



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Carlos Magno Chaves Oliveira

**Diagnóstico das deficiências de macro e micro minerais em búfalas (*Bubalus bubalis*)
provenientes da Ilha de Marajó, Estado do Pará.**

**Belém
2014**

Carlos Magno Chaves Oliveira

**Diagnóstico das deficiências de macro e micro minerais em búfalas (*Bubalus bubalis*)
provenientes da Ilha de Marajó, Estado do Pará.**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal. Núcleo de
Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural.
Universidade Federal do Pará. Empresa
Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
Amazônia Oriental. Universidade Federal
Rural da Amazônia.
Área de concentração: Sanidade Animal

**Belém
2014**

Carlos Magno Chaves Oliveira

**Diagnóstico das deficiências de macro e micro minerais em búfalas (*Bubalus bubalis*)
provenientes da Ilha de Marajó, Estado do Pará.**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Sanidade Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: 30 / 06 / 2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto (Orientador)
Instituto de Medicina Veterinária – Campus de Castanhal
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Carlos Hubinger Tokarnia (Membro Titular)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Prof. Dr. Felipe Nogueira Domingues (Membro Titular)
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof^ª. Dra. Marilene de Farias Brito (Membro Titular)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani (Membro Titular)
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Aos meus pais Eliete
Chaves Oliveira e Expedito
Oliveira, *in Memoriam*,
pela dedicação e apoio
incansável na formação dos
filhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto, meu muito obrigado pela amizade, paciência e orientação ao longo de todos estes anos.

À Professora Eloisa Saliba pelo apoio nas dosagens da Lignina purificada e enriquecida (LIPE[®]) e orientação.

À colega e amiga Tatiane Teles Albernaz pela ajuda imprescindível na reta final desse trabalho, e pelo companheirismo sempre presente.

Ao Médico Veterinário Henrique dos Anjos Bom Jardim pela ajuda durante todas as fases de execução do projeto.

Aos colegas e amigos José Alcides Sarmento da Silveira e Natália da Silva e Silva pela ajuda durante as coletas de amostras.

Ao colega André Guimarães Maciel e Silva pelas orientações sempre pertinentes.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) pelo suporte laboratorial para as análises de minerais nos animais.

À Fundação Amazônia Paraense de Apóio à Pesquisa (FAPESPA) pela concessão de bolsa de estudo durante a execução do projeto.

Aos animais, porque sem eles seria impossível a realização deste estudo.

A todos os colegas e amigos que não foram citados, mas que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído.

RESUMO

Objetivou-se avaliar as concentrações de fósforo no soro e no osso, o percentual de cinzas e a densidade específica e os níveis de cobre, cobalto, selênio, zinco e ferro no fígado de búfalas da Ilha de Marajó antes e após suplementação mineral seletiva. Foram utilizadas 14 búfalas mestiças de Murrah com Mediterrânea com idade entre 18 e 36 meses. Os valores médio de fósforo, antes da suplementação, foram de $5,68\text{mg/dl}\pm 1,18$ no soro e de $16,53\%\pm 0,53$ no osso. O percentual de cinzas foi de $59,95\%\pm 1,96$ e a densidade óssea específica foi de $1,52\text{g/cm}^3\pm 0,32$, o que demonstra deficiência de fósforo nos animais criados na Ilha de Marajó. Os valores médios de cobre foram de $7,75\text{ppm}\pm 1,73$, os de cobalto $0,40\text{ppm}\pm 0,17$, os de zinco $88,01\text{ppm}\pm 35,03$, os de selênio $0,22\text{ppm}\pm 0,12$ e os ferro $1.395,72\text{ppm}\pm 764,74$. Esses resultados demonstram deficiência de cobre, de zinco e de selênio, valores adequados de cobalto e excesso de ferro no fígado. Após a suplementação por um período de sete meses os valores de fósforo foram de $6,61\text{mg/dl}\pm 0,87$ no soro e de $16,90\%\pm 0,56$ no osso. O percentual de cinzas foi de $60,30\%\pm 0,95$ e a densidade óssea específica de $1,71\text{g/cm}^3\pm 0,21$. Esses valores caracterizam um aumento significativo nas concentrações de P no soro sanguíneo, no percentual de P nas cinzas e na densidade óssea específica ($P<0,05$), porém não houve um aumento significativo no percentual de cinzas no osso. O aumento médio nos valores de P no osso e nas cinzas não alcançou patamares de normalidade, entretanto 28,6% dos animais tinham valores normais de P no soro, 50% tinham valores normais de P nas cinzas e 64,3% dos animais tinham densidade óssea específica normal. Não houve resposta à suplementação em relação ao percentual de cinzas. Em relação aos micro minerais após a suplementação os valores foram de $205,41\text{ppm}\pm 80,54$ para o cobre, $0,40\text{ppm}\pm 0,22$ para o cobalto, $75,71\text{ppm}\pm 11,74$ para o zinco, $1,30\text{ppm}\pm 1,34$ para o selênio e $826,48\text{ppm}\pm 394,76$ para o ferro, o que evidencia um aumento significativo ($P<0,05$) nas concentrações de cobre e selênio e uma diminuição significativa nos valores de ferro ($P<0,05$). Não houve uma recuperação nos valores de zinco e as concentrações de cobalto permaneceram dentro dos valores de normalidade. O não aumento das concentrações de zinco no fígado após a suplementação pode ter ocorrido em virtude das concentrações elevadas de cálcio na *Brachiaria brizantha* cv Marandu utilizada na alimentação dos animais.

Palavras-chave: níveis de fósforo, osso, micro minerais, fígado.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate in buffaloes of the Marajó Island serum concentrations and phosphorus in bones, the percentage of ashes and the specific density of the bones, the levels of copper, cobalt, selenium, zinc and iron before and after selective mineral supplementation. For this study, 14 crossbred buffaloes of Murrah and Mediterranean aged between 18 and 36 months were used. The average values of phosphorus, before supplementation, were 5, 68 mg/dl \pm 1.18 in serum and 16.53% \pm 0.53 in the bones. The percentage of ashes in bones was 59.95% \pm 1.96 and the specific bone density was 1,52 g/cm³ \pm 0.32, which demonstrates a phosphorus deficiency in animals raised on the island of Marajó. The average copper values were 7.75 \pm 1.73 ppm, the cobalt \pm 0.17 0.40 ppm, the zinc of 88.01 \pm 35.03 ppm, the 0.22 ppm selenium and iron \pm 0.12 1395.72 \pm 764.74 ppm. These results indicate a deficiency of copper, zinc and selenium, cobalt and appropriate values of excess iron in the liver. After supplementation for a period of seven months the phosphorus values were 6.61 mg / dl in serum \pm 0.87 and 16.90 \pm 0.56% in the bones. The percentage of ash was 60.30% \pm 0.95 and the specific bone density was 1.71 g/cm³ \pm 0.21. These values characterize a significant increase in the concentrations of P in blood serum, in the percentage of P in the ashes and on specific bone density ($P < 0.05$), however there wasn't a significant increase in the percentage of ash. The average increase in the values of P in the bones and the ashes did not reach heights of normality, however 28.6% of the animals had normal serum P values, 50% had normal values of P in the ashes and 64.3% of the animals had specific normal bone density. There was no response to supplementation in relation to the percentage of ash. Regarding micro minerals, after supplementation values were 205.41 \pm 80.54 ppm for copper, 0.40 \pm 0.22 ppm for cobalt, 75.71 \pm 11.74 ppm for zinc, 1.30 ppm \pm 1.34 for selenium and 826.48 \pm 394.76 ppm for iron, which shows a significant increase ($P < 0.05$) concentrations of copper and selenium and a significant decrease in the amounts of iron ($P < 0, 05$). There was no response to supplementation in relation to the percentage of ashes. Regarding micro minerals, after supplementation values were 205.41 \pm 80.54 ppm for copper, 0.40 \pm 0.22 ppm for cobalt, 75.71 \pm 11.74 ppm for zinc, 1.30 ppm \pm 1.34 for selenium and 826.48 \pm 394.76 ppm for iron, which shows a significant increase ($P < 0.05$) concentrations of copper and selenium and a significant decrease in the amounts of iron ($P < 0, 05$). There was no recovery of zinc and cobalt concentrations which remained within the normal range. Failure to increased concentrations of zinc in the liver after supplementation may have

occurred because of the high concentrations of calcium in *Brachiaria brizantha* cv Marandu used in animal nutrition.

Keywords: phosphorus levels, bones, micro minerals, liver.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

- Tabela 1 - Valores médios de FDNi (fibra em detergente neutro indigerível) nas fezes e nas pastagens, e da produção fecal (PF) das búfalas durante o período experimental.....39
- Tabela 2 - Valores individuais e médios do peso inicial, final e médio, o consumo de matéria seca (CMS), o consumo de matéria seca em relação ao percentual do peso vivo (CMS%PV), do ganho de peso no período (GPP) e do ganho de peso médio diário (GMD) das búfalas após o experimento.....41
- Tabela 3 - Percentual de fósforo na pastagem (%PP), o consumo de fósforo individual e médio por meio da pastagem e da mistura mineral (CPMM), o consumo médio da mistura mineral (CMMM) e o consumo total individual e médio de fósforo (CTP) em búfalas durante o período experimental.....42
- Tabela 4 - Valores de referência para a espécie bovina e os valores médios de fósforo no soro sanguíneo e nas cinzas, da densidade específica e do percentual de cinzas do osso de búfalas da Ilha de Marajó antes e sete meses após o início da suplementação mineral.....44
- Tabela 5 - A quantidade e o percentual de animais deficientes, subdeficientes e os valores médios de fósforo no soro e no osso, a densidade específica e o percentual de cinzas no osso de búfalas não suplementadas.....45
- Tabela 6 - A quantidade e o percentual de animais deficientes, subdeficientes e os valores médios de fósforo no soro e no osso, a densidade específica e o percentual de cinzas no osso de búfalas sete meses após o início da suplementação mineral.....46

CAPITULO 3

- Tabela 1 - Valores individuais e médios do peso inicial, final e médio, o consumo de matéria seca (CMS), o consumo de matéria seca em relação ao percentual do peso vivo (CMS%PV), do ganho de peso no período (GPP) e do ganho de peso médio diário (GMD) das búfalas após o experimento.....55
- Tabela 2 - Concentração de cobre, cobalto, zinco, ferro e cálcio na matéria seca de *Brachiaria brizantha* e os requerimentos por bovinos.....56
- Tabela 3 - Valores individuais e médios do consumo de matéria seca (CMS) e da mistura mineral (CMM) e a ingestão por meio da pastagem e/ou da mistura de micro minerais pelas búfalas durante o experimento.....57
- Tabela 4 - Valores individuais e médios da ingestão total de cobre, cobalto, zinco, selênio e

ferro por meio da pastagem e/ou da mistura mineral durante o período experimental.....58

Tabela 5 - Valores de referência para a espécie bovina e os valores médios de cobre, cobalto, zinco, selênio e ferro no fígado de búfalas antes e após a suplementação mineral.....60

Tabela 6 - Níveis hepáticos de micro minerais em búfalas oriundas da Ilha de Marajó antes da suplementação mineral.....61

Tabela 7 - Níveis hepáticos de micro minerais em búfalas oriundas da Ilha de Marajó sete meses após o início da suplementação mineral.....61

LISTA DE SIGLAS

ADP - adenosina difosfato

AMP - adenosina monofosfato

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

ATP - adenosina trifosfato

CIF - concentração do indicador nas fezes

CIP - concentração do indicador na pastagem

CMMM - consumo médio da mistura mineral

CMS - consumo de matéria seca

CPMM - consumo de fósforo por meio da mistura mineral

CTP - consumo total de fósforo

DNA - ácido desoxirribonucléico

DP - desvio padrão

FDNi - fibra em detergente neutro indigerível

GMD - ganho de peso médio diário

GPP - ganho de peso no período

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LIPE - Lignina purificada e enriquecida

MS - matéria seca

NRC - National Research Council

PF - produção fecal

Pi - Fósforo inorgânico

PP - fósforo na pastagem

Ppm - parte por milhão

PV - peso vivo

RNA - ácido ribonucléico

RPM - rotação por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

cm³ - centímetro cúbico

Co - cobalto

Cu - cobre

dL - decilitro

Fe – ferro

g - grama

Kg - quilograma

mg - miligrama

mL - mililitro

mM - milimol

nMol – nanomol

P - fósforo

pH - potencial hidrogeniônico

Se - selênio

Zn - zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 FUNÇÃO DOS MINERAIS NO ORGANISMO ANIMAL.....	16
2.1.1 Fósforo.....	16
2.1.2 Cobre.....	17
2.1.3 Cobalto.....	18
2.1.4 Zinco.....	19
2.1.5 Selênio.....	20
2.2 SINAIS CLÍNICOS DAS DEFICIÊNCIAS MINERAIS EM RUMINANTES.....	21
2.2.1. Fósforo.....	21
2.2.2. Cobre.....	22
2.2.2 Cobalto.....	23
2.2.3 Zinco.....	23
2.2.4 Selênio.....	24
2.3 DIAGNÓSTICO DAS DEFICIÊNCIAS MINERAIS.....	25
2.3.1 Fósforo.....	25
2.3.1.1 Níveis de fósforo no soro sanguíneo e no osso de bovinos e búfalos.....	25
2.3.2 Cobre.....	27
2.3.2.1 Níveis de cobre no fígado de bovinos e bubalinos.....	27
2.3.2 Cobalto.....	29
2.3.3.1 Níveis de cobalto e Vitamina B ₁₂ no fígado de bovinos e bubalinos.....	29
2.3.3 Zinco.....	30
2.3.4.1 Níveis de zinco no fígado de bovinos e bubalinos.....	30
2.3.4 Selênio.....	30
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FÓSFORO SÉRICO E ÓSSEO EM BÚFALAS ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO DE MISTURA MINERAL	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO.....	33
2.2 CONTROLE DE PESO DOS ANIMAIS.....	34
2.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO FECAL E CONSUMO DE MATÉRIA SECA.....	34
2.4 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO NA PASTAGEM.....	35
2.5 SUPLEMENTAÇÃO MINERAL.....	35
2.6 COLETA E DOSAGEM DE FÓSFORO NO SORO SANGUÍNEO.....	36
2.7 COLETA DE TECIDO ÓSSEO E DOSAGEM DE FÓSFORO NO OSSO.....	36
2.8 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE ESPECÍFICA E DO PERCENTUAL DE CINZAS NO OSSO.....	37
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4 CONCLUSÃO.....	46
CAPÍTULO 3: NÍVEIS DE COBRE, COBALTO, ZINCO, SELÊNIO E FERRO	

EM BÚFALAS DA ILHA DE MARAJÓ ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM MISTURA MINERAL SELETIVA.....	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO.....	50
2.2 CONTROLE DE PESO DOS ANIMAIS	50
2.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO FECAL E CONSUMO DE MATÉRIA SECA.....	50
2.4 DETERMINAÇÃO DOS MINERAIS NA PASTAGEM.....	52
2.5 SUPLEMENTAÇÃO MINERAL.....	52
2.6 COLETA DE TECIDO HEPÁTICO E DOSAGENS QUÍMICAS.....	52
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4. CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A Ilha de Marajó é um arquipélago localizado na foz do Rio Amazonas, com uma área de 49.606km² divididos em 16 municípios. Possui, segundo a classificação de Köppen, um clima do tipo Am com precipitação anual média de 2.500mm (CARDOSO & PEREIRA, 2002) e um período chuvoso que ocorre de janeiro a junho (TEIXEIRA NETO et al. 1991), quando os pastos ficam submersos, o que forçam os pecuaristas a concentrar seus animais nas partes mais altas da ilha, denominadas “tesos”. Por outro lado, durante o período seco, ocorre uma redução acentuada da disponibilidade de forragem e a pastagem apresenta baixa qualidade nutricional. Em ambas as épocas do ano os rebanhos sofrem limitações nutricionais que afetam a produtividade (TEIXEIRA NETO et al. 1991). Segundo Falesi (1972) e Kendall et al. (1974) o solo da Ilha de Marajó possui uma característica extremamente argilosa e de baixa fertilidade.

Mesmo com essas adversidades de clima e de relevo o arquipélago do Marajó possui um rebanho de aproximadamente 670 mil bovídeos, sendo que desse total, aproximadamente 307 mil são bubalinos (IBGE, 2010). Em geral esses animais são criados em um sistema que se caracteriza por alta taxa de desinformação técnica por parte do produtor, baixa difusão de tecnologias, performances zootécnicas baixas, altas taxas de doenças infecto-contagiosas e baixa remuneração da atividade (ARIMAE & UHL, 1996). Segundo Barbosa et al. (2005) dentre as enfermidades que acometem búfalos e bovinos no estado do Pará, as deficiências minerais se destacam por causarem perdas severas na produtividade, sendo um fator limitante para a criação desses animais na região, caso não haja uma suplementação mineral adequada.

Para Tokarnia et al. (2010) a ocorrência das deficiências minerais está ligada a certas áreas geográficas e quando acentuadas, podem ser responsáveis pela pobreza geral que existe em determinadas regiões, onde a população depende principalmente da criação de gado. As deficiências minerais podem ocorrer de forma severa, com perturbações mais ou menos características, ou de forma leve, com sinais não específicos, como desenvolvimento lento, problemas de fertilidade, baixo rendimento da carcaça e pouca produção de leite. Deficiências leves ou moderadas também podem causar prejuízos econômicos sérios, porque reduzem a produtividade dos animais e podem predispor a outras doenças.

Os efeitos negativos das deficiências minerais sobre a produção, a produtividade e a saúde dos animais ocorre devido a diminuição das diversas funções que os minerais desempenham no organismo animal. Os minerais são encontrados nas células e tecidos do corpo em uma variedade de funções, combinações químicas e em concentrações características, que variam com o elemento e o tecido. As concentrações dos minerais essenciais devem ser mantidas dentro de limites muito estreitos para salvaguardar a função e a integridade estrutural dos tecidos, para que o crescimento, a saúde e a produtividade do animal permaneçam inalterados. A contínua ingestão de alimentos que são deficientes, desbalanceados ou com excesso de minerais provoca mudanças na forma e na concentração do mineral nos tecidos e fluidos do corpo. Em tais circunstâncias, ocorrem alterações bioquímicas que afetam as funções fisiológicas e alterações estruturais podem aparecer (UNDERWOOD e SUTLE, 1999).

