

**ELAINE MELCHIORETTO**

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COBRE, FERRO, ZINCO E MOLIBDÊNIO  
EM FÍGADO DE VACAS LEITEIRAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Patologia Animal.

Orientador: Dr. Aldo Gava

**LAGES, SC**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Melchioretto, Elaine

Avaliação dos níveis de cobre, ferro, zinco e molibdênio  
em fígado de vacas leiteiras no estado de Santa Catarina /

Elaine Melchioretto. -- 2019.

50 p.

Orientador: Aldo Gava

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação , Lages, 2019.

1. Deficiência mineral. 2. Cobre. 3. Ferro. 4. Bovinos. 5.  
Hemossiderose. I. Gava, Aldo. II. Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação . III. Título.

ELAINE MELCHIORETTO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE COBRE, FERRO, ZINCO E MOLIBDÉNIO  
EM FÍGADO DE VACAS LEITEIRAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Patologia Animal.

**Banca Examinadora**

Orientador:

Prof. Dr. Aldo Gava

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro interno:

Prof. Dr. Ivan Pedro de Oliveira Gomes

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro externo:

Profº Drº. Marilete de Farias Brito

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ



Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Silésio e Iracema, minha irmã Deise, ao meu noivo Cláudio e às pessoas que contribuíram durante essa caminhada.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e pela família que me concedeu, por me dar forças nos momentos mais difíceis e não me deixar desistir.

Agradeço aos meus pais Silésio e Iracema, por todo amor, carinho, paciência, dedicação e por todos os conselhos. À minha irmã Deise, por seu apoio, sempre me encorajando a seguir meus sonhos e objetivos. Aos meus nonos Moyses e Ires Melchiorretto, por sempre estarem ao meu lado e Alizete (*in memoriam*) e Valdemar De Prá (*in memoriam*) por me inspirarem.

Ao professor Aldo Gava, obriga pela oportunidade, por suas orientações, ensinamentos, incentivo e, exemplo de profissional.

À professora Mari Campos, pela ajuda imensurável na realização deste trabalho, por toda sua paciência e por permitir trabalhar em sua equipe, a qual sou grata por toda ajuda, em especial à Andressa, Ilana e Frank. Ao prof. Ederson R. Pereira e ao Matheus Machado, por toda paciência, ajuda, dicas na digestão e quantificação das amostras.

Agradeço à professora Sandra D. Traverso, pelo exemplo de determinação, patologista e guerreira.

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC) pela infraestrutura e oportunidade do Mestrado.

À CAPES/DS pela concessão de bolsa, possibilitando a dedicação exclusiva ao mestrado.

Aos frigoríficos Verdi e Gessner, por permitirem as coletas das amostras em suas instalações.

À Embrapa Sudeste pela amostra referenciada, em especial à professora Ana Rita.

Agradeço a todos do laboratório de Patologia do CAV-UDESC, que de alguma forma me apoiaram ou ajudaram. Em especial à Francíeli Molossi, por todas as palavras de apoio, a me fazer ver o que realmente importa na vida, por sua amizade e seu exemplo de determinação. À Daiane Ogliari por todos os conselhos, correções e ajuda durante o mestrado, sem você tudo seria mais difícil.

E por fim, porém não menos importante, ao Cláudio meu companheiro, por todos os momentos difíceis que esteve ao meu lado, por toda força, ajuda e questionamentos durante a fase experimental do trabalho. Obrigada por tudo, ao seu lado as dificuldades tornam-se mais leves.

A todos vocês citados ou não, muito obrigado!



“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é  
preciso buscar o que só pode ser alcançado  
por meio dos maiores esforços.”

