preventing parturient hypocalcemia in animals and compositions used therein. Int. Cl. A23K 1/175. US09/527,680. 17 de março 200. 10 maio 2005. US6890550B1

ROTH, H. H., OWEN P. W., CHIU. T. T.; A Dow Chemical Company. Coated nutrients and medicaments for veterinary use. Int. Cl. A61K 31/74. US 06 / 015,037. 26 fev. 1979. 22 abr. 1980. US4199561

SAMPSON, J. D.; SPAIN, J. N.; JONES, C.; CARSTENSEN, L. Effects of calcium chloride and calcium sulfate in an oral bolus given as a supplement to postpartum dairy cows. **Vet. Ther.** , v.10, p.131–139, 2009.

SHETH P , STIEL D. Hoffmann La Roche. Therapeutic compositions, Int. Cl. A61K 27/12. US 199,004. 15 nov. 1971, 20 nov. 1973. US3773921

WILSON, G.F. Development of a novel concept (Calcigard) for activation of calcium absorption capacity and prevention of milk fever. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 97, p. 77–82, 2003.

YANTES, D. J; HUNT, E. Molétias endócrinas e metabólicas. Paresia Bovina do parto (febre do leite, hipocalcemia). In. SMITH. B.P.Tratado de medicina Interna de Grande animais. São Paulo: Manole, 1990.1738p.