Para evitar o aparecimento dessas alterações é necessário que seja oferecido ao animal dietas que contenham os minerais requeridos em quantidades, proporções e disponibilidades adequadas (UNDERWOOD e SUTLE, 1999 e TOKARNIA et al., 2010). Mas para a indicação de medidas corretivas e profiláticas adequadas é necessário o diagnóstico do(s) mineral(ais) deficiente(es). O diagnóstico pode ser realizado por meio do exame clínico completo do animal ou do rebanho, dos achados de necropsia, das dosagens químicas dos minerais nos fluídos e tecidos e pela experimentação, que consiste em oferecer ao animal ou rebanho o(s) mineral(ais) deficiente(es). Sendo que um dos principais parâmetros que pode ser utilizado para avaliação dos resultados é a variação do peso dos animais durante o período experimental (TOKARNIA et al., 2010). O objetivo deste estudo foi determinar as concentrações de fósforo no osso e no soro e de cobalto, cobre, selênio, zinco e ferro no fígado de búfalas mestiças oriundas da Ilha de Marajó, antes e após suplementação mineral seletiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com os conhecimentos atuais, dos 50 minerais que o organismo animal contém somente cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre, denominados de macroelementos, são necessários aos animais em grandes quantidades e o ferro, cobalto, cobre, iodo, manganês, zinco e selênio que são denominados de microelementos, considerados essenciais para o organismo animal e são necessários em pequenas quantidades

aos animais. O molibdênio, vanádio, flúor, silício, níquel, cromo e arsênio podem ser adicionados a essa lista, entretanto, a essencialidade desses elementos é baseada quase que exclusivamente em seus efeitos sobre o crescimento de animais mantidos em condições altamente especializadas e até o momento não se tem demonstrado que tenham efeitos específicos sobre a nutrição dos animais domésticos (UNDERWOOD, 1981; TOKARNIA et al., 2010).

2.1. FUNÇÃO DOS MINERAIS NO ORGANISMO ANIMAL

2.1.1 Fósforo

O fósforo (P) é um nutriente requerido por todos os animais, tem numerosas funções fisiológicas, que inclui desde a transferência de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), até a composição da estrutura dos ossos, dentes e membranas celulares e do fosfato da saliva, que atua como tampão nas mudanças de pH no rúmen. Os ruminantes utilizam uma proporção maior do P da alimentação do que os não ruminantes, porque a microbiota do rúmen produz fitase, que é uma enzima que hidrolisa o fósforo presente nos fitatos, pois a maioria do fósforo nos grãos está nesta forma. O conteúdo de fósforo total na alimentação varia nos diferentes tipos de alimentos utilizados para a nutrição animal. Em geral os grãos contêm mais P do que as plantas forrageiras e os alimentos com alto teor protéico contêm mais P do que aqueles de baixo teor. Alimentos produzidos em solos com baixo teor fosfórico tendem a ter menos P do que aqueles produzidos em solos ricos em P. O P frequentemente tem sido adicionado em dietas de ruminantes à base de forragens e grãos, na forma de fosfato bicálcio, ácido fosfórico e fosfato monossódico. O P é um suplemento mineral caro, onde ocupa a segunda ou terceira colocação, atrás somente dos suplementos energéticos e protéicos ((LEHNINGER, 1994; UNDERWOOD e SUTLE, 1999; RUNHO et al., 2001; SATTER et al., 2005).

Cerca de 80% do P no corpo de um ruminante é encontrado nos ossos e dentes. Os 20% restantes participam ativamente de inúmeras funções em todo o corpo (BREVES e SCHRODER, 1991) distribuído nos fluídos e tecidos moles (UNDERWOOD e SUTLE, 1999).

Menos de 1% do P corporal está presente no sangue. A concentração de Fósforo inorgânico (Pi) sérico é geralmente mantida em 1,3 a 2,6 mM. Concentrações séricas

inferiores a 1,3 mM de Pi pode ser indicativo de deficiência de P, mas as concentrações plasmáticas sozinhas nem sempre são um indicador confiável do *status* de P em ruminantes (SATTEr et al., 2005).

A microflora do rúmen e do ceco de animais que ingerem dietas com baixas concentrações de fósforo, tem a síntese de proteína microbiana prejudicada (UNDERWOOD e SUTLE, 1999). Komisarczuk et al. (1987), trabalharam com rúmen artificial e observaram que quando utilizava concentrações de fósforo abaixo de 0,1 mM ocorria diminuição na digestão da celulose e na produção de ácidos graxos voláteis e a síntese de proteína microbiana diminuiu quando as concentrações de P ficaram abaixo de 0,03 mM.

A ocorrência de níveis baixos de fósforo nos animais é mais comum em ruminantes alimentados com forragens. Isso se deve ao fato de existirem grandes áreas geográficas deficientes de fósforo no solo e conseqüentemente as pastagens produzidas nestas áreas também são pobres em fósforo (MCDOWELL & ARTHINGTON, 2005). E também ocorre variação na concentração desses minerais na planta de acordo com a época do ano e com o estágio de desenvolvimento. O conteúdo de fósforo na planta está diminuído quando a mesma está madura ou seca (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; TOKARNIA et al., 2010).

No Brasil, a deficiência de fósforo acomete bovinos e bubalinos nas diferentes regiões, e não há dúvida que essa deficiência é o distúrbio mineral mais comum e economicamente mais importante (TOKARNIA et al., 2010).

Baseado nas exigências nutricionais da *National Research Council* (NRC) (1996) que estabelece que a necessidade de P para bovinos de corte se encontra entre 11 e 22g por animal/dia na dieta total, Garg et al. (2007), recomendam 36g de P por dia para búfalas em lactação, com produção média de 8 kg de leite. Por outro lado Tokarnia et al. (2010) afirmam que a suplementação de 6g de fósforo por dia na ração ou na mistura mineral é suficiente para evitar o aparecimento dos efeitos negativos da deficiência desse mineral no rebanho.

2.1.2 Cobre

O cobre (Cu) desempenha diversas funções biológicas importantes no corpo do animal, através das cuproenzimas, que são enzimas dependentes de cobre, como a citocromo oxidase, que é necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica; a lisil oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina; a ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina e a superóxido

dismutase que protege as células dos efeitos tóxicos do metabolismo do oxigênio (McDOWELL, 1992; NRC, 2001).

Animais em pastejo ingerem ferro em excesso principalmente junto com o solo ou na forma de óxido férrico adicionado nas misturas minerais. Os bovinos também podem ingerir ferro juntamente com fontes de magnésio ou na forma de ferrugem encontrado em comedouros e bebedouros. Todas essas formas podem ser inertes, entretanto, o ferro do solo e o óxido férrico inibem a absorção de cobre em animais em condições de pastejo (SUTTLE e PETER, 1985).

Os sinais clínicos apresentados pelos animais com deficiência de cobre se relacionam com as concentrações e atividades dessas enzimas (UNDERWOOD, 1981). Para Riet-Correa (2007), as necessidades de cobre com base na matéria seca é de aproximadamente cinco partes por milhão (ppm) para ovinos e de 10 ppm para bovinos, e segundo Tokarnia et al. (2000) os bovinos necessitam de 100mg de cobre/dia para que possam expressar ao máximo seu potencial produtivo e reprodutivo, entretanto, os autores recomendam ofertar 50% desse valor por meio do suplemento mineral. Entretanto, os requerimentos de cobre pelos animais podem aumentar em consequência da presença, em grande quantidade, de outros elementos que inibem a absorção do cobre pelo intestino. Dentre esses elementos podemos citar o ferro, o molibdênio e o enxofre (SUTTLE e PETER, 1985; UNDERWOOD, 1999). Segundo Garg et al. (2007), os requerimentos de cobre para búfalas que produzem 8 kg de leite por dia com 6% de gordura, é de 125 mg.

2.1.3 Cobalto

A função primária do cobalto (Co) é a sua participação na estrutura da vitamina B₁₂ que é produzida juntamente com vários análogos, pelos microorganismos no rúmen (KAWASHIMA et al., 1997). Os ruminantes normalmente não têm qualquer fonte alimentar de vitamina B₁₂, dependem exclusivamente da que é produzida pelas bactérias do rúmen (UNDERWOOD e SUTLE, 1999).

O cobalto também é integrante da estrutura da enzima metilmalonil-CoA mutase uma vez que essa enzima catalisa a transformação de succinato a partir do ácido propiônico, dessa forma, o cobalto desempenha papel essencial no metabolismo energético dos ruminantes (DIRKSEN et al., 2005). Nas bactérias ruminais que também dependem desse complexo

enzimático, o processo é inverso, ocorrendo a transformação de ácido succínico em ácido propiônico (UNDERWOOD E SUTLE, 1999)

Como tratamento e profilaxia da deficiência de cobalto, recomenda-se a administração de 5-10mg de cobalto por cabeça/dia (TOKARNIA et al., 2000), o que está bem além das necessidades (1mg/dia) estabelecidas por Underwood (1981), sob forma de sulfato ou cloreto de cobalto por via oral. Segundo Garg et al. (2007), os requerimentos de cobalto para búfalas que produzem, 8 kg de leite por dia com 6% de gordura, é de 6,25 mg/animal/dia.

Segundo Judson et al. (1997), as forragens para atender as necessidades de bovinos necessitam ter um conteúdo de cobalto de 0,11 mg por quilograma de matéria seca. Entretanto, Kisidayová et al. (2001), afirmam que a recomendação de 0,1 mg de cobalto por quilograma de matéria seca provavelmente não atende os requerimentos da microbiota ruminal e que 1,7 mg por quilograma de matéria seca seria muito mais apropriado para atender as necessidades desta microbiota. Requerimentos de 0,6mg de cobalto por quilograma de MS são sugeridos por Staufenbiel (2005) para bovinos jovens em crescimento.

2.1.4 Zinco

No que se refere ao metabolismo celular, o zinco (Zn) é o elemento que participa no maior número de funções. Esse elemento está intimamente relacionado à atividade da vitamina A, já que a interconversão de vitamina A-alcoólica para vitamina A-aldeído, imprescindível para a visão, é realizada pelas enzimas retinoreductase e álcool-desidrogenase, ambas zinco-metaloenzimas. Existem ainda diversas outras enzimas zinco-dependentes, como a enzima conversora de angiotensina, a fosfatase alcalina, a anidrase carbônica, a collagenase, as carboxipeptidases, a manosidase e a superóxido dismutase (UNDERWOOD, 1981).

O zinco participa também como co-fator ou ativador das enzimas, DNA e RNA polimerases, sendo, portanto participante de processos de proliferação celular e síntese de proteínas. O Zn, constituinte da anidrase carbônica, atua no equilíbrio ácido-básico e na calcificação dos ossos. Também participa na produção, armazenagem e secreção de alguns hormônios, tais como insulina, testosterona e cortisol, além de ativar os seus sítios receptores nas células-alvo (GONZÁLEZ, 2000).

Segundo Smart e Cymbaluk (1997), o zinco também é essencial para a síntese e maturação da queratina, contribuindo dessa forma para a dureza dos cascos e chifres dos animais.

As necessidades de zinco para bovinos variam de 40 a 90 ppm por quilograma de matéria seca do alimento. Bezerros são menos exigentes e animais em produção necessitam de quantidades maiores na alimentação (GONZÁLEZ, 2000; RADOSTITS et al., 2002). As dietas à base de concentrados geralmente contêm quantidades suficientes de Zn para garantir os valores nutricionais ótimos (GONZÁLEZ, 2000). Segundo Garg et al. (2007), as exigências nutricionais de zinco para búfalas em lactação e pesando aproximadamente 400 kg, estão em torno de 1000 mg por dia.

A absorção intestinal de Zn pode ser reduzida pelo excesso de Ca na alimentação e pelos fitatos presentes nos grãos e forragens utilizadas (HADDAD e ALVES, 2006). Entretanto, não há evidências que ocorra reduções significativas sobre absorção de zinco para ruminantes alimentados com forragens e grãos, em virtude da presença de fitases que hidrólisam

o fitato no rúmen (UNDERWOOD e SUTLE, 1999). Em relação a influência do cálcio sobre a absorção intestinal do zinco, Todo et al. (2010) em experimento com ovinos verificaram que o grupo de animais que receberam Ca (5,24 g de Ca/Kg, sendo 3,7 g de Ca da forragem mais 1,4 g da mistura mineral mais 0,14 g do probiótico) e Zn (34,4 mg de Zn/Kg, sendo 14 mg Zn da forragem mais 6 mg Zn do suplemento mineral e mais 14,40 mg do probiótico), apresentaram redução de 11% nas concentrações séricas de zinco em relação ao grupo controle, que não recebeu Ca e Zn suplementar por meio do probiótico.

Radostits et al. (2002) relatam a ocorrência de paraqueratose em bovinos que ingeriram pastagens com teores de zinco entre 20 a 80mg/kg de MS e concentrações de cálcio de 0,6%. Segundo Underwood e Sutle (1999) e Bülbül (2010) os requerimentos de cálcio para bovinos e búbalinos com 300 kg de peso vivo e com um ganho diário de peso de 500g é de 5,5g/kg de MS e de 17g/dia, respectivamente.

2.1.5 Selênio

O selênio (Se) é essencial para o crescimento, reprodução, prevenção contra doenças e para manter a integridade dos tecidos. A função metabólica do selênio esta intimamente relacionada com a vitamina E. Ambos são necessários para que o organismo animal

desempenhe adequada resposta imunológica frente aos diferentes agentes agressores. O selênio é um constituinte essencial da enzima glutathione peroxidase, que tem a função de proteger a membrana celular contra danos causados por peróxidos intracelulares (DIRKSEN et al., 2005; MCDOWELL e ARTHINGTON, 2005), enquanto a vitamina E protege as membranas celulares dos radicais livres provenientes dos alimentos e do metabolismo intermediário (DIRKSEN et al., 2005).

Os requerimentos de Se para bezerros, bovinos jovens e vacas são de 0,2, 0,5 e 2mg por quilograma de matéria seca, respectivamente (DIRKSEN et al., 2005). E para búfalas em lactação é de 3,75mg por dia (GARG et al., 2007).

Quando os animais não recebem quantidades adequadas de selênio na alimentação, são submetidos a uma série de alterações que incluem a distrofia muscular nutricional em cordeiros, bezerros, cabritos, potros e leitões; e a hepatose dietética em suínos e a diátese exsudativa em aves (MCDOWELL e ARTHINGTON, 2005; DIRKSEN et al., 2005). Em bovinos, além dessas alterações ocorrem outros distúrbios que são atribuídos à deficiência desse mineral como retenção de placenta, ciclos estrais irregulares, morte embrionária, abortos, natimortos e fraqueza neonatal (DIRKSEN et al., 2005).

O selênio e a vitamina E têm função importante sobre o sistema imunológico. Em animais com deficiência de selênio ocorre um aumento da atividade oxidativa dos fagócitos durante uma infecção, o que resulta na produção de peróxidos e superóxidos de hidrogênio; esses radicais livres causam dano celular e diminuem a atividade bactericida dos neutrófilos (PHILLIPS, 2001; RADOSTITS et al., 2002).

2.2 SINAIS CLÍNICOS DAS DEFICIÊNCIAS MINERAIS EM RUMINANTES

2.2.1 Fósforo

Bovinos e bubalinos com deficiência de P praticam osteofagia que é uma manifestação muito característica; podem ainda apresentar diminuição da produção de leite, perda ou menor ganho de peso, baixos índices reprodutivos caracterizados por maior intervalo entre partos, anestro e hemoglobinúria no pós-parto (DIRKSEN et al., 2005; RIET-CORREA & TIMM, 2007; TOKARNIA et al., 2010).

Em bubalinos deficientes em fósforo da Ilha de Marajó, além dos sinais supracitados foi observado claudicação e animais apoiando sobre os carpos (BARBOSA et al., 2007; TOKARNIA et al., 2010).

A consequência mais importante da osteofagia é a intoxicação do animal com a toxina botulínica presente nos ossos, que causa o botulismo epizoótico dos bovinos (TOKARNIA et al., 2000, TOKARNIA et al., 2010).

Outro aspecto importante da deficiência de fósforo são as alterações do esqueleto, que são mais acentuadas, tanto mais grave é a carência. Nos animais jovens se verifica raquitismo e nos animais adultos osteomalácia. Em áreas severamente deficientes em fósforo é comum a ocorrência de fraturas nas vértebras, costelas e pélvis em bovinos (RIET-CORREA & TIMM, 2007) e em bubalinos (BARBOSA et al., 2007, TOKARNIA et al., 2010). As alterações no esqueleto são os achados de necropsia mais importantes. Em casos graves de raquitismo e osteomalácia podem-se observar deformações do esqueleto e escoliose. Além disso, podem-se observar alterações na superfície articular, erosão na cartilagem e no tecido ósseo adjacente com proliferação de tecido ósseo periarticular e formação de osteófitos (DIRKSEN et al., 2005). Barbosa et al. (2007), descreveram em búfalos criados na Ilha de Marajó, região sabidamente deficiente em fósforo, a presença de calos ósseos e fraturas em diferentes ossos. A densidade óssea fica diminuída, o que era verificado pela facilidade com que se cortavam as costelas e se retirava o cérebro dos animais usando-se apenas uma faca; os ossos, quando colocados dentro da água flutuavam. Também em estudos sobre a deficiência de P em búfalos da Ilha de Marajó, Cardoso et al. (1992b) observaram fraturas ósseas em 40% dos animais com idades entre 25 e 48 meses, 14% nos animais entre 48 e 72 meses de idade e 0% nos animais até 2 anos de idade.

2.2.2 Cobre

Em bovinos diversos quadros clínicos são observados na hipocuprose, como menor desenvolvimento corporal e baixo desempenho reprodutivo (PHILLIPPO et al., 1987a,b), anemia, osteoporose, alterações da pigmentação dos pelos e diarreia (VALLI 1985, UNDERWOOD & SUTTLE, 1999), ataxia neonatal (TOKARNIA et al. 2010) e morte súbita (BENNETS et al., 1948, MARQUES et al., 2003). No Brasil, a ataxia enzoótica foi descrita pela primeira vez em ovinos no Estado do Piauí (TOKARNIA et al., 1966).

Segundo Barbosa et al. (2005) casos graves de deficiência de cobre ocorrem no Pará, tanto em bovinos quanto em bubalinos; perda de peso e despigmentação de pelos ao redor dos olhos são os principais sinais.