Albert Einstein



## RESUMO

Para bovinos os minerais são elementos essenciais para manutenção do metabolismo e da produtividade. Quando algum elemento é ingerido em baixa quantidade, podem surgir enfermidades que levam a graves prejuízos para a vida dos animais e a perdas econômicas. No Brasil, a maioria dos estudos sobre carências minerais foram realizados principalmente nas regiões Norte e Centro Oeste. Em Santa Catarina a deficiência de cobre foi relatada em bovinos de corte. O presente trabalho teve como objetivo avaliar teores de cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn) e molibdênio (Mo) em fígado de vacas leiteiras de diferentes regiões do estado de Santa Catarina e quantificar hemossiderose em baço, fígado e linfonodo mesentérico dos mesmos animais. Foram coletadas 49 amostras de fígado de vacas leiteiras; destas, 27 da região Oeste de Santa Catarina, 13 do Meio Oeste, cinco do Planalto e quatro do Alto Vale do Itajaí. As amostras foram coletadas em frigoríficos ou, através de necropsias. Fragmentos de baço, fígado e linfonodo mesentérico foram conservados em formalina a 10%. Uma parte do fígado foi congelada. As amostras em formol foram processadas rotineiramente para coloração em hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas em microscópio óptico. Para avaliação dos minerais estudados neste trabalho, os fígados foram descongelados, desidratados, secos até peso constante, triturados e peneirados. A pré-digestão foi realizada com 2 ml de ácido nítrico e 2 ml de peróxido de hidrogênio e a digestão foi completada em forno micro-ondas (Microwave 3000, Anton Paar, Graz, Austria). A quantificação de Cu, Fe, Zn e Mo, foi realizada em espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP – OES). Na quantificação dos minerais em fígado, a maioria das amostras apresentaram níveis adequados para os elementos estudados. Níveis abaixo dos considerados adequados foram encontrados para Fe (19 vacas – 38,78%) e Cu (4 vacas - 8,16%). Das quatro vacas com deficiências de cobre, duas foram classificadas com deficiência primária e duas com deficiência secundária, sendo nas duas últimas, o antagonismo ocasionado em uma vaca pelo excesso de Fe e na outra pelos níveis elevados de Zn. Na histologia, nos bovinos em que a hemossiderose foi observada em quantidades significativas em baço e/ou linfonodo mesentérico, as lesões foram associadas a níveis elevados de ferro no fígado e não relacionados a deficiência de cobre.

**Palavras chave:** deficiência mineral, cobre, ferro, zinco, molibdênio, bovinos, hemossiderose.



## ABSTRACT

For cattle, minerals are essential elements for the maintenance of metabolism and productivity. When some element is ingested in low quantity, diseases can appear that lead to serious damages to the life of the animals and to economic losses. In Brazil, most studies on mineral deficiencies were carried out mainly in the North and Midwest regions. In Santa Catarina, copper deficiency was reported in beef cattle. The objective of this study was to evaluate copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn) and molybdenum (Mo) levels in liver of dairy cows from different regions of the state of Santa Catarina and quantify hemosiderosis in spleen, liver and lymph node of the same animals. A total of 49 liver samples were collected from dairy cows; of these, 27 from the West region of Santa Catarina, 13 from the Midwest, five from the Plateau and four from the Upper Vale do Itajaí. The samples were collected in refrigerators or, through necropsies. Fragments of spleen, liver and mesenteric lymph node were preserved in 10% formalin. A part of the liver was frozen. The formalin samples were routinely processed for hematoxylin and eosin (HE) staining and evaluated under an optical microscope. To evaluate the minerals studied in this study, the livers were thawed, dehydrated, dried to constant weight, crushed and sieved. Pre-digestion was performed with 2 mL of nitric acid and 2 mL of hydrogen peroxide and the digestion was completed in a microwave oven (Microwave 3000, Anton Paar, Graz, Austria). The quantification of Cu, Fe, Zn and Mo, was performed in plasma optical emission spectrometry (ICP - OES). In the quantification of minerals in the liver, most of the samples presented adequate levels for the studied elements. Levels below those considered adequate were found for Fe (19 cows - 38.78%) and Cu (4 cows - 8.16%). Of the four cows with copper deficiency, two were classified as primary deficiency and two with secondary deficiency, the latter two being the antagonism caused in one cow by excess of Fe and in the other by elevated levels of Zn. In histology, in bovines in which hemosiderosis was observed in significant amounts in spleen and / or mesenteric lymph node, lesions were associated with elevated iron levels in the liver and not related to copper deficiency.