Para Tokarnia et al. (2010), os sinais clínicos da deficiência de cobre em ruminantes são mais evidentes no período das chuvas e se caracterizam por acromotriquia, anemia macrocítica e hipocrômica, crescimento insatisfatório nos animais jovens, baixa produção de leite e baixa fertilidade.

2.2.3 Cobalto

O sinal clínico mais importante e característico da deficiência de cobalto é a anorexia progressiva, mesmo frente à pastagem viçosa e abundante, tendo como consequência crescimento deficiente, perda de peso, rápida perda de massa muscular e alotriofagia, anemia acentuada e morte dos animais. Se a deficiência de cobalto for de grau leve, essas manifestações extremas poderão nunca aparecer (TOKARNIA et al., 2010). Em casos graves de deficiência há intensa palidez das mucosas e os animais se cansam com facilidade (RADOSTITS et al., 2002).

2.2.4 Zinco

Em bovinos a deficiência severa de zinco causa paraqueratose e alopecia que afeta aproximadamente 40% da pele. As lesões são mais acentuadas no focinho, vulva, ânus, base da cauda, orelhas, na parte posterior dos membros traseiros, flanco, pescoço e joelhos (RADOSTITS et al., 2002). Nas deficiências leves os animais diminuem a ingestão e a conversão dos alimentos, apresentam menores taxas de crescimento e ganho de peso, diminuição da produção de leite e ausência de cio (DIRKSEN et al., 2005). Além desses sinais a deficiência de zinco causa também retardo na cicatrização de feridas, diminui a capacidade imunológica em virtude de falhas na atividade das células T, alopecia, falha no crescimento dos pelos, dos cascos e dos chifres, diminuição na síntese de proteínas plasmáticas com consequente hipoalbuminemia e hipoglobulinemia (GONZÁLEZ, 2000).

Uma forma especial de deficiência de zinco é a enfermidade conhecida como paraqueratose hereditária (doença de Adema, linhagem letal A-46) que se deve a um defeito hereditário transmitido por genes autossômicos recessivos, que são letais em homozigose

(DIRKSEN et al., 2005). A presença desta doença foi descrita no Brasil (PEIXOTO et al., 1994). Os animais afetados com essa alteração são incapazes de absorver o zinco a nível intestinal quando administrado em doses recomendadas para o animal (TOKARNIA et al., 2010).

Segundo Tokarnia et al. (2010), em vários países do mundo existem áreas com solos deficientes em zinco. Mcdowell et al. (1983) fizeram um levantamento sobre as deficiências minerais nas forragens da América Latina e constataram que o zinco apresentava níveis baixos em aproximadamente 75% das forrageiras avaliadas.

Altas doses de cálcio, de cobre, de ferro e de cádmio na alimentação reduzem a absorção de zinco a partir do intestino (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; DIRKSEN et al., 2005). Quadros clínicos de paraqueratose são desenvolvidos por suínos alimentados com rações com altos teores de cálcio. Em ruminantes, no Brasil, ainda não foi descrito casos de paraqueratose em consequência da deficiência primária de zinco (TOKARNIA et al., 2010).

2.2.5 Selênio

Segundo Dirksen et al. (2005) a miodistrofia enzoótica (doença dos músculos brancos) pode ser classificada clinicamente como miodistrofia neonatal e miodistrofia enzoótica típica. Na forma neonatal é frequente o aparecimento de natimortos ou o aparecimento de bezerros fracos durante a primeira semana de vida. Esses bezerros geralmente são filhos de vacas que não receberam quantidades suficientes de selênio e Vitamina E durante a gestação. Morrem rapidamente em virtude de colapso respiratório e cardíaco. Na miodistrofia enzoótica típica que acomete principalmente bezerros com idades entre um e quatro meses, os sinais clínicos variam de acordo com os músculos afetados. Os animais apresentam andar rígido, dorso arqueado, tremores musculares, permanecem muito tempo em decúbito, têm dificuldade respiratória, insuficiência cardíaca e dificuldade para deglutir.

Além desses sinais pode ser observado também depressão, dispneia, corrimento nasal espumoso sanguinolento, os bezerros tendem a ficar em decúbito lateral, mesmo quando estimulados (RADOSTITS et al., 2002; BARROS, 2007). Segundo Tokarnia et al. (2010) a doença é mais comum em animais de 3 a 6 meses de idade, mas pode acometer bovinos jovens e adultos.

Barros et al. (1988), diagnosticaram a miopatia nutricional em um rebanho de 140 bezerros com aproximadamente um ano de idade. Nesse surto morreram 40 animais e a doença teve evolução de um a três dias; andar rígido foi o sinal mais característico.

Alterações reprodutivas como retenção de placenta, ciclos estrais irregulares, ovários císticos, morte embrionária, retenção de placenta, abortos, natimortos, também têm sido atribuídos à deficiência de selênio (TOKARNIA et al., 2010). Radostits et al. (2002) também relatam casos de retenção de placenta em bovinos com deficiência de selênio. Luci et al. (1985) realizaram um estudo em 120 vacas de quatro propriedades do estado de São Paulo, para avaliar o efeito da administração de selênio sobre a retenção de placenta e concluíram que a administração de selenito de sódio diminuiu a incidência em duas das quatro propriedades.

2.3 DIAGNÓSTICO DAS DEFICIÊNCIAS MINERAIS

Para o diagnóstico das deficiências minerais é necessário avaliar o conjunto de informações que se podem obter através do quadro clínico patológico, dosagens químicas nos tecidos e fluídos corpóreos, no solo, nas plantas e por meio do método da experimentação. Segundo Tokarnia et al. (2010) a experimentação é o meio mais útil e seguro para o diagnóstico das deficiências, sobretudo em animais com sub-deficiências, nos quais o quadro clínico-patológico não é característico.

2.3.1 Fósforo

2.3.1.1. Níveis de fósforo no soro sanguíneo e no osso de bovinos e búfalos

Nas deficiências leves de fósforo, os níveis séricos podem estar entre 4 e 7 mg/dl (RIET- CORREA & TIMM, 2007). Segundo Verma e Paul Gupta (1984) a deficiência de fósforo em búfalos só ocorre quando os valores séricos de fósforo estiverem abaixo de 3,8 mg/dl. Mas para Riet-Correa & Timm (2007) bovinos com deficiência severa podem apresentar valores séricos de fósforo de 1 mg/dl ou abaixo disso e que a dosagem de fósforo do tecido ósseo é o método mais importante para se determinar o *status* desse mineral.

Sharma et al. (2002) pesquisaram a ocorrência da deficiência de macrominerais em oito distritos da região Norte da Índia, e constataram que a deficiência de fósforo é a mais

comum, tanto no solo, quanto nas plantas e nos búfalos. Em experimentos de suplementação mineral com diferentes concentrações de fósforo verificaram que os búfalos que ingeriram 40g diárias, durante 75 dias, de uma mistura mineral com 31,25% de fosfato bicálcio aumentaram a concentração de fósforo sérico de $4,29\pm 0,42$ mg/dl para $5,46\pm 0,44$ mg/dl e o peso corpóreo de $469,35\pm 10,22$ kg para $478,39\pm 8,43$ kg. Esses resultados foram bem superiores ao dos animais que receberam mistura mineral com concentrações de fosfato bicálcio de 27,5% e 25%. Nesse mesmo estudo os autores verificaram que 20,18% dos solos, 15,99% das forragens e 24,26% dos búfalos eram deficientes em fósforo.

Jayachandran et. al. (2013), com objetivo de determinar as concentrações de fósforo sérico em búfalas em anestro pós-parto, encontraram valores médios de $4,22\pm 0,13$ mg/dl e de $6,15\pm 0,17$ mg/dl para animais cíclicos que estavam nas mesmas condições de alimentação e manejo. Para esses autores o envolvimento na síntese dos fosfolipídios e do AMPc pode ser o fator chave para o efeito negativo da deficiência de fósforo sobre a performance reprodutiva das búfalas. Segundo Hurley e Doane (1989) a correlação entre os hormônios reprodutivos e o fósforo inorgânico existe e uma deficiência marginal de fósforo pode causar anestro.

Oliveira et al. (2009), avaliaram os níveis de fósforo em 185 bubalinos, fêmeas, com idades entre dois e três anos, de rebanhos criados em pastagens nativas e sem suplementação mineral, pertencentes a propriedades localizadas nos municípios de Soure e Chaves na Ilha de Marajó, e obtiveram valores médios de $5,51\pm 1,03$ mg/dl de fósforo nas amostras estudadas, sendo que 5,95% dos animais apresentaram níveis séricos de fósforo abaixo de 4 mg/dl, o que pode ser considerado valores críticos desse mineral no soro. Pinheiro et al. (2011) também encontraram valores médios de P de $6,26\text{mg/dl}\pm 1,81$ no soro de 104 búfalas da Ilha de Marajó, destas 11,54% apresentaram valores deficientes, 48,08% eram sub-deficientes e 40,38% apresentavam valores adequados.

Mahmood et al. (2013), estudaram os fatores de risco para o aparecimento da hemoglobinúria da parturiente em búfalas, e verificaram que os animais com a enfermidade possuíam valores de fósforo sérico em torno de $2,67\pm 0,79$ mg/kg.

O diagnóstico da deficiência de fósforo a partir das análises de osso se baseia na determinação do percentual de cinzas, na densidade específica e no percentual de fósforo nas cinzas (LITTLE, 1972; VALDES; McDOWELL e KOGER, 1988; WU et al., 2001; RIET-CORREA & TIMM, 2007; TOKARNIA et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011).

Segundo Little (1972) e Valdes et al. (1988), o percentual de cinzas e a densidade óssea específica no tecido ósseo normal de bovinos devem está acima de 66,8% e 1,69 g/ml,

respectivamente. Por outro lado, o percentual de fósforo nas cinzas, em bovinos bem mineralizados, deve está entre 17 e 18,5% (RIET-CORREA & TIMM, 2007).

Wu et al. (2001), realizaram um estudo, nos Estados Unidos, em vacas bovinas lactantes e com produção acima de 11.900 kg de leite, com o objetivo de avaliar o efeito, ao longo de 2 ou 3 anos, de alimentação com três concentrações de fósforo (77,5; 97,5 e 115,62g de fósforo/animal/dia) sobre a densidade óssea específica, o fósforo no soro e o percentual de fósforo nas cinzas e no peso seco do osso. Os valores desses parâmetros nas vacas que ingeriram concentrações diferentes de fósforo foram para a densidade óssea específica de 1,50, 1,57, 1,55 g/ml; para a o fósforo no soro de 5,7, 6,1 e 6,5 mg/dl; para o percentual de P no osso de 17,7, 17,3, 17,9% e de 9,5, 9,7 e 9,9 % para o peso seco do osso. No final do experimento os autores concluíram que 77,5g de fósforo/animal/dia, seria o valor mínimo para vacas com produção de leite acima de 11.900 kg por lactação. Esses autores verificaram também que as vacas que ingeriram 97,5 e 115,62g de fósforo por dia apresentaram ganho de peso de 345 e 320g/dia, enquanto que os animais que ingeriram 77,5g de fósforo/dia tiveram um ganho de peso médio de apenas 277g.

2.3.2 Cobre

2.3.2.1 Níveis de cobre no fígado de bovinos e bubalinos

Apesar das muitas manifestações que ocorrem na deficiência de cobre, em geral o diagnóstico a campo não é tão fácil, mesmo quando a deficiência é acentuada, pois parte dessas manifestações não é específica. A confirmação dessa deficiência, simples ou condicionada, precisa ser realizada através de análises químicas de amostras de fígado, ou melhor ainda, pela experimentação. Os resultados dos valores de cobre obtidos pela análise de amostras de fígado são de fácil interpretação. Valores de 0 a 50 ppm da matéria seca indicam deficiência e de 51-100ppm, subdeficiência; níveis acima de 100ppm são considerados adequados (UNDERWOOD, 1977; TOKARNIA et al., 2010).

Para Sharma et al. (2005) os níveis de cobre no fígado são um indicador satisfatório para determinar o *status* desse mineral nos animais, mas há limitações relacionadas à retirada e processamento das amostras e análise laboratorial.

Cardoso (1997) avaliaram fígados de bovinos e bubalinos da Ilha de Marajó, Estado do Pará, no período seco e chuvoso, e encontraram, em ambas as espécies, valores de cobre deficientes, sobretudo no período chuvoso, com média de 5,7 ppm.

Pereira e Cardoso (2009) encontraram valores médios de cobre hepático de 19,51 ppm, em bubalinos jovens e adultos. Ficou comprovado nesse estudo, baixas reservas de Cu no fígado de bubalinos criados na Ilha de Marajó.

Pinheiro et al. (2011) avaliaram os níveis de cobre hepático em 104 búfalas abatidas em matadouros da Ilha de Marajó, estado do Pará, e encontraram valores médios de $5,57 \pm 7,60$ ppm. É importante salientar que em 24 (23,07%) amostras não foi possível detectar, pela metodologia utilizada, a presença de cobre no fígado dos animais, mas como o limite mínimo de detecção de cobre do aparelho era de 0,002 ppm, os autores consideraram todos os animais avaliados deficientes em cobre.

Para tentar elucidar a etiologia de um surto de morte súbita em bovinos em uma propriedade no Rio Grande do Sul, Brasil, Marques et al. (2003) avaliaram amostras de fígado e pastagem e encontraram níveis de cobre de $3,6 \pm 1,6$ e $8,4 \pm 0,8$ ppm respectivamente. No mesmo estudo os autores determinaram níveis de ferro nas pastagens e encontraram valores de $522 \pm 122,2$ ppm e responsabilizaram a deficiência de cobre como causadora das mortes. Os autores também responsabilizaram o excesso de ferro nas pastagens e na água como causador da deficiência de cobre nos animais, em virtude do efeito antagonístico do ferro sobre a absorção do cobre por meio do intestino.

Sharma et al. (2008), realizaram um experimento para verificar o efeito da suplementação com sulfato de cobre, via mistura mineral, sobre o ganho de peso e os níveis de cobre no fígado de 50 novilhas búfalas do Norte da Índia. No estudo os animais foram divididos em dois grupos com 25 em cada. No grupo A as novilhas receberam uma mistura mineral com 0,16% de sulfato de cobre e no Grupo B os animais não receberam cobre via mistura mineral. No início do experimento os níveis médios de cobre no fígado e o peso corporal médio eram semelhantes nos dois grupos. No grupo A os níveis de cobre no fígado foram de $179,72 \pm 6,23$ ppm e o peso corporal foi de $172,52 \text{ kg} \pm 18,73$ e no grupo B os níveis de cobre no fígado foram de $171,53 \pm 5,56$ ppm e o peso corporal foi de $170,77 \text{ kg} \pm 16,21$. Após 120 dias de suplementação o cobre hepático médio e o peso corporal médio aumentaram para $292,5 \pm 5,21$ ppm e $242,13 \text{ kg} \pm 17,56$ no grupo A (suplementado), enquanto que no grupo B (que não recebeu cobre suplementar) foram de $38,42 \pm 3,24$ ppm e $209,32 \text{ kg} \pm 21,7$, respectivamente.

2.3.3 Cobalto

Para o diagnóstico da deficiência de cobalto, deve-se levar em consideração a presença de animais magros, apesar de pastagem abundante e viçosa e a alotriofagia, especialmente a predileção por casca de árvores e madeira. Também se pode usar a suplementação com cobalto e/ou vitamina B₁₂ para confirmar a suspeita clínica. Conjuntamente com essas informações podem-se fazer análises de cobalto no fígado. Em bovinos, com idade de nove meses ou mais, valores abaixo de 0,05ppm indicam deficiência, de 0,05-0,12ppm subdeficiência e acima de 0,12ppm de cobalto, um índice adequado neste elemento (TOKARNIA et al., 2010).

Para Judson et al. (1997), a injeção subcutânea de vitamina B₁₂ e a colocação, intraruminal, de pastilhas com 90% de óxido de cobalto são métodos comuns para prevenção e correção da deficiência de cobalto em bovinos e ovinos na Austrália.

2.3.3.1 Níveis de cobalto e Vitamina B₁₂ no fígado de bovinos e bubalinos

Em estudo realizado por Pinheiro et al. (2011) em 104 búfalas em matadouros da Ilha de Marajó, estado do Pará, foi verificado que 48,08% dos animais apresentavam níveis de cobalto hepático médio de 0,36ppm±0,33ppm, considerado normal em relação aos valores para bovinos, entretanto, 51,92% dos animais apresentaram valores abaixo de 0,003 ppm e foram considerados deficientes.

Stangl et al. (2000) verificaram em experimento com bovinos de corte na Alemanha que o grupo de animais que receberam 0,83mg de Co/kg da MS, a concentração de vitamina B₁₂ no fígado foi de 434 nmol/kg e nos bovinos que receberam 0,2 mg de Co/kg de MS o nível de Vitamina B₁₂ foi de 259 nmol/kg. Os autores concluíram que as recomendações de cobalto na alimentação de bovinos de 0,1 mg/kg de MS, estão abaixo dos requerimentos destes animais.

Outro estudo para determinar os valores de cobalto no fígado de bovinos de diversas regiões Brasileiras foi realizado por Moraes et al. (1999) que avaliaram 181 amostras de fígado de animais com diversas enfermidades, inclusive deficiência mineral, e encontraram 59 animais com valores médios de cobalto de 0,072ppm na MS.

2.3.4 Zinco

2.3.4.1 Níveis de zinco no fígado de bovinos e bubalinos

Griffiths et al. (2007) estudaram o efeito da suplementação, na forma orgânica, de cobre, cobalto e zinco, sobre a produção de leite, a performance reprodutiva e a dureza dos cascos em vacas submetidas a pastejo intensivo, e verificaram que as vacas do grupo suplementado aumentaram a produção de leite e melhoraram a taxa de concepção em relação ao grupo controle, entretanto não houve efeito sobre a dureza do casco. Nesse mesmo estudo os autores verificaram que houve um aumento na concentração hepática de zinco de 36 para 52 ppm na matéria fresca, para os grupos controle e suplementado respectivamente.

Moraes et al. (1999) avaliaram 167 fígados de bovinos em um estudo retrospectivo e encontraram 22 animais com valores médios de zinco de 87,45 ppm. Esses valores estão abaixo dos valores considerados normais para bovinos que são entre 101 e 200ppm (UNDERWOOD, 1977). Em estudo realizado por Pinheiro et al. (2011) em 104 búfalas em matadouros da Ilha de Marajó, estado do Pará, encontraram valores médios de zinco de 27,05ppm \pm 13,12 e consideraram todos os animais deficientes em zinco. Esses valores foram inferiores aos encontrados por Cardoso (1997) encontrou valores médios de 127ppm, também em búfalos da Ilha de Marajó.

2.3.5 Selênio

Segundo Radostits et al. (2002) as concentrações normais de selênio no fígado de bovinos são de 0,08 a 0,3 ppm de MS, e valores entre 0,002 a 0,025 ppm são deficientes, entretanto, Dirksen et al. (2005) estabelece que os valores de selênio em fígado de bovinos sem deficiência deste elemento estão acima de 1 mg/kg de MS.

Moraes et al. (1999) determinaram as concentrações de Se no fígado de 107 bovinos que morreram de diversas enfermidades e encontraram 12 animais com valores de selênio abaixo do normal (0,069 ppm na MS). Nos demais animais os valores médios de Se foram de 0,62ppm na MS. Em uma búfala do Município de Manaus intoxicada por *Brachiaria humidicola* foram encontrados valores de 0,4 ppm.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FÓSFORO SÉRICO E ÓSSEO EM BÚFALAS ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO DE MISTURA MINERAL SELETIVA

Resumo: Objetivou-se avaliar as concentrações de fósforo no soro e no osso, o percentual de cinzas e a densidade óssea específica em búfalas da Ilha de Marajó antes e após suplementação mineral seletiva. Foram utilizadas 14 búfalas mestiças de Murrah com Mediterrânea, com idades entre 18 e 36 meses. Os valores médios de fósforo, antes da suplementação, no soro, no osso, o percentual de cinzas e a densidade óssea específica foram de $5,68\text{mg/dl} \pm 1,18$, $16,53\% \pm 0,53$, $59,95\% \pm 1,96$ e $1,52\text{g/cm}^3 \pm 0,32$, respectivamente, o que demonstra deficiência de fósforo nos animais criados na Ilha de Marajó. Após a suplementação com fósforo por um período de sete meses os valores foram de $6,61\text{mg/dl} \pm 0,87$, $16,90\% \pm 0,56$ e $60,30\% \pm 0,95$ e $1,71\text{g/cm}^3 \pm 0,21$ respectivamente. Esses resultados caracterizam um aumento significativo nas concentrações de P no soro sanguíneo, na densidade óssea específica e no percentual de fósforo nas cinzas ($P < 0,05$), porém não houve um aumento significativo no percentual de cinzas. O aumento médio nos valores de fósforo no osso e nas cinzas não alcançou patamares de normalidade em todos os animais, entretanto 28,6% dos animais tinham valores normais de P no soro e 50% nas cinzas, 64,3% tinham valores normais da densidade óssea específica. Não houve resposta à suplementação em relação ao percentual de cinzas. O não restabelecimento, em parte dos animais, dos parâmetros ósseo e sanguíneo após suplementação com fósforo durante sete meses pode ter ocorrido em virtude da baixa ingestão da mistura mineral e pela baixa concentração de P na *Brachiaria brizantha* cv Marandu utilizada para alimentação dos animais durante o experimento.

Palavras-chave: Níveis de fósforo, osso, soro, búfalos, Ilha de Marajó

EVALUATION OF PHOSPHORUS IN BONES AND SERUM LEVELS IN BUFFALOES BEFORE AND AFTER SUPPLEMENTATION WITH SELECTIVE MINERAL MIXTURE

Abstract: This study aimed to evaluate phosphorus concentrations in serum and bone, the percentage of ashes and the specific bone density in buffaloes in Marajó Island before and after mineral supplementation. For this study, 14 crossbred buffaloes of Murrah and Mediterranean aged between 18 and 36 months were used. The average values of phosphorous before supplementation, in serum, bone, the percentage of bone ashes and the specific bone density was $5.68 \text{ mg / dl} \pm 1.18$, $16.53 \pm 0.53\%$, $59.95\% \pm 1.96$ and $1.52 \pm 0.32 \text{ g/cm}^3$, respectively, which demonstrates phosphorus deficiency in animals raised on Marajó Island. After supplementation with phosphorous for a period of seven months, the values were of $6.61 \text{ mg/dl} \pm 0.87$, $16.90\% \pm 0.56$ and $60.30\% \pm 0.95$ and $1.71 \text{ g/cm}^3 \pm 0.21$ respectively. These results showed a significant increase in P concentrations in blood serum, in the specific bone density and at the percentage of phosphorus in ashes ($P < 0.05$), but there wasn't a significant increase in the percentage of ashes. The average increase of phosphorus in the bones and ashes did not reach normal levels in all animals, however 28.6% of the animals had normal values of P in serum and 50% in the ashes, 64.3% had normal values of specific bone density. There was no response to supplementation regarding to the percentage of ashes. The non-re-establishment, in part of the animals, of the parameters of phosphorus blood and bone after supplementation during seven months may have occurred as a result of the low intake of the mineral mixture and by low concentration of P in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu used for feeding animals during the experiment.

Keywords: phosphorus levels, blood, serum, Buffalo, Marajó Island

1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) desempenha diversas funções, no organismo animal, que estão relacionadas à transferência de energia, composição dos ossos, dentes, membranas celulares e ácidos nucleicos. Também é considerado fator de crescimento da microbiota ruminal, participa no controle do pH ruminal e do equilíbrio ácido-básico (BREVES e SCHRODER, 1991; UNDERWOOD e SUTLE, 1999; SATTER et al. 2005).

No Brasil, a deficiência de fósforo acomete bovinos e bubalinos nas diferentes regiões, e não há dúvida que essa deficiência é o distúrbio mineral mais comum e economicamente mais importante (TOKARNIA et al., 2010). A ocorrência dessa deficiência é muito comum na Ilha de Marajó (CARDOSO, 1997; BARBOSA et al., 2005; PEREIRA & CARDOSO, 2009; OLIVEIRA et al., 2009; PINHEIRO et al., 2011), que é caracterizada por apresentar solos de baixa fertilidade (FALESI, 1972 e KENDALL et al., 1974) e pastagens de baixo valor nutricional (TEIXEIRA NETO et al., 1991).

Mesmo com essas características adversas, a Ilha de Marajó possui um rebanho de aproximadamente 670 mil bovídeos, sendo que desse total, aproximadamente 307 mil são bubalinos (IBGE, 2010). No geral esses animais são criados em um sistema que se caracteriza por desinformação técnica por parte do produtor, baixa difusão de tecnologias, baixos índices zootécnicos e altas taxas de doenças infecto-contagiosas (ARIMAE, 1996). Segundo Barbosa et al. (2005) dentre as enfermidades que acometem búfalos e bovinos no estado do Pará, as deficiências minerais se destacam por causarem perdas severas na produtividade, sendo um fator limitante para a criação desses animais na região, caso não haja uma suplementação mineral adequada. Diante do exposto este trabalho teve o objetivo de determinar os níveis de fósforo no soro sanguíneo e no osso, bem como o percentual de cinzas e densidade óssea específica no osso de búfalos provenientes da Ilha de Marajó antes e após suplementação mineral seletiva.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e local do experimento

O experimento foi conduzido entre junho de 2011 e janeiro de 2012, em uma propriedade localizada na região nordeste do Estado do Pará. Foram usadas 14 búfalas,

mestiças de Murrah com Mediterrâneo, com idades entre 18 e 36 meses, oriundas de duas propriedades localizadas na Ilha de Marajó, Estado do Pará, onde eram criadas em sistema extensivo, em pastagens nativas e sem o fornecimento de mistura mineral.

Durante todo período experimental os animais foram mantidos em pastagens de *Brachiaria brizantha*, com adubação de 100 kg/hectare/ano de superfosfato triplo e 100 kg/hectare/ano de uréia; receberam a suplementação mineral e água à vontade. O experimento teve a duração de 210 dias.

2.2 Controle de peso dos animais

Para controle do ganho de peso os animais foram pesados no início e no final do período experimental. As pesagens foram realizadas sempre no período da manhã sem jejum dos animais.

2.3 Determinação da produção fecal e consumo de matéria seca

Para estimar o consumo de fósforo por meio da pastagem foram utilizados marcadores externos (LIPE[®] - Lignina purificada e enriquecida) SALIBA, (2005) e internos (FDNi- fibra detergente neutro indigerível). A produção fecal dos animais foi estimada através do LIPE[®] nas fezes. Cápsulas de 500mg contendo LIPE[®] foram administradas, por via oral, aos animais em três períodos, durante cinco dias em cada período, sendo dois dias de adaptação e três de coletas de fezes.

Os períodos de administração foram de 11/11 a 15/11; 12/12 a 17/12 de 2011 e 10/01 a 14/01 de 2012. As fezes foram coletadas da ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas. As três amostras de fezes de cada animal, obtidas no final de cada período de coleta, foram misturadas e homogeneizadas para formar uma amostra composta, formando no final do experimento três amostras compostas por animal. Essas fezes foram utilizadas para estimar a produção fecal (PF) em Kg de MS/dia e a FDNi.

Concomitante com a coleta de fezes foi realizada coleta de pastagem por meio do pastejo simulado para determinar a FDNi da pastagem. As amostras foram coletadas no mesmo dia da primeira coleta de fezes de cada período experimental. Após a coleta as amostras da pastagem foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas até a análise.

Posteriormente as amostras de fezes e pastagem foram descongeladas, pesadas e colocadas em estufa com ventilação forçada regulada à temperatura de 55°C por 72 horas e foram moídas em moinhos do tipo Willey com peneira de 1mm. Em seguida o LIPE[®] das amostras de fezes foi analisado no Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em espectrofotômetro com detector de luz no espectro do infravermelho (FTIV), modelo Varian 099-2243. A produção fecal foi calculada pela razão logarítmica das bandas espectrais entre os comprimentos de onda 1.050nm e 1.650nm (SALIBA et. al., 2003). Para cálculos de produção fecal utilizou-se a fórmula segundo Saliba (2005).

A quantificação de FDN_i, das fezes e da pastagem, foi obtida após incubação no rúmen de búfalos fistulados, onde 0,8g foram colocados em sacos de TNT, com dimensões de 4x4 cm. Em seguida foram colocadas em redes plásticas e incubadas por 288 horas. Após a incubação ruminal, os sacos foram lavados em água corrente e submetidos à fervura por 1 hora em solução de detergente neutro (VAN SOEST & ROBERTSON, 1985), posteriormente lavados com água quente e acetona, em seguida o resíduo considerado FDN_i.

O consumo de matéria seca (CMS) com base na FDN_i foi estimado utilizando-se a equação $CMS = PF \times (CIF\% / CIP\%)$, onde PF é a produção fecal, CIF é a concentração do indicador nas fezes e CIP é a concentração do indicador na pastagem.

2.4 Determinação de fósforo na pastagem

Para determinação de fósforo foram utilizadas parte das amostras de pastagens coletadas para determinar a FDN_i. O fósforo foi determinado segundo metodologia desenvolvida por Carmo et al. (2000) para análise foliar via seca. Para a leitura do fósforo foi usado espectrometria com amarelo de vanadato (MALAVOLTA et al. 1989)

2.5 Suplementação mineral

Os animais foram suplementados durante os 210 dias com uma mistura mineral contendo a seguinte composição por quilograma: sódio (196,5g); fósforo (97,5g); cobre (875mg); cobalto (126mg); Selênio (36mg); zinco (1010mg) (adaptado de TOKARNIA et al., 2010). As fontes de minerais utilizadas foram o cloreto de sódio, o fosfato bicálcio, o sulfato de cobre, o selenito de sódio e o sulfato de zinco. O controle do consumo médio de minerais

foi realizado medindo-se a quantidade de mistura mineral ofertada e as sobras no cocho no final do período experimental. A mistura mineral foi oferecida aos animais em cocho coberto com proteções laterais contra as chuvas.

2.6 Coleta de sangue e dosagem de fósforo no soro sanguíneo

As amostras de sangue foram coletadas na chegada dos animais da Ilha de Marajó e no final do período experimental. A coleta foi realizada utilizando-se tubos estéreis de 5 ml, a vácuo. Em seguida as amostras foram centrifugadas (3.000 rpm por 5 minutos) e logo após o soro foi separado e armazenado em frascos de polietileno (*eppendorf*), e congelados a -20°C até a análise.

As análises dos teores de fósforo inorgânico no soro sanguíneo foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará, utilizando-se kits comerciais (Cepa®) e as leituras obtidas em analisador bioquímico semi-automatizado (BIOPLUS – BIO 2000, SP - BR).

2.7 Coleta de tecido ósseo e dosagem de fósforo no osso

As amostras de osso foram coletadas por meio de biópsias realizadas no terço superior da 12^a costela do lado direito, utilizando uma furadeira automatizada de impacto modelo GSR 14,4 VE-2 profissional, acoplada a uma serra copo modelo Starret 25 mm com guia suporte A01 – Mandril 3/8. Para a realização das biópsias, os animais foram inicialmente sedados com cloridrato de xilazina a 2% na dose de 1 mL para cada 100 kg de peso vivo por via intramuscular e contidos fisicamente utilizando cordas, mantendo-os em decúbito lateral esquerdo.

Na região do terço superior direito da 12^a costela foi realizada a tricotomia e a lavagem com água e sabão neutro. Em seguida foi realizada a anestesia local do tipo infiltrativa intramuscular e subcutânea utilizando 40 mL de cloridrato de lidocaína a 2%. Posteriormente, realizou-se uma segunda lavagem com água e sabão neutro da área tricotomizada e a devida assepsia utilizando álcool iodado a 10%.

Foi realizada uma incisão na pele sobre a 12^a costela de aproximadamente 10 cm de comprimento e o debridamento do tecido subcutâneo para exposição da costela. Em seguida

foi retirado dois fragmentos de tecido ósseo da região cranial da costela. Os fragmentos foram colocados em sacos plásticos e congelados a -20°C até a realização das análises.

Após a retirada dos fragmentos de osso, foi realizada a sutura do peritônio com *catgut* simples nº 0. Em seguida foi feita sutura do tecido subcutâneo com padrão contínuo simples utilizando fio de nylon nº 0,50 mm. E por fim foi realizada a aproximação da pele com fio de nylon nº 0,80 mm com um padrão de sutura tipo Wolf. Os animais foram tratados com dose única de oxitetraciclina e flunixin meglumine. O tratamento da ferida operatória foi realizado diariamente utilizando unguento tópico até a cicatrização. Esse processo foi repetido no final do período experimental.

Após descongelamento à temperatura ambiente foi removido todo tecido mole e material medular do osso. Em seguida as amostras foram pesadas em balança analítica para a obtenção do peso fresco e colocadas em uma proveta com 10 mL de água para determinar o volume de água deslocada. Após esse procedimento, as amostras foram secas em estufa a 105°C durante 12 horas e desengorduradas com éter etílico no extrator Goldfish durante 48 horas. Após secas e livres de gordura, as amostras foram pesadas, calcinadas em mufla a 600°C durante 12 horas e trituradas em gral e pistilo para a obtenção das cinzas (adaptado de FICK et al., 1980).

Para a determinação do fósforo no osso, as cinzas das amostras foram pesadas entre 0,25 a 0,26g e solubilizadas, em tubo de digestão de teflon (modelo Xpress), pela digestão com 3mL de ácido nítrico P.A. 65 %, 1 mL de ácido clorídrico a 30 % e 1 mL de peróxido de hidrogênio P.A. 30 %, e após foram diluídas com água deionizada, para formar soluções para análise de fósforo (adaptado das técnicas de Nomura et al. 2005).

A análise foi realizada no laboratório de análises químicas do setor de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas, utilizando cromatografia de íons, em sistema ICS 2000 DUAL (THERMO SCINTIFIC-DIONEX, USA).

2.8 Determinação da densidade específica e do percentual de cinzas no osso

O cálculo da densidade óssea foi efetuado considerando-se a fórmula $d = m/v$, expresso em g/cm^3 , segundo a descrição de Fick et al. (1980). O percentual de cinzas no osso foi determinado de acordo com as recomendações de Mendes (1977). Todos os resultados foram expressos em percentagem, tendo como base a matéria seca livre de gordura.

2.9 Análise estatística

Todos os parâmetros foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e classificados em Gaussianos. As médias e os desvios padrões foram determinados de forma descritiva. As extensões de referência obedeceram dois desvios padrões para mais e para menos em relação à média. Os parâmetros foram submetidos ao Teste *t*. O nível de significância considerado foi de 0,05. Todas as análises foram realizadas no programa computacional BioEstat 5.0 (AYRES et al. 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios da fibra detergente neutro indigerível (FDNi) nas fezes e na pastagem, da produção fecal e do consumo de matéria seca na pastagem, juntamente com os valores médios dos pesos iniciais, finais e médios, do percentual de consumo de matéria seca em relação ao peso vivo médio e do ganho médio diário de peso estão descritos na Tabela 1.

O valor médio da FDNi, das fezes foi de $24,75\% \pm 2,29$; da *Brachiaria brizantha* foi de $15,95\% \pm 0,82$ e da produção fecal foi de $3,19\text{kg} \pm 0,04$. A FDNi das fezes ficou abaixo dos valores de 36% encontrados por Soares et al. (2009) em búfalos alimentados com *Pennisetum purpureum* Shumacher. O percentual de FDNi da *Brachiaria brizantha* está de acordo com os encontrados por Pereira et al. (2012), que verificaram valores que variaram de 12,9 a 17,2%. Já os valores da produção fecal são superiores aos encontrados por Soares et al. (2009) em búfalos com peso médio de 300 kg e alimentados com capim Cameron (*Pennisetum purpureum* Shumacher), que verificaram uma produção fecal média de 2,1 kg de matéria seca utilizando como marcador externo o LIPE[®]. A produção maior de fezes neste experimento possivelmente ocorreu em virtude do maior peso médio dos animais, que foi de 391,4kg (Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios de FDNi nas fezes, nas pastagens e da produção Fecal (PF) das búfalas durante o período experimental.

Parâmetros	Média e desvio Padrão
FDNi das fezes	24,75±2,29
FDNi das pastagens	15,95±0,82
PF (kg de MS)	3,19±0,04

FDNi: fibra detergente neutro indigestível.