**Keywords:** mineral deficiency, copper, iron, zinc, molybdenum, bovine, hemosiderosis.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Teores médios e porcentagem de recuperação obtidos após digestão de fígado da amostra referenciada RM-Agro E3001a: Tecido animal (Bovine liver) Embrapa pelo método USEPA 3051 A .....	37
Tabela 2 -	Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região Meio Oeste de Santa Catarina.....	38
Tabela 3 -	Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região Oeste de Santa Catarina.....	39
Tabela 4 -	Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região Planalto de Santa Catarina.....	40
Tabela 5 -	Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região do Alto Vale do Itajaí de Santa Catarina.....	40
Tabela 6 -	Quantidade e porcentagem de animais com valores: baixo, adequado e em excesso dos minerais Cobre, Ferro, Zinco e Molibdênio no estado de Santa Catarina.....	40
Tabela 7 -	Número de animais com as diferentes intensidades dos minerais estudados e de hemossiderose, nas respectivas regiões do estado de Santa Catarina...	41



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CCS	Contagem de células somáticas
ICP -OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma
LDQ	Limite de detecção qualitativo
LDQM	Limite de detecção qualitativo analítico
M	Média
t	t-student
s	Desvio padrão



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cu	Cobre
CuS	Sulfeto de cobre
Fe	Ferro
I	Iodo
K	Potássio
Kg	Quilograma
Mg	Magnésio
mg	Miligrama por quilograma
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
Na	Sódio
P	Fósforo
S	Enxofre
Se	Selênio
$\text{SO}_4^{+2}$	Sulfato



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>24</b>
2.1	MINERAIS.....	24
2.1.1	Minerais na alimentação.....	24
2.1.2	Deficiência mineral.....	25
2.2	COBRE.....	26
2.2.1	Metabolismo do cobre.....	26
2.2.2	Deficiência de cobre em bovinos.....	27
2.2.3	Sinais clínicos de deficiência de cobre em bovinos.....	29
2.2.4	Diagnóstico de deficiência de cobre.....	30
2.2.5	Suplementação e tratamento para deficiência de cobre.....	30
2.3	DEFICIÊNCIA DE COBRE EM BOVINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO: MICROELEMENTOS (Cu, Fe, Zn e Mo) EM FÍGADO DE VACAS LEITEIRAS DE DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA- BRASIL.....</b>	<b>33</b>
4.1	RESUMO.....	33
4.2	ABSTRACT.....	33
4.3	INTRODUÇÃO.....	34
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.4.1	Área de estudo.....	35
4.4.2	Quantificação de minerais.....	36
4.4.3	Histopatologia.....	37
4.5	RESULTADOS.....	37
4.6	DISCUSSÃO.....	41
4.7	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS ARTIGO.....	44
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	46



## 1 INTRODUÇÃO

O estado de Santa Catarina ocupa a quarta colocação nacional na produção de leite, sendo a região Oeste Catarinense responsável por aproximadamente 80% da produção (IBGE, 2017).

Para manutenção da produtividade e atividades metabólicas dos animais, é necessária dieta balanceada e a ingestão de minerais em quantidades adequadas. Os minerais participam na estruturação dos órgãos, na composição de eletrólitos, de fluidos e tecidos corporais, da mesma forma que atuam como catalizadores. Quando a ingestão dos minerais não é adequada, os animais podem desenvolver doenças carenciais. No Brasil, as doenças carenciais mais comuns são de fósforo (P) e sódio (Na), seguidos por cobre (Cu) e cobalto (Co) (TOKARNIA, 2000).

No caso da deficiência de Cu, esta pode ser classificada em primária ou secundária. A deficiência primária é caracterizada pelo consumo de baixa quantidade do mineral. Enquanto na deficiência secundária, a quantidade ingerida é adequada, mas a absorção do mineral é comprometida por antagonistas, tais como o molibdênio, ferro, zinco e enxofre, presentes na alimentação em concentrações acima das adequadas (RADOSTITS, 2000).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações de cobre, ferro, zinco e molibdênio em fígado de vacas leiteiras, do estado de Santa Catarina