Os valores individuais do peso inicial, final e médio, assim como o consumo de matéria seca e o consumo de matéria seca em relação ao percentual de peso vivo, o ganho de peso no período e o ganho de peso diário estão relacionados na Tabela 2.

O consumo médio de matéria seca de 4,95kg e o consumo médio de matéria seca dos animais em relação ao peso vivo de 1,47%, estão abaixo dos valores estipulados por Puniu e Singh (2001), que descrevem que os requerimentos de matéria seca para búfalos entre 300 e 400 kg e com ganho de peso médio de 500g por dia é de 5,1 a 9,7 kg, que correspondem entre 1,7 a 2,4% do peso vivo. A baixa ingestão de matéria seca pelos animais deste experimento pode ter ocorrido em virtude do manejo e do comportamento arreado dos animais apresentado durante todo o período experimental. Durante o manejo para colocação do marcador externo (LIPE) os animais eram colocados em tronco de contenção individual e contidos pela narina com uma “formiga” para facilitar a aplicação do marcador por via oral. Esse procedimento causou trauma nessa região durante cada período de aplicação do LIPE® e foi observado que os animais não enchiam plenamente o rúmen. Segundo Borges (2007) e Soares et al. (2009) a manipulação excessiva dos animais durante os processos de aplicação de marcadores externos de digestibilidade e produção fecal pode causar estresse e diminuir significativamente o consumo de matéria seca pelos animais. Outro fator foi o comportamento arreado dos animais, pois ao avaliarmos o percentual de consumo dos animais podemos verificar que nos animais 312, 313, 314 315 e 316 que tinham um comportamento mais dócil, o consumo de matéria seca em média de 1,81%±0,26 foi superior aos 1,28%±0,20 dos demais animais que tinham um comportamento menos dócil.

O ganho médio de peso entre os períodos antes da suplementação e após a suplementação foi de 81,60Kg±56,06, com um ganho médio diário de 388,40g±266,96. Ao comparar os valores de ganho de peso no período e o ganho de peso médio diário verificamos que os animais mais dóceis tiveram um ganho de peso médio de 716,2g±97,0 valores bem superiores às 210g±80 dos demais animais. Isso é explicado pelo maior consumo de matéria

seca desses animais. Os valores médios de ganho de peso observado nesse estudo foram inferiores aos obtidos por Cardoso et al. (2008) em dois experimentos com suplementação mineral em búfalos com idades entre oito e 10 meses, durante 14 meses. Nesses experimentos o ganho de peso médio variou de 550 e 580g por dia. O ganho maior de peso nesses experimentos pode ter ocorrido em virtude do maior crescimento desses animais, a maior taxa de crescimento, pois eram animais bem mais novos e estavam em pleno desenvolvimento corporal.

O percentual médio de P na pastagem ingerida pelos animais e o consumo médio da mistura mineral, o consumo de P por meio da pastagem e da mistura mineral, juntamente com o consumo médio total de P pelos animais estão dispostos na Tabela 3.

O percentual médio de 0,17% de P na pastagem verificado entre os três períodos de coleta de pastagem são bem inferiores aos 0,32% estabelecidos por Terramoccia et al. (2005) como valores mínimo de P na pastagem para atender os requerimentos diários de manutenção e ganho de peso de 500g por dia em búfalos com pesos entre 300 e 400 kg. Ao somar a ingestão de P por meio da pastagem e da mistura mineral verificamos um consumo médio de $12g \pm 0,57$.

Segundo Puniu e Singh (2001) os requerimentos diários de P para búfalos com pesos entre 150 e 500 kg e com ganho de peso diário de 500g são de 9 a 16g. Possivelmente a ingestão de fósforo por meio da pastagem está subestimada, uma vez que a ingestão de matéria seca está abaixo das necessidades diárias dos animais. Outro fator que contribuiu para uma menor ingestão de P foi o baixo consumo do suplemento mineral, que ficou em torno de 34,6g por dia, e que contribuiu com uma ingestão média de P de apenas 3,37g por dia. Tokarnia et al. (2010) relata que o consumo de 70g de uma mistura mineral contendo 9% de fósforo, seria suficiente para atender as necessidades desse mineral para animais em crescimento, considerando a ingestão de P por meio da forragem. Os valores de consumo estão muito abaixo dos encontrados por Cardoso et al. (2008) que relataram em búfalos a ingestão média de 77,14 de uma mistura mineral para búfalos e de 83,18g de uma mistura mineral convencional utilizada para bovinos. Possivelmente o maior consumo da mistura mineral nesses experimentos pode ter sido em virtude das menores concentrações de cloreto de sódio de 7 e 5% quando comparado com os 19,5% da mistura utilizada neste experimento.

Tabela 2. Peso inicial, final e médio, consumo de matéria seca em kg/dia e porcentual do peso vivo (% PV), ganho médio (GMD) e ganho de peso no período do experimental.

Búfalas	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Peso médio (kg)	CMS (kg)	CMS (%PV)	GPP (kg)	GMD (g)
312	200	365	282,5	5,07	1,79	165	785,7
313	227	370	298,5	5,43	1,82	143	681,0
314	153	305	229,0	4,30	1,88	152	723,8
315	158	330	244,0	5,23	2,14	172	819,0
316	285	405	345,0	4,86	1,41	120	571,4
317	400	455	427,5	4,19	0,98	55	261,9
318	385	400	392,5	5,15	1,31	15	71,4
319	385	445	415,0	5,07	1,22	60	285,7
320	405	435	420,0	5,13	1,22	30	142,9
321	325	380	352,5	4,05	1,15	55	261,9
322	305	350	327,5	5,47	1,67	45	214,3
323	370	435	402,5	4,73	1,18	65	309,5
324	400	425	412,5	4,99	1,21	25	119,0
325	340	380	360,0	5,63	1,56	40	190,5
Média	309,9	391,40	350,64	4,95	1,47	81,60	388,40
/DP	±91,40	±45,12	±66,40	±0,48	±0,34	±56,06	±266,96

Os autores atribuíram a diferença de consumo às concentrações de sódio de 7% na mistura mineral de menor consumo e de 5% na de maior consumo. Entretanto, as concentrações de sódio nas misturas estão muito abaixo das necessidades de búfalos que é de 4 a 6g para cada 100 kg de peso vivo (SEKERDEN, 2001).

Tabela 3. Percentual de fósforo na pastagem (%PP), consumo de fósforo individual por meio da pastagem (CPP) e da mistura mineral (CPMM), o consumo da mistura mineral (CMMM) e o consumo total individual de fósforo (CTP) em búfalas durante o período experimental.

Animal	%PP	CPP (g)	CMMM (g)	CPMM (g)	CTP (g)
312	0,17	8,68	34,6	3,37	12,05
313	0,17	9,14	34,6	3,37	12,52
314	0,17	7,25	34,6	3,37	10,62
315	0,17	8,92	34,6	3,37	12,30
316	0,17	8,20	34,6	3,37	11,57
317	0,17	8,81	34,6	3,37	12,19
318	0,17	8,65	34,6	3,37	12,02
319	0,17	8,66	34,6	3,37	12,03
320	0,17	8,75	34,6	3,37	12,12
321	0,17	8,24	34,6	3,37	11,61
322	0,17	9,33	34,6	3,37	12,70
323	0,17	8,09	34,6	3,37	11,46
324	0,17	8,57	34,6	3,37	11,94
325	0,17	9,48	34,6	3,37	12,85
Média/DP	0,17	8,63±0,57	34,6	3,37	12±0,57

Os valores de referência para a espécie bovina dos parâmetros ósseos e do soro sanguíneo e os valores médios obtidos das búfalas antes e após a suplementação mineral estão descritos na Tabela 4.

Os níveis médios de P no soro sanguíneo antes e após a suplementação aumentaram significativamente ($P < 5\%$) de 5,68mg/dl±1,18 para 6,61mg/dl±0,87. Mesmo com aumento significativo esses valores estão abaixo dos valores de referência para animais da espécie bovina com valores normais. Valores de 5,51mg/dl±1,03 (Oliveira et al. 2009) e de 6,26mg/dl±1,81 (Pinheiro et al. 2011), semelhantes ao deste estudo e considerados subdeficientes, foram descritos em búfalos da Ilha de Marajó. Valores de P de 2,67mg/dl ±0,79, bem inferiores aos deste estudo, foram encontrados por Mahmood et al. (2013) em búfalas com hemoglobinúria da parturiente. Jayachandran et al. (2013) descreveram valores médios de P de 4,22 mg/dl ±0,13, abaixo dos encontrados nesse estudo, em búfalas em anestro pós parto; naquelas que estavam ciclando valores de 6,15mg/dl ±0,17 foram semelhantes ao deste trabalho.

Resposta à suplementação mineral também foi verificada por Sharma et al. (2002) no norte da Índia onde os níveis de fósforo sérico aumentaram de 4,29mg/dl ±0,42 para 5,46mg/dl ±0,44 em búfalos após ingerirem 40g de uma mistura mineral contendo 31,25% de fosfato bicálcio durante 75 dias.

O percentual médio de fósforo nas cinzas aumentou significativamente ($P < 5\%$) de $16,53\% \pm 0,53$ para $16,90\% \pm 0,56$ após a suplementação mineral. Entretanto, quando comparados com os valores de referência para bovinos, verificamos que em média os animais permaneceram com as concentrações de P no osso abaixo dos valores normais. Concentrações de fósforo no osso abaixo dos valores de referência também foram descritas por Cardoso (1997), Pereira e Cardoso (2009) e Pinheiro et al. (2011) em diferentes estudos realizados em búfalos na Ilha de Marajó, que é uma região que com solos e pastagens sabidamente deficientes em fósforo.

Os valores da densidade específica aumentou de $1,52\text{g/cm}^3 \pm 0,32$ antes para $1,71\text{g/cm}^3 \pm 0,21$ após a suplementação mineral. Isso nos revela que em média os valores da densidade óssea alcançaram índices de normalidade quando comparados com os de referência (Tabela 4). Valores baixos de densidade óssea de $1,59\text{g/cm}^3 \pm 0,18$ também foram descritos por pinheiro et al. (2011) e de $1,46\text{g/cm}^3$ por Pereira e Cardoso (2009) em búfalos da Ilha de Marajó sem suplementação mineral.

O percentual médio de cinzas no osso antes e após a suplementação foi de $59,95\% \pm 1,96$ e $60,30\% \pm 0,95$, respectivamente. Ao comparar esses valores com os de referência, verificamos que a suplementação mineral não foi suficiente para aumentar as concentrações de cinzas no osso dos animais. Concentrações ósseas de cinzas de 60,24 e de 60,87%, semelhantes aos valores deste estudo, foram verificados por Pereira e Cardoso (2009) e pinheiro et al. (2011), em búfalos da ilha de Marajó sem suplementação mineral.

O percentual de animais deficientes, subdeficientes e com níveis normais dos parâmetros sanguíneo e ósseo, avaliados antes e após a suplementação mineral estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

Ao compararmos os valores de fósforo encontrados no soro antes da suplementação mineral, com os valores de referência verificamos que um animal (7,2%) apresentou valores de fósforo abaixo de 4 mg/dl ($3,8\text{mg/dl}$), o que indica deficiência, 10 (71,4%) apresentaram valores entre 4 e 7 mg/dl ($5,35 \pm 0,70$), o que caracteriza subdeficiência e três (21,4%) apresentaram valores normais, acima de 7 mg/dl ($7,40 \pm 0,38$). Após a suplementação, 10 animais (71,4%) ainda permaneceram com valores de fósforo entre 4 e 7 mg/dl ($6,19 \pm 0,56\text{mg/dl}$) e quatro (28,6%) apresentaram níveis normais de fósforo ($7,68 \pm 0,50\text{mg/dl}$) (tabela 6). Um percentual elevado de animais com subdeficiência em fósforo também foi descrito por Oliveira et al. (2009) e Pinheiro et al. (2011) em búfalos da Ilha de Marajó, onde 94,05% e 48,08% dos animais apresentaram valores entre 4 e 7 mg/dl, respectivamente.

Tabela 4. Valores de referência para a espécie bovina e os valores médios de fósforo no soro sanguíneo e nas cinzas, da densidade específica e do percentual de cinzas do osso de búfalas da Ilha de Marajó, antes e sete meses após o início da suplementação mineral.

Parâmetros	Referência			Antes da suplementação	Após suplementação
	Deficiência	Subdeficiência	Normais		
Fósforo no soro (mg/dl) ^{2**}	<4	4 - 7	>7	*5,68±1,18 ^b	6,61±0,87 ^a
Fósforo nas cinzas (%) ^{2**}	<17			16,53±0,53 ^b	16,90±0,56 ^a
Densidade óssea específica (g/cm ³) ^{1**}	<1,69		>1,69	1,52±0,32 ^b	1,71±0,21 ^a
Cinzas ³ (%)	<66,8		>66,8	59,95±1,96	60,30±0,95

¹Valdes et al. (1988), ²Riet-Correa e Timm (2007), Little (1972)³.

* Valores na mesma linha com letras diferentes são diferentes estatisticamente (P<5%).

** Valores de referências para bovinos descritos por estes autores

Avaliando as concentrações de fósforo no osso antes da suplementação mineral verificamos que 10 (71,4%) animais apresentaram valores médios de fósforo de 16,26%±0,34 e que quatro (28,6%) apresentaram valores de 17,2%±0,22, considerados normais quando comparados com os de bovinos. Achados semelhantes foram descritos por Pereira e Cardoso (2011) e por Pinheiro et al. (2011) que ao avaliarem as concentrações de fósforo no osso de búfalos da Ilha de Marajó verificaram que 81,8% e 57,3% respectivamente, apresentavam valores de fósforo no osso abaixo dos recomendados para bovinos. Cardoso (1997) relatou achado semelhante em búfalos na Ilha de Marajó.

Antes do experimento, verificou-se que 64,3% dos animais apresentaram valores da densidade óssea abaixo dos valores de referência utilizados, bem como 100% dos animais apresentaram o percentual das cinzas abaixo dos valores de referência utilizados. Após a suplementação 35,7% dos animais apresentava a densidade óssea abaixo dos valores de referência, porém o percentual de cinzas permaneceu abaixo dos valores de referência em 100% dos animais (Tabela 6). O percentual de animais com baixa densidade óssea antes da suplementação são semelhantes aos encontrados por Pinheiro et al. (2011), que verificaram que 70,79% das 104 búfalas da Ilha de Marajó que foram avaliadas apresentaram valores de

densidade óssea abaixo de $1,69\text{g/cm}^3$. Esses autores também verificaram que 100% dos animais avaliados apresentaram concentrações de cinzas no osso abaixo do valor utilizado como referência. Entretanto, os valores da densidade óssea de $1,84\pm 0,10$ apresentado por 64,3% dos animais após o experimento são superiores aos encontrados por Prabowo et al. (1991) que verificaram em búfalos na Indonésia valores de $1,75\text{g/cm}^3$.

Tabela 5. A quantidade e o percentual de animais deficientes, subdeficientes e os valores médios de fósforo no soro e no osso, a densidade específica e o percentual de cinzas no osso de búfalas não suplementadas.

Parâmetros	Deficientes			Subdeficientes			Níveis normais			Total
	Quant.	%	Média /DP	Quant	%	Média /DP	Quant	%	Média /DP	
Fósforo no soro (mg/dl) ^{3*}	1	7,2	3,80	10	71,4	5,35	3	21,4	7,40	14
					4	$\pm 0,70$			$\pm 0,38$	
Fósforo nas cinzas (%) ³	10	71,4	16,26				4	28,6	17,2	14
		0	$\pm 0,34$						$\pm 0,22$	
Densidade específica do osso (g/cm^3) ^{2*}	9	64,3	1,33				5	35,7	1,87	14
			$\pm 0,20$						$\pm 0,14$	
Cinzas (%) ^{1*}	14	100	59,95							14
			$\pm 1,96$							

¹Valdes et al. (1988), ²Riet-Correa e Timm (2007), Little (1972)³.

* os valores de referência foram os descritos por esses autores para bovinos.

Tabela 6. A quantidade e o percentual de animais deficientes, subdeficientes e os valores médios de fósforo no soro e no osso, a densidade específica e o percentual de cinzas no osso de búfalas sete meses após o início da suplementação mineral.

Parâmetros	Deficientes			Subdeficientes			Níveis normais			Total
	Quant	%	Média /DP	Quant	%	Média /DP	Quant	%	Média /DP	
Fósforo no soro (mg/dl) ^{3*}				10	71,4	6,19 ±0,56	4	28,6	7,68 ±0,51	14
Fósforo nas cinzas (%) ³	7	50	16,45 ±0,42				7	50	17,35 ±0,20	14
Densidade específica do osso (g/cm ³) ^{2*}	5	35,7	1,46 ±0,09				9	64,3	1,84 ±0,10	14
Cinzas (%) ^{1*}	14	100	60,3 ±0,95							14

¹Valdes et al. (1988), ² Riet-Correa e Timm (2007), Little (1972)³.

* os valores de referência foram os descritos por esses autores.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os parâmetros ósseos e sanguíneos avaliados podemos concluir que das 14 búfalas oriundas da Ilha de Marajó 100% tinham deficiência nas concentrações de cinzas e 64,3% na densidade óssea específica, e em relação aos níveis de fósforo no soro e no osso, 78,6% e 71,4% eram deficientes e subdeficientes, respectivamente. Após a suplementação mineral verificamos que em nenhum animal as concentrações de cinzas atingiram patamares de normalidade e que os valores de P sanguíneo (em 28,6% dos animais), de P no osso (em 50% dos animais) e da densidade óssea (em 64,3% dos animais) estavam dentro dos níveis normais.

A baixa recuperação dos parâmetros ósseos e sanguíneos após o período experimental pode ter ocorrido em virtude da baixa ingestão da mistura mineral ofertada aos animais e pela baixa concentração de fósforo na *Brachiaria brizantha* cv Marandu utilizada para alimentação dos animais.

CAPÍTULO 3

NÍVEIS DE COBRE, COBALTO, ZINCO, SELÊNIO E FERRO EM FÍGADOS DE BÚFALAS DA ILHA DE MARAJÓ, ANTES E APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM MISTURA MINERAL SELETIVA.

Resumo: Objetivou-se avaliar os níveis de cobre, cobalto, selênio, zinco e ferro no fígado de búfalas da Ilha de Marajó, antes e após suplementação mineral com esses elementos. Foram utilizadas 14 búfalas mestiças de Murrah com Mediterrânea com idades entre 18 e 36 meses. Os valores médios antes da suplementação foram de 7,75ppm±1,73 para o cobre, de 0,40ppm±0,17 para o cobalto, de 88,01ppm±35,03 para o zinco, de 0,22ppm±0,12 para o selênio e 1,395,72ppm±764,74 para o ferro; esses resultados demonstram deficiência de cobre, zinco e selênio, valores adequados de cobalto e excesso de ferro no fígado. Após a realização da suplementação por um período de sete meses, os valores obtidos foram de 205,41ppm±80,54 para o cobre, de 0,40ppm±0,22 para o cobalto, de 75,71ppm±11,74 para o zinco, de 1,30ppm±1,34 para o selênio e de 826,48ppm±394,76 para o ferro, o que evidencia um aumento significativo ($P<0,05$) das concentrações médias de cobre e selênio e uma diminuição significativa nos valores de ferro ($P<0,05$). Não houve uma recuperação dos valores de zinco e as concentrações de cobalto permaneceram dentro dos valores de normalidade. O não aumento das concentrações de zinco no fígado após a suplementação pode ter ocorrido em virtude das concentrações elevadas de cálcio na *Brachiaria brizantha* cv Marandu utilizada na alimentação dos animais.

Palavras-chave: microminerais, bubalinos, suplementação mineral, fígado

**LEVELS OF COPPER, COBALT, ZINC, SELENIUM AND IRON IN LIVERS OF
BUFFALOES FROM MARAJÓ ISLAND, BEFORE AND AFTER
SUPPLEMENTATION WITH SELECTIVE SUPPLEMENTATION MINERAL
MIXTURE.**

Abstract: This study aimed to evaluate levels of copper, cobalt, selenium, zinc and iron in the liver of buffaloes from Marajó Island before and after mineral supplementation with these elements. For this study, 14 crossbred buffaloes of Murrah and Mediterranean aged between 18 and 36 months were used. The average values before supplementation were 7,75ppm \pm 1.73 for copper, of 0, 40 ppm \pm 0.17 for cobalt, of 88, 01ppm \pm 35.03 for zinc, of 0, 22ppm \pm 0.12 for selenium and 1.395, 72ppm \pm 764.74 for iron. These results demonstrate a deficiency of copper, zinc and selenium, appropriate values for cobalt and excess iron in the liver. After the supplementation for a period of seven months, the values obtained were 205.41 \pm 80.54 ppm for copper, 0.40 \pm 0.22 ppm for cobalt, 75.71 \pm 11.74 ppm for zinc, 1.30 \pm 1.34 ppm for selenium and, 826.48 \pm 394.76 ppm for iron, which shows a significant increase ($P < 0.05$) of the average concentrations of copper and selenium and a significant decrease of iron values ($P < 0.05$). There was no recovery of zinc and cobalt concentrations which remained within the normal range. Failure to increased concentrations of zinc in the liver after supplementation may have occurred because of the high concentrations of calcium in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu used for animal nutrition.

Keywords: trace minerals, buffaloes, mineral supplementation, liver.

1 INTRODUÇÃO

Os microminerais desempenham diversas funções no organismo animal. Geralmente essas funções são realizadas por enzimas que para serem sintetizadas necessitam desses elementos em sua constituição. Segundo McDowell (1992), Sharma et al. (2005) e Riet-Correa, (2007), o cobre desempenha diversas funções biológicas no corpo do animal através de uma variedade de cuproenzimas. Entretanto essas enzimas só desenvolvem suas atividades quando os animais ingerem quantidades adequadas de cobre na alimentação, que segundo Riet-Correa (2007) é de 10ppm por quilograma de matéria seca para bovinos. Excesso de ferro na alimentação pode inibir a absorção de cobre através do intestino (SUTTLE e PETER, 1985).

As funções do cobalto, do zinco e do selênio no organismo animal também estão intrinsecamente relacionadas às atividades das metais enzimas correspondentes. A vitamina B₁₂ que é essencial para o metabolismo energético dos ruminantes, só é produzida pelas bactérias ruminais na presença de cobalto (KISIDAYOVÁ et al., 2001; DIRKSEN et al., 2005; STAUFENBIEL, 2005; TOKARNIA et al., 2010).

No que se refere ao metabolismo celular, o zinco é o elemento que participa no maior número de funções. Esse elemento está intimamente relacionado à atividade de diversas enzimas zinco-dependentes, como a enzima conversora de angiotensina, a fosfatase alcalina, a anidrase carbônica, a colagenase, as carboxipeptidases, a manosidase e a superóxido dismutase (UNDERWOOD, 1981). O Zn participa também na produção, armazenagem e secreção de alguns hormônios, tais como insulina, testosterona e cortisol, além de ativar os seus sítios receptores nas células-alvo (GONZÁLEZ, 2000). A absorção intestinal de Zn pode ser reduzida pelo excesso de Ca na alimentação (HADDAD e ALVES, 2006).

O selênio é essencial para o crescimento, reprodução, prevenção contra doenças e para manter a integridade dos tecidos. A função metabólica do selênio esta intimamente relacionada com a vitamina E. Ambos são necessários para que o organismo animal desempenhe adequada reposta imunológica frente aos diferentes agentes agressores. O selênio é um constituinte essencial da enzima glutation peroxidase, que tem a função de proteger a membrana celular contra danos causados por peróxidos intracelulares (DIRKSEN et al., 2005; MCDOWELL e ARTHINGTON, 2005), enquanto a vitamina E protege as membranas celulares dos radicais livres provenientes dos alimentos e do metabolismo intermediário (DIRKSEN et al., 2005).

No Brasil o diagnóstico das deficiências de cobre, cobalto e em menor proporção as de zinco e selênio já foram realizadas nas diversas regiões brasileiras principalmente em bovinos (TOKARNIA et al., 2010). Entretanto, poucos são os diagnósticos dessas deficiências em búfalos (CARDOSO, 1997; PEREIRA e CARDOSO, 2009; PINHEIRO et al., 2011). Por isso o objetivo desse trabalho foi descrever os níveis de cobre, cobalto, selênio e zinco no fígado de búfalos da Ilha de Marajó, antes e depois de suplementação mineral seletiva.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e local do experimento

O experimento foi conduzido entre junho de 2011 e janeiro de 2012, em uma propriedade localizada na região nordeste do estado do Pará. Foram usadas 14 búfalas, mestiças de Murrah com Mediterrânea, com idades entre 18 e 36 meses, oriundas de duas propriedades localizadas na Ilha de Marajó, estado do Pará, onde eram criadas em sistema extensivo, em pastagens nativas e sem o fornecimento de mistura mineral.

Durante todo período experimental foram mantidas em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, com adubação de 46kg de P₂O₅ e 46kg de nitrogênio por hectare/ano. Os animais receberam suplementação mineral e água à vontade durante os 210 dias do experimento.

2.2 Pesagem dos animais

Para controle do ganho de peso os animais foram pesados no início e no final do período experimental. As pesagens foram realizadas sempre no período da manhã.

2.3 Determinação da produção fecal e consumo de matéria seca

Para estimar o consumo de cobre, cobalto, zinco, selênio, ferro e cálcio por meio da pastagem foram utilizados marcadores externos (LIPE[®] - Lignina purificada e enriquecida) SALIBA, (2005) e internos (FDNi- fibra detergente neutro indigerível). A produção fecal dos animais foi estimada através do LIPE[®] nas fezes. Cápsulas de 500mg contendo LIPE[®] foram

administradas, por via oral, aos animais em três períodos, durante cinco dias em cada período, sendo dois dias de adaptação e três de coletas de fezes.

Os períodos de administração foram de 11/11 a 15/11; 12/12 a 17/12 de 2011 e 10/01 a 14/01 de 2012. As fezes foram coletadas da ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas. As três amostras de fezes de cada animal, obtidas no final de cada período de coleta, foram misturadas e homogeneizadas para formar uma amostra composta, formando no final do experimento três amostras compostas por animal. Essas fezes foram utilizadas para estimar a produção fecal (PF) em Kg de MS/dia e a FDN_i.

Concomitante com a coleta de fezes foi realizada coleta de pastagem por meio do pastejo simulado para determinar a FDN_i da pastagem. As amostras foram coletadas no mesmo dia da primeira coleta de fezes de cada período experimental. Após a coleta as amostras da pastagem foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas até a análise.

Posteriormente as amostras de fezes e pastagem foram descongeladas, pesadas e colocadas em estufa com ventilação forçada regulada à temperatura de 55°C por 72 horas e foram moídas em moinhos do tipo Willey com peneira de 1mm. Em seguida o LIPE[®] das amostras de fezes foi analisado no Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em espectrofotômetro com detector de luz no espectro do infravermelho (FTIV), modelo Varian 099-2243. A produção fecal foi calculada pela razão logarítmica das bandas espectrais entre os comprimentos de onda 1.050nm e 1.650nm (SALIBA et. al., 2003). Para cálculos de produção fecal utilizou-se a fórmula segundo Saliba (2005).

A quantificação de FDN_i das fezes e da pastagem, foi obtida após incubação no rúmen de búfalos fistulados, onde 0,8g foram colocados em sacos de TNT, com dimensões de 4x4 cm. Em seguida foram colocadas em redes plásticas e incubadas por 288 horas. Após a incubação ruminal, os sacos foram lavados em água corrente e submetidos à fervura por 1 hora em solução de detergente neutro (VAN SOEST & ROBERTSON, 1985), posteriormente lavados com água quente e acetona, em seguida o resíduo considerado FDN_i.

O consumo de matéria seca (CMS) com base na FDN_i foi estimado utilizando-se a equação $CMS = PF \times (CIF\% / CIP\%)$, onde PF é a produção fecal, CIF é a concentração do indicador nas fezes e CIP é a concentração do indicador na pastagem.

2.4 Determinação dos minerais na pastagem

Para determinação de cobre, cobalto, zinco, ferro e cálcio na pastagem foram utilizadas parte das amostras coletadas para determinar a FDNi. Os minerais foram determinados segundo metodologia desenvolvida por Carmo et al. (2000) para análise foliar via seca.

2.5 Suplementação mineral

Os animais foram suplementados durante os 210 dias com uma mistura mineral contendo a seguinte composição por quilograma: sódio (196,5g); fósforo (97,5g); cobre (875mg); cobalto (126mg); Selênio (36mg); zinco (1010mg) (adaptado de TOKARNIA et al., 2010). As fontes de minerais utilizadas foram o cloreto de sódio, o fosfato bicálcio, o sulfato de cobre, o selenito de sódio e o sulfato de zinco. O controle do consumo médio de minerais foi realizado medindo-se a quantidade de mistura mineral ofertada e a quantidade que sobrou no cocho após o período experimental. A mistura mineral foi oferecida aos animais em cocho coberto com proteções laterais contra as chuvas.

2.6 Coleta de tecido hepático e dosagens químicas

As amostras de fígado foram coletadas por meio de biópsia realizada no terço superior da 12^a costela do lado direito, utilizando uma furadeira automatizada de impacto modelo GSR 14,4 VE-2 profissional, acoplada a uma serra copo modelo Starret 25 mm com guia suporte A01 – Mandril 3/8.

Para a realização das biópsias, os animais foram inicialmente sedados com cloridrato de xilazina a 2% na dose de 1 mL para cada 100 kg de peso vivo por via intramuscular e contidos fisicamente utilizando cordas, mantendo-os em decúbito lateral esquerdo.

Na região do terço superior direito da 12^a costela foi realizada a tricotomia e a lavagem com água e sabão neutro. Em seguida foi realizada a anestesia local do tipo infiltrativa intramuscular e subcutânea utilizando 40 mL de cloridrato de lidocaína a 2%. Posteriormente, realizou-se uma segunda lavagem com água e sabão neutro da área tricotomizada e a devida assepsia utilizando álcool iodado a 10%.

Foi realizada uma incisão na pele sobre a 12^a costela de aproximadamente 10 cm de comprimento e o debridamento do tecido subcutâneo para exposição da costela. Em seguida foi retirado dois fragmentos de tecido ósseo da região cranial.

Após a retirada das amostras de tecido ósseo o peritônio foi exposto, realizou-se a incisão do mesmo e expôs-se o bordo caudal do lobo caudado do fígado, que foi pinçado com uma pinça atraumática modelo Doyan para tracioná-lo e ao mesmo tempo provocar hemostasia após a retirada de cerca de cinco gramas de fígado.

Foi realizada a sutura do peritônio com *catgut* simples nº 0. Em seguida foi feita sutura do tecido subcutâneo com padrão contínuo simples utilizando fio de nylon nº 0,50 mm. E por fim foi realizada a aproximação da pele com fio de nylon nº 0,80 mm com um padrão de sutura tipo Wolf. Os animais foram tratados com dose única de oxitetraciclina, flunixin meglumine e unguento tópico. Esse procedimento foi repetido no final do período experimental.

As amostras de fígado foram armazenadas em sacos plásticos, limpos e previamente identificados, colocadas em caixa isotérmica com gelo e posteriormente, foram congeladas a -20°C até a realização das análises dos minerais.

Para determinação das concentrações de cobre, cobalto, zinco, selênio e ferro as amostras de fígado congeladas foram cortadas em lâminas finas utilizando-se navalhas de aço inoxidável limpas; em seguida foram colocadas em tubos Falcon de 50ml e submetidas ao processo de liofilização durante 12 horas em aparelho automatizado LIOTOP[®] (modelo L101). Após esse processamento as amostras foram maceradas em grau e pistilo.

Posteriormente entre 0,25 a 0,26g do macerado foram pesadas e colocadas em tubo de digestão de teflon (modelo Xpress). Em seguida foram adicionados 3 mL de ácido nítrico P.A. a 65%, 1 mL de ácido clorídrico a 30% e 1 mL de peróxido de hidrogênio P.A. a 30 %. As amostras ficaram em repouso durante 2 horas para uma pré-digestão e posteriormente foram colocadas para digestão final por um período de 50 minutos em sistema fechado por radiação de microondas (MARSXpress, CEM Corp. Matthews, NC, USA). Após a digestão os minerais nas amostras foram analisados pela técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP OES) no equipamento ICP-OES (Vista-MPX CCD simultâneo, axial da VARIAN) em sistema de amostragem automático (SPS – 5). O controle das condições operacionais do ICP-OES foi realizado com o software ICPExpert Vista. Os brancos analíticos foram preparados pelos mesmos procedimentos sem a adição das amostras de fígado. Esses procedimentos foram realizados no laboratório de análises químicas do Instituto Evandro Chagas.

2.7 Análise estatística

Todos os parâmetros foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e classificados em Gaussianos e não Gaussianos. As médias e os desvios padrões foram determinados de forma descritiva. As extensões de referência obedeceram dois desvios padrões para mais e para menos em relação à média nos Gaussianos e através dos percentis de 2,5% e 97,5% para os Não Gaussianos. Os parâmetros Gaussianos foram submetidos ao Teste *t* e os parâmetros não Gaussianos foram submetidos ao Teste de Wilcoxon para comparar o antes e o depois. O nível de significância considerado foi de 0,05. Todas as análises foram realizadas no programa computacional BioEstat 5.0 (AYRES et al. 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores individuais e médios dos pesos inicial, final e médio, assim como o consumo de matéria seca e o consumo de matéria seca em relação ao percentual de peso vivo, o ganho de peso no período e o ganho de peso diário estão relacionados na Tabela 1.

O consumo médio de matéria seca de 4,95kg e o consumo médio de matéria seca dos animais em relação ao peso vivo correspondeu a 1,47%. Esses valores estão abaixo dos valores estipulados por Puniu e Singh (2001), que descreveram que os requerimentos de matéria seca para búfalos entre 300 e 400 kg e com ganho de peso médio de 500g por dia é de 5,1 a 9,7kg, que correspondem entre 1,7% a 2,4% do peso vivo. A baixa ingestão de matéria seca pelos animais deste experimento pode ter ocorrido em virtude do manejo e do comportamento arreado dos animais apresentado durante todo o período experimental. Durante o manejo para colocação do marcador externo (LIPE) os animais eram colocados em tronco de contenção individual e contidos pela narina com uma “formiga” para facilitar a aplicação do marcador por via oral. Esse procedimento causou trauma nessa região durante cada período de aplicação do LIPE® e foi observado que os animais não enchiam plenamente o rúmen. Segundo Borges (2007) e Soares et al. (2009) a manipulação excessiva dos animais durante os processos de aplicação de marcadores externos de digestibilidade e produção fecal pode causar estresse e diminuir significativamente o consumo de matéria seca pelos animais. Outro fator foi o comportamento arreado dos animais, pois ao avaliarmos o percentual de consumo dos animais da Tabela 1, podemos verificar que nos animais 312, 313, 314, 315 e

316 de comportamento mais dócil o consumo de matéria seca em média de $1,81\% \pm 0,26$ foi superior aos $1,28\% \pm 0,20$ dos demais animais que tinham um comportamento menos dócil.

O ganho médio de peso entre os períodos antes da suplementação e após a suplementação foi de $81,60\text{Kg} \pm 56,06$. Com um ganho médio diário de $388,40\text{g} \pm 266,96$. Ao Comparar os valores de ganho de peso no período e o ganho de peso médio diário verificamos que os animais mais dóceis tiveram um ganho de peso médio de $716,2\text{g} \pm 97,0$ valores bem superiores as $210\text{g} \pm 80$ dos demais animais. Isso é explicado pelo maior consumo de matéria seca desses animais. Os valores médios de ganho de peso observado nesse estudo foram inferiores aos obtidos por Cardoso et al. (2008) em dois experimentos com suplementação mineral em búfalos, com idade entre oito e 10 meses, durante 14 meses. Nesses experimentos o ganho de peso médio variou de 550g e 580g por dia.

Tabela 1. Valores individuais e médios do peso inicial, final e médio, o consumo de matéria seca (CMS), o consumo de matéria seca em relação ao percentual do peso vivo (CMS%PV), do ganho de peso no período (GPP) e do ganho de peso médio diário (GMD) das búfalas após o experimento.

Búfalas	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Peso médio (kg)	CMS (kg)	CMS (%PV)	GPP (kg)	GMD (g)
312	200	365	282,5	5,07	1,79	165	785,7
313	227	370	298,5	5,43	1,82	143	681,0
314	153	305	229,0	4,30	1,88	152	723,8
315	158	330	244,0	5,23	2,14	172	819,0
316	285	405	345,0	4,86	1,41	120	571,4
317	400	455	427,5	4,19	0,98	55	261,9
318	385	400	392,5	5,15	1,31	15	71,4
319	385	445	415,0	5,07	1,22	60	285,7
320	405	435	420,0	5,13	1,22	30	142,9
321	325	380	352,5	4,05	1,15	55	261,9
322	305	350	327,5	5,47	1,67	45	214,3
323	370	435	402,5	4,73	1,18	65	309,5
324	400	425	412,5	4,99	1,21	25	119,0
325	340	380	360,0	5,63	1,56	40	190,5
Média	309,9	391,40	350,64	4,95	1,47	81,60	388,40
/DP	$\pm 91,40$	$\pm 45,12$	$\pm 66,40$	$\pm 0,48$	$\pm 0,34$	$\pm 56,06$	$\pm 266,96$

Os valores médios de cobre, cobalto, zinco e ferro nas pastagens e seus requerimentos por bovinos estão descritos na Tabela 2. Verificamos que a concentração de cobre na

pastagem de 3ppm está muito abaixo das necessidades dos animais, quando comparados com os valores de referência para bovinos (RIET-CORREA e TIMM, 2007). As concentrações de cobalto estão abaixo das recomendações de 0,6ppm na MS (STAUFENBIEL, 2005). Os valores de zinco estão adequados (RADOSTITS et al., 2002) e os de ferro estão um pouco acima das necessidades diárias para bovinos (NRC, 1996).

Tabela 2. Concentração de cobre, cobalto, zinco e ferro na matéria seca (MS) de *Brachiaria brizantha* e os requerimentos por bovinos.

Minerais	MS (ppm)	Requerimentos (ppm)
Cobre ¹	3,0	10 ¹
Cobalto ²	0,6	0,1
Zinco ⁴	67,7	40 a 90
Ferro ³	63,7	Até 50
Cálcio ⁵ (%)	0,90	0,48*

Riet-Correa e Timm (2007)¹; Staufenbiel (2005)²; NRC(1996)³; Radostits et al. (2002); Bülbül (2010)⁵

*Necessidade para búfalos com média de 300 kg de peso vivo e com ganho diário de 500g de peso.

Relacionando as concentrações de cobre, cobalto, zinco e ferro nas pastagens com o consumo médio de matéria seca dos animais e com o consumo da mistura mineral (Tabela 3), verificamos que a ingestão média total (Tabela 4) foi de 45,19mg±1,39 para o cobre; de 4,37mg±0,04 para o cobalto; 335,33mg±36,31 para o zinco e de 313,27mg±32,28 para o ferro. E a ingestão de selênio por meio da mistura mineral foi de 1,25mg.

A ingestão total de cobre está muito abaixo dos valores de 100mg/animal/dia recomendados por Tokarnia et al. (2010). Entretanto, Sharma et al. (2008) avaliaram a resposta de novilhas búfalas com idades entre 14 e 20 meses à suplementação com cobre e verificaram que o grupo de animais que receberam aproximadamente 50mg de cobre diariamente tiveram um aumento significativo nas reservas de cobre no fígado e no peso corporal em relação ao grupo que ingeriu aproximadamente 30mg.

O consumo total de cobalto de 4,37mg±0,04 está um pouco abaixo das recomendações mínimas de 5mg estabelecidas por Tokarnia et al. (2010). Quando consideramos somente a ingestão de cobalto por meio da pastagem verificamos que o consumo médio de 0,45mg±0,04 estaria de acordo com as recomendações de 0,1mg/kg de MS sugeridos por Underwood

(1977). Porém, Staufenbiel (2005) e Dirksen et al. (2005) afirmam que a ingestão de 0,1mg/kg de MS não é suficiente para atender as necessidades de cobalto para bovinos. Kisidayová et al. (2001) sugere que a ingestão de 1,7 mg de cobalto por quilograma de MS seria muito mais apropriado para atender as necessidades da microbiota ruminal de bovinos.

A ingestão total média de zinco pelos animais por meio da pastagem e da mistura mineral foi de 335,33mg±36,31. Ao compararmos as concentrações de 67,7ppm de zinco na *Brachiaria brizantha* verificamos que somente a forrageira supriria os requerimentos para bovinos que seria de 40 a 90ppm de MS (RADOSTITS et al. 2002).

Tabela 3. Valores individuais e médios do consumo de matéria seca (CMS) e da mistura mineral (CMM) e a ingestão por meio da pastagem e/ou da mistura mineral de micro minerais pelas búfalas durante o experimento.

Animal	CMS (kg)	CMM (g)	Ingestão por meio da pastagem (mg)				Ingestão por meio da mistura mineral (mg)			
			Cu	Co	Zn	Fe	Cu	Co	Zn	Se
312	5,07	34,6	15,06	0,45	343,77	323,55	23,36	3,92	31,45	1,25
313	5,43	34,6	16,70	0,49	363,25	342,16	23,36	3,92	31,45	1,25
314	4,30	34,6	12,88	0,39	288,88	271,80	23,36	3,92	31,45	1,25
315	5,23	34,6	15,88	0,47	353,16	332,63	23,36	3,92	31,45	1,25
316	4,86	34,6	14,72	0,44	326,83	307,59	23,36	3,92	31,45	1,25
317	4,19	34,6	13,10	0,38	277,00	260,61	23,36	3,92	31,45	1,25
318	5,15	34,6	15,30	0,46	345,77	325,14	23,36	3,92	31,45	1,25
319	5,07	34,6	15,26	0,46	343,15	323,07	23,36	3,92	31,45	1,25
320	5,13	34,6	15,03	0,46	348,39	327,55	23,36	3,92	31,45	1,25
321	4,05	34,6	12,74	0,37	264,24	248,70	23,36	3,92	31,45	1,25
322	5,47	34,6	16,30	0,49	370,24	348,44	23,36	3,92	31,45	1,25
323	4,73	34,6	14,27	0,43	319,5	300,97	23,36	3,92	31,45	1,25
324	4,99	34,6	14,57	0,45	339,67	319,50	23,36	3,92	31,45	1,25
325	5,63	34,6	17,36	0,51	375,82	354,15	23,36	3,92	31,45	1,25
Média/	4,95	34,6	14,94	0,45	332,83	313,27	23,36	3,92	31,45	1,25
DP	±0,48		±1,39	±0,04	±34,23	±32,28				

DP: Desvio padrão

A concentração média de cobre no fígado antes da suplementação mineral foi de 7,75ppm±1,73 e após a suplementação foi de 205,41±80,54, tendo um aumento significativo (P<0,05). Ao compararmos esses valores com os de referência para bovinos verificamos que todas as búfalas antes da suplementação eram deficientes em cobre (Tabela 5). Valores de cobre hepático em búfalos da Ilha de Marajó de 5,7, 19,51 e de 5,57ppm foram descritos por Cardoso (1997), Pereira e Cardoso (2009) e Pinheiro et al. (2011) respectivamente. Sharma et

al. (2008) também encontraram valores baixos de cobre no fígado ($38,42\text{ppm}\pm 3,24$) de novilhas búfalas no norte da Índia submetidas a uma alimentação deficiente neste mineral durante 120 dias. Marques et al. (2003), no Rio Grande do Sul, encontraram níveis de cobre no fígado de bovinos de $3,6\text{ppm}\pm 1,6$ em um surto de morte súbita e atribuíram essa deficiência ao excesso de ferro na pastagem ($522\text{ppm}\pm 122,2$) em virtude do efeito antagônico do ferro sobre a absorção do cobre a nível intestinal (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

Tabela 4. Valores individuais e médios da ingestão total de cobre, cobalto, zinco, selênio e ferro por meio da pastagem e/ou da mistura mineral durante o período experimental.

Animal	Cu	Co	Zn	Se	Fe	Ca (g)
312	45,31	4,37	378,77	1,25	323,55	45,66
313	46,95	4,41	363,25	1,25	342,16	48,83
314	43,13	4,31	288,88	1,25	271,8	38,70
315	46,13	4,39	353,16	1,25	332,63	47,03
316	44,97	4,36	326,83	1,25	307,59	43,75
317	43,35	4,30	277,00	1,25	260,61	37,72
318	45,55	4,38	345,77	1,25	325,14	46,38
319	45,51	4,38	343,15	1,25	323,07	45,64
320	45,28	4,38	348,39	1,25	327,55	46,19
321	42,99	4,29	264,24	1,25	248,7	36,46
322	46,55	4,41	370,24	1,25	348,44	49,23
323	44,52	4,35	319,52	1,25	300,97	42,56
324	44,82	4,37	339,67	1,25	319,5	44,88
325	47,61	4,43	375,82	1,25	354,15	50,69
Média/DP	45,19±1,39	4,37±0,04	335,82±36,31	1,25	313,28±32,28	44,55±4,33

DP: Desvio padrão

Os valores médios e de referência de cobre, cobalto, zinco, selênio e ferro no fígado das búfalas antes e após a suplementação mineral estão descritos na Tabela 5.

Aumento nas concentrações hepáticas de cobre de $171,53\text{ppm} \pm 5,56$ para $292,5\text{ppm}\pm 5,21$ em razão da suplementação deste elemento por meio da mistura mineral foi verificado por Sharma et al. (2008). Associado ao aumento do cobre hepático os autores também verificaram um ganho de peso médio de 580g por dia.

Ao avaliarmos as concentrações de ferro antes e após a suplementação verificamos que houve uma redução significativa ($P<0,05$). A concentração inicial média era de $1.395,72\text{ppm}\pm 764,74$ e após a suplementação reduziu para $826,48\text{ppm}\pm 394,76$. O acúmulo de ferro no fígado tem sido atribuído à deficiência de cobre em virtude da diminuição da atividade da enzima ceruloplasmina que é responsável pelo transporte do ferro dos tecidos

(MILLS et al., 1976). Por outro lado, o excesso de ferro na alimentação entre 250 e 500 ppm também pode causar diminuição nas concentrações de cobre hepático (BREMNER et al. 1987), o que não foi observado neste estudo, uma vez que as pastagens apresentaram valores de 63,7ppm, que são muito inferiores a estes (Tabela 1). Possivelmente o aumento nas concentrações de ferro no fígado ocorreu em virtude da deficiência de cobre.

Os níveis médios de cobalto antes e após a suplementação não diferiram estatisticamente, pois podemos verificar que os valores hepáticos médios de $0,40\text{ppm}\pm 0,17$ antes e de $0,40\pm 0,22$ após a suplementação são semelhantes e estão acima do valor de 0,12ppm, que é a quantidade mínima necessária no fígado dos animais para realizarem as funções do organismo que dependem de cobalto (UNDERWOOD, 1977). Desta forma verificamos que os animais oriundos da Ilha de Marajó não eram deficientes em cobalto. Esses valores diferem dos encontrados por Pinheiro et al. (2011) que observaram deficiência e subdeficiência em 51,92% das 104 amostras de fígado analisadas.

Quanto ao zinco os valores médios no fígado foram de $88,01\text{ppm}\pm 35,03$ antes e de $75,71\pm 11,74$ após a suplementação na mistura mineral e não diferiram estatisticamente. Entretanto, quando comparamos com os valores de referência para bovinos (UNDERWOOD, 1977), verificamos que os valores estão abaixo do recomendado que é de 101 a 200ppm. Apesar de estar abaixo do recomendado esses valores são bem superiores aos $27,05\text{ppm}\pm 13,12$ encontrados por Pinheiro et al. (2011) e são inferiores aos 123ppm observados por Cardoso (1997). Estes estudos foram realizados em búfalos da Ilha de Marajó onde possivelmente os solos e as pastagens são deficientes nesse mineral. Ao avaliarmos as concentrações de zinco no fígado das búfalas antes e após a suplementação (Tabelas 6 e 7) verificamos que 28,6% das búfalas apresentavam valores hepáticos dentro da normalidade quando comparado com os de bovinos; após a suplementação 100% dos animais foram deficientes. Isso pode ter ocorrido em virtude da presença de algum mineral que antagoniza o Zn presente na alimentação como, por exemplo, o excesso de cálcio (RIET-CORREA, 2007).

O efeito negativo do excesso de Cálcio na alimentação sobre a absorção de zinco por ovinos foi descrito por Todo et al. (2010) onde verificaram que ovinos que receberam por via oral Ca (5,24 g de Ca/Kg, sendo 3,7 g de Ca da forragem mais 1,4 g da mistura mineral mais 0,14 g do probiótico) e Zn (34,4 mg de Zn/Kg, sendo 14 mg Zn da forragem mais 6 mg Zn do suplemento mineral e mais 14,40 mg do probiótico), apresentaram redução de 11% nas concentrações séricas de zinco em relação ao grupo controle, que não recebeu Ca e Zn suplementar por meio do probiótico.

As concentrações de selênio no fígado das búfalas antes e após suplementação foram de $0,22\text{ppm}\pm 0,12$ e $1,30\pm 1,34$ respectivamente, tendo um aumento significativo ($P<0,05$). Porém, ao avaliarmos as determinações de selênio por animal, antes e após a suplementação, verificamos que oito (57,1%) e três (21,43%) dos animais respectivamente apresentaram valores de selênio abaixo de 0,001ppm, pois esse era o limite de detecção do equipamento utilizado para fazer a leitura das amostras. Dessa forma, podemos afirmar baseados nos valores de referência para bovinos que esses animais são deficientes em selênio. Porém não foram observados sinais clínicos relacionados à deficiência deste elemento nos animais.

Tabela 5. Valores de referência para a espécie bovina e os valores médios de cobre, cobalto, zinco, selênio e ferro no fígado de búfalas antes e após a suplementação mineral.

Minerais	Valores de referência			Antes da suplementação	Após suplementação	Probab ilidade
	Deficiente	Subdeficiente	Normal			
Cobre ¹ (ppm)	<50	51 a 100	>101	$7,75\pm 1,73^b$	$205,41\pm 80,54^a$	$P<0,05$
Cobalto ¹ (ppm)	<0,05	0,05 a 0,12	>0,12	$0,40\pm 0,17$	$0,40\pm 0,22$	$P>0,05$
Zinco ¹ (ppm)			101 a 200	$88,01\pm 35,03$	$75,71\pm 11,74$	$P>0,05$
Selênio ² (ppm)			>1	$0,22\pm 0,12^b$	$1,30\pm 1,34^a$	$P<0,05$
Ferro ¹ (ppm)			200- 300	$1.395,72\pm 764,74^a$	$826,48\pm 394,76^b$	$P<0,05$

Underwood (1977)¹ Dirksen et al. (2005)²

Tabela 6. Níveis hepáticos de micro minerais em búfalas oriundas da Ilha de Marajó antes da suplementação mineral.

Animal	Cobalto	Cobre	Zinco	Selênio	Ferro
312	0,76	7,22	51,34	<LD*	992,60
313	0,62	9,59	88,42	<LD	968,70
314	0,39	11,54	84,51	0,04	777,10
315	0,23	9,68	72,50	0,29	681,20
316	0,39	9,16	100,90	0,38	833,40
317	0,38	6,94	90,24	0,32	1.294,00
318	0,46	5,49	88,05	0,24	1.506,00
319	0,29	7,72	58,45	0,27	2.729,00
320	0,49	7,88	68,03	<LD	869,30
321	0,62	7,31	61,80	<LD	1.945,00
322	0,42	6,80	192,00	<LD	3.222,00
323	0,47	5,16	112,00	<LD	1.459,00
324	0,09	9,02	66,56	<LD	822,50
325	0,25	7,36	107,50	<LD	1.348,00
Média/DP	0,40±0,17	7,75±1,73	88,01±35,03	0,22±0,12	1.395,72±764,74

*LD- Limite de detecção; DP: Desvio padrão

Tabela 7. Níveis hepáticos de micro minerais em búfalas oriundas da Ilha de Marajó sete meses após o início da suplementação mineral.

Animal	Cobalto	Cobre	Zinco	Selênio	Ferro
312	0,49	351,60	99,39	0,02	728,80
313	0,31	226,40	85,89	2,55	652,80
314	0,15	160,00	85,49	0,08	615,30
315	0,20	231,30	61,98	0,02	586,20
316	0,78	210,60	54,93	0,21	363,10
317	0,39	353,30	72,37	0,39	589,60
318	0,50	216,50	69,96	<LD*	1.122,00
319	0,75	290,80	81,81	0,22	1.689,00
320	0,17	158,50	75,11	2,94	662,40
321	0,46	142,30	78,36	2,20	1.311,00
322	0,62	83,22	85,35	2,86	1.410,00
323	0,48	164,10	75,45	<LD	613,00
324	0,10	144,40	60,79	2,85	466,30
325	0,23	142,70	73,09	<LD	761,20
Média/DP	0,40±0,22	205,41±80,54	75,71±11,74	1,30±1,34	826,48±394,76

*LD- Limite de detecção; DP: Desvio padrão

4 CONCLUSÃO

As baixas concentrações de cobre, selênio e zinco verificadas no fígado das búfalas oriundas da Ilha de Marajó antes de receberem suplementação mineral se justifica em decorrência da baixa fertilidade do solo e do baixo valor nutricional das pastagens nativas utilizadas pelos animais e também pela ausência de suplementação mineral na maioria das propriedades. Entretanto a não resposta do zinco à suplementação pode ter ocorrido em virtude da presença, em grande quantidade, de elementos que antagonizam o zinco, possivelmente o cálcio presente na pastagem utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIMA, E.; UHL, C. **Pecuária na Amazônia Oriental: desempenho atual e perspectivas futuras**. Belém: IMAZON, 1996. p. 9-31. (Série Amazônia, 1).
- AYRES, M.; JR AYRES, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências Bio-Médicas**. 2007, 364 p.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; DUARTE, M.D.; SILVEIRA, J.A.S. **Doenças de búfalos na Amazônia** in: II Simpósio Mineiro de Buiatria. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; DUARTE, M.D.; ALBERNAZ, T.T.; OLIVEIRA, C.A.; RIET-CORREA, G.; RIET-CORREA, F. **Phosphorus deficiency in buffaloes in the state of Pará, Northern Brazil**. Italian Journal of Animal Science. Vol. 6 supplement 2, p. 971-973. 2007.
- BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C.; DUARTE, M.D.; SILVEIRA, J.A.S. **Doenças de búfalos na Amazônia** in: II Simpósio mineiro de Buiatria. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2005.
- BARROS, C.S.L.; BARROS, S.S.; SANTOS, M.N.; METZDORF, L.L. **Miopatia nutricional em bovinos no Rio grande do Sul**. Pesq. Vet. Bras. 8 (3/4):51-55.
- BENNETS, H.W.; BECK, A.B.; HARLEY R. **The pathogenesis of "falling disease"**. Aust. Vet. J. 24:237-244, 1948.
- BORGES, A. L. C. C. **Avaliação do consume de pasto por bovino de corte, estimado pelos indicadores externos: óxido crômico e LIPE®**. Dissertação Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 100p. 2007.
- BREMNER, I.; HUMPHRIES W.R.; PHILLIPPO, M.; WALKER J.M.; MORRICE P.C. **Iron-induced cooper deficiency in calves: dose-response relationships and interactions with molybdenum and sulphur**. Anim. Prod. 45:403-414, 1987.
- BREVES, G.; SCHRODER, B. **Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism**. Nutrition Research Reviews, 4, 125-140,1991.
- BÜLBUL, T. **Energy and Nutrient Requirements of Buffaloes**. Kocatepe Vet. J. 2010 Vol. 3, n. 2, p. 55-64. 2010
- CARDOSO E.C.; TEIXEIRA NETO, J.F.; SILVA, A.W.C.; VEIGA, J.B.; VALE, W.G.; ALENCAR N.X. **Deficiência de cálcio e fósforo em bubalinos no município de Portel, Estado do Pará**. EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 135. 1992b.
- CARDOSO, E.C. **Nutrição mineral em bubalinos e bovinos nos campos do Marajó, Estado do Pará: Cálcio, fósforo, cobre, cobalto, manganês, ferro e zinco**. Tese

(Doutorado)- Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 1997.

CARDOSO, E.C.; PEREIRA, W.L.A. **Mineral deficiency of buffaloes from Marajó Island, North of Brazil: current situation and perspectives.** In: Buffalo Symposium of Americas, 2002, Belém, PA. Proceedings. Belém: ABCB/APCB, 2002. p.47-55.

CARDOSO, E.C.; TEIXEIRA NETO, J.F.; SILVA, A.W.C.; VEIGA, J.B.; VALE, W.G.; SOUZA FILHO, A.P.S.; ALENCAR, N.X. **Deficiência mineral em bubalinos no Município de Santa Maria, Estado do Pará.** Belém, Embrapa-Cpatu, 4 p. (Embrapa-Cpatu. Comunicado Técnico, 71), 1992.

CARDOSO, E.C.; VIANA, R.B.; VALE, W.G.; ARAÚJO, C.V.; OLIVEIRA, D.R. **Eficiência produtiva de búfalos no Estado do Pará em diferentes condições de suplementação mineral.** Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 45, n. 6, p. 437-442, 2008.

CARMO, C.A.F.S.; ARAÚJO, W.S.; BERNARDI, A.C.C.; SALDANHA, M.F.C. **Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na embrapa solos.** Circular técnica n° 6, Embrapa solos, 2000.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. **Medicina Interna y Cirugía del Bovino.** 4ª ed. Inter-médica. Buenos Aires, Argentina. Vol. 1, 632p. 2005.

FALESI, I.C. **O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia brasileira.** Boletim técnico do Instituto de Pesquisa e Experiência Agropecuária do Norte. V. 54, p.17-66. 1972.

FICK, K.R.; MCDOWELL, L.R.; MILES, P.H.; WILKINSON, N.S.; FUNK J.D.; CONRAD J.H.; DAYRELL M.S.; ROSA I.V. **Métodos de Análises de Minerais em Tecidos de Animais e de Plantas.** 2ª ed. University of Florida, Gainesville. 79p. 1980.

GARG, M.R.; BHANDERI, B.M.; BIRADAR, S.A.; KUKREJA, J.L.; SHERASIA, P.L. **Dietary mineral status of lactating buffaloes in Kolhapur district of Maharashtra State.** Ital.J.anIm.ScI. vol. 6, (Suppl. 2), 484-487, 2007.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Indicadores sanguíneos do metabolismo mineral em ruminantes.** In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 31-51, 2000.

GRIFFITHS, L.M.; LOEFFLER, S.H.; SOCHA, M.T.; TOMLINSON, D.J.; JOHNSON, A.B. **Effects of supplementing complexed zinc, manganese, copper and cobalt on lactation and reproductive performance of intensively grazed lactating dairy cattle on the South Island of New Zealand.** Animal Feed Science and Technology, 137, 69 – 83p. 2007.

HADDAD, C.M.; ALVES, F.V. **Minerais para gado de corte.** In: BITTAR, C.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P.; MATTOS, W.R.S. *Minerais e aditivos para bovinos; Anais ... Piracicaba: FEALQ, 2006 p.63-76.*

HURLEY, W.L.; DOANE, R.M. **Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction.** *Journal of Dairy Science* 72, 784 -804, 1989.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** – Pesquisa da Pecuária Municipal, 2010.

JAYACHANDRAN, S.; NANJAPPAN, K.; MURALIDHARAN, J.; SELVARAJ, P.; MANOHARAN, A. **Blood biochemical and mineral status in cyclic and postpartum anestrus buffaloes.** *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences (Online)*, Vol. 3 (1) January-April, pp. 93-97, 2013.

JUDSON, G.J.; MCFARLANE, J.D.; MITSIOULIY, A; ZVIEDRANS, P. **Vitamin B₁₂ responses to cobalt pellets in beef cows.** *Auct. Vet.* Vol. 75, No 9, September 1997.

KAWASHIMA, T.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B.; LITTELL, R.C.; J. PRICE. **The relative value of reagent grade and feed grade cobalt sources from tissue cobalt accumulation and vitamin B₁₂ concentrations.** *Nutrition Research*, Vol. 17, N°. 6. pp. 957-974.1997.

KENDALL, H.M.; GLENDINNING, R.M.; MACFADDEN, C.H.; LOGAN, R.F. **Introduction to physical geography.** Harcourt Brace Jovanovich, inc. New York. 1974

KISIDAYOVÁ, S.; SVIATKO, P.; SIROKA, P.; JALC, D. **Effect of elevated cobalt intake on fermentative parameters and protozoan population in Rusitec.** *Animal feed science and technology.* V. 91, p. 223-232, 2001.

KOMISARCZUK, S.; MERRY, R.J.; MCALLAN, A.B. **Effect of different levels of phosphorus on rumen microbial fermentation and synthesis determined using a continuous culture technique.** *British Journal of Nutrition* 57, 279-290. 1987.

LEHNINGER, A .L. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier. 1994. p.37.

LITTLE, D. A. **Bone biopsy in cattle and sheep for studies of phosphorus status.** *Aust. Vet. J.*, 48(12):668-670, 1972.

LUCCI, C.S.; ZANETTI, M.A.; SCHALCH, E.S.; PETTINATI, R.L.; FRANZOLIN NETO, R.; OSTRONFF, S.; CAMPOS, D.M.; SILVA, A.G.; ANDRADE, A.M.L. **Suplementação de selênio para bovinos leiteiros.** *Anais XXII Reunião anual da SBZ, Balneário Camboriú, SC (Resumo 73), 1985.*

MAHMOOD, A.; KHAN, M. A.; YOUNUS, M.; AHAD, A.; AHMAD, M.; IQBAL, H. J.; FATIMA, Z.; ANEES, M. **Haematological and biochemical risk factors of parturient haemoglobinuria in buffaloes.** *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23(2): 2013, p. 364-368.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**. 2ª. Edição, Piracicaba, 201p., 1989.

MARQUES, A.P.; RIET-CORREA, F.; SOARES, M. P.; ORTOLANI, E.L.; GIULIODORI, M.J. Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre. *Pesq. Vet. Bras.* vol.23 nº.1 Rio de Janeiro Jan./Mar. 2003.

MCDOWELL, L.R.; ARTHINGTON, J.D. **Minerals for Grazing Ruminants in Tropical Regions**. Fourth Edition, University of Florida, 85p, 2005.

MCDOWELL, L.R. **Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais, enfatizando o Brasil**. Terceira edição, university of Florida, 92p, 1999.

MCDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego, Academic, p.524. 1992.

MENDES M.O. **Mineral status of beef cattle in the northern part of Mato Grosso, Brazil, as indicated by age, season, and sampling technique**. Dissertation, University of Florida, Gainesville. 236p, 1977.

MILLS, C.F.; DALGARNO, A.C.; WENHAN, G. **Biochemical and pathological changes in tissues of Friesian cattle during experimental induction of copper deficiency**. *British Journal of Nutrition* 35, 309–311, 1976.

MORAES, S.S.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. **Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil**. *Pesq. Vet. Bras.* vol.19 n.1 Rio de Janeiro Jan. 1999.

MORAES, S.S.; TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. **Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil**. *Pesq. Vet. Bras.* vol.19 n.1 Rio de Janeiro Jan. 1999.

NOMURA, C.S.; SILVA C.S.; NOGUEIRA A.R.A.; OLIVEIRA P.V. **Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry**. *Spectrochimica Acta. B* 60:673-680, 2005.

NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 7ª ed. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC. 1996.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7ª. Ed., National Academy Press. Washington D.C., p. 381. 2001.

OLIVEIRA, C.H.S.; PINHEIRO, C.P.; CAMPOS, K.F.; REIS, A.S.B.; OLIVEIRA, C.M.C.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D. **Serum levels of phosphorus in buffalos (*Bubalus bubalis*) from Marajó Island, Pará, Brazil**. In: V America's Buffalo Symposium / IV Europe and America's Buffalo Symposium, 2009, Pedro Leopoldo-MG. V America's Buffalo Symposium / IV Europe and America's Buffalo Symposium, 2009.

PEIXOTO, P.V.; MORAES S.S.; LEMOS, R.A. **Ocorrência da paraqueratose hereditária (linhagem letal A-46) no Brasil.** *Pesq. Vet. Bras.* 14(2/3):79-84. 1994.

PEREIRA, W.L.A.; CARDOSO, E.C. **Aspectos histológicos da osteoporose em bubalinos e a condição físico-química óssea e do cobre hepático.** *Rev. Ciênc. Agrár., Belém*, n. 51, p.25-36. 2009.

PERREIRA, P. S.; OLIVEIRA, D. A.; CÁCERES, N. T.; YEDA, M. P; MARCHI, S. R. **Degradabilidade ruminal de capim-braquiarião submetido a diferentes períodos de convivência com plantas daninhas após a renovação da pastagem.** XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das plantas daninhas na era da Biotecnologia, Campo Grande, MS. Setembro de 2012.

PHILLIPPO M.; HUMPHRIES W.R.; GARTHWAITE P.H. **The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrous cycle in the cattle.** *J. Agric. Sci.* 109:321-336. 1987b.

PHILLIPPO M.; HUMPHRIES W.R.; GARTHWAITE P.H. **The effect of dietary molybdenum and iron on copper status and growth in the cattle.** *J. Agric. Sci.* 109:315-320. 1987a.

PHILLIPS, C.J.C. **Principles of cattle production.** 1ª ed. CABI Publ. Wallingford. p. 278, 2001.

PINHEIRO, C.P.; BOMJARDIM, H.A.; ANDRADE, S. J.T.; FAIAL, K.C.F; OLIVEIRA, C.M.C.; BARBOSA, J. D. **Níveis de fósforo, cobre, cobalto e zinco em bubalinos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Estado do Pará.** *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):193-198, março 2011.

PRABOWO, A.; McDOWELL, L. R.; WILKINSON, N. S.; CONRAD, J. H. **Mineral status of grazing cattle in south Sulawesi, Indonésia.** *American Journal of Animal Science*, v. 4, n. 2, p. 111-120, 1991.

PUNIU, B.S.; SINGH, S. **Buffalo calf feeding and management.** *Buffalo Bulletin*, 20(1): 3-11. 2001.

RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; BLOOD D.C.; HINCHCLIFF K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos,** p.677-680. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1737p. 2002.

RIET-CORREA, F.; TIMM, C.D. **Deficiência de cobalto,** in: RIET-CORREA, F.; SHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. *Doenças de Ruminantes e Eqüídeos.* 3ª Ed. Palloti, Santa Maria, vol.2, 694p, 2007.

RUNHO, R.C.; GOMES, P.C.; ROSTAGNO, H.S. **Exigências de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 1 a 21 dias de idade.** *Revista Brasileira de Zootecnia.* 30(1) p.187-196. 2001.

SALIBA, E.O.S. **Anais da I Teleconferência sobre o uso de indicadores em nutrição animal.** BELO HORIZONTE: UFMG, 2005 (ANAIS DE CONFERENCIA).

SALIBA, E. O. S.; PEREIRA, R. A. N.; FERREIRA, W. M.; et al. **Lignin from *Eugalyptus grandis* as indicator for rabbits in digestibility trials.** Trop. Subtrop. Agroecos., v. 3., n. 1-3, 2003.

SAS Institute. **Statistical analysis system user's guide** : basics. Cary. 1290p., 1985.

SATTER, L.D.; KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.E.; POWELL, J.M. **Phosphorus and Dairy/Beef Nutrition.** Faculty Papers and Publications in Animal Science, (paper 549), 2005.

SEKERDEN, Ö. **Manda Yetitiricili.Büyükba Hayvan Yetitirme.** Temizyürek Ofset Matbaac k, Hatay, 2001.

SHARMA, M.C.; CHINMAY, J.; PATHAK, N.N.; HARZIT, K. **Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers.** Research in Veterinary Science 79 113–123, 2005.

SHARMA, M.C.; JOSH, C.; GUNJAN, D. **Therapeutic management of copper deficiency in buffalo heifers: Impact on immune function.** Vet Res Commun 32:49–63, 2008.

SHARMA, M.C.; CHINMAY, J.; SARKAR, T.K. **Therapeutic Efficacy of Minerals Supplement in Macro-minerals Deficient Buffaloes and its Effect on Haematobiochemical Profile and Production.** Asian-Aust. J. Anim. Sci.. Vol. 15, No. 9 : 1278-1287, 2002.

SMART, M.; CYMBALUK, N.F. **Role of nutritional supplements in bovine lameness: Review of nutritional toxicities.** In: GREENOUGH, P.R., WEAVER, A.D. Lameness in Cattle, 3rd ed. WBSanders Co., Philadelphia, PA, USA, pp. 145–161, 1997.

SOARES, L. F. P.; GUIM A.; FERREIRA M.A.; MODESTO, E.C.; SOARES, D.G.; SILVA, C.A.M.; MONTEIRO, P.B.S.; SILVA, G.J.F.; FRANÇA JÚNIOR, J.B.L. **Avaliação de indicadores e metodologia de coleta para estimativa da digestibilidade de nutrientes em bubalinos.** Anais Zootec. Águas de Lindóia – SP. 2009.

STANGL, G. I.; SCHWARZ, F. J.; JAHN, B.; KIRCHGESSNER, M. **Cobalt-deficiency-induced hyperhomocysteinaemia and oxidative status of cattle.** British Journal of Nutrition, 83, 3–6, 2000.

STAUFENBIEL, R. Carência de cobalto In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. **Medicina Interna y Cirugía del Bovino.** 4ª ed. Inter-médica. Buenos Aires, Argentina. Vol. 1, 632p. 2005.

TEIXEIRA NETO, J.F.; SOUZA FILHO, A.P.S.; MARQUES, J.R.F.; CAMARÃO, A.P.; TEIXEIRA, R.N.G. **Introdução e avaliação de forrageiras na Ilha de Marajó-Pará.** Belém: Embrapa-CPATU, 1991. 10 p. (Boletim de pesquisa, 122).

TERRAMOCCIA, S.; BARTOCCI, S.; BORGHESE, A. **Nutritional requirements in buffalo cows and heifers,** In: BORGHESE, A. Buffalo production and research. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 316p., 2005.

- TODO, R.Z.; DONADELI, J.P.P.; SARAIVA, H.F.R.A.; PENHA, L.A.C.; PARDO, P.E.; GIUFFRIDA, R.; GENARO, S.C. **Efeito do Probiótico com ou Sem Zinco e Cálcio na Concentração Sérica de Zinco em Ovinos.** *Colloquium Agrariae*, v. 6, n.2, Jul-Dez., p. 57-61, 2010.
- TOKARNIA C.H.; DÖBEREINER J.; CANELLA C.F.C.; GUIMARÃES J.A. **Ataxia enzoótica em cordeiros na costa do Piauí.** *Pesq. Agropec. Bras.*1:357-382. 1966.
- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. **Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos.** *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):127-138, Jul./set. 2000 (Separata).
- TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; BARBOSA, J.D.; BRITO, M.F.; DOBEREINER, J. **Deficiências minerais em animais de produção.** Editora Helinathus, Rio de Janeiro – RJ, 200 p, 2010.
- UNDERWOOD E.J.; SUTTLE N.F. **The Mineral Nutrition of Livestock.** 3rd ed. CABI Publ. Wallingford. 614 p. 1999.
- UNDERWOOD E.J. **Los minerales en la nutrición del ganado.** 1^a Ed. Editorial Acribia. Zaragoza, Espanha. 210p. 1981.
- UNDERWOOD E.J. **Trace Elements in Human and Animals Nutrition.** 4^a ed. Academic Press, New York. 545p, 1977.
- VALDES, J. L.; MCDOWELL, L. R.; KOGER, M. **Mineral status and supplementation of grazing beef cattle under tropical conditions in Guatemala.** I. Macroelements. *Journal of Production Agriculture*, v. 1, n. 4, p. 347-350,1988.
- VALLI V.E.O. **The hematopoietic system,** In: Jubb K.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals.* Vol. 3. 3rd ed. Academic Press, New York. 1985.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. **Analysis of forages and fibrous foods.** Ithaca: Cornell University, 202p. 1985.
- VERMA, P. C.; R. K. PAUL GUPTA. **Phosphorus deficiency syndrome in buffaloes.** *Proceedings of Symposium on Recent Advances in Mineral Nutrition.* C.C.S.H.A.H., Hisar. pp. 24-27, 1984.
- WU, Z.; SATTER, L. D.; BLOHOWIAK, A. J.; STAUFFACHER, R. H. e WILSON, J. H. **Milk Production, Estimated Phosphorus Excretion, and Bone Characteristics of Dairy Cows Fed Different Amounts of Phosphorus for Two or Three Years.** *J.Dairy Sci.*84:1738–1748, 2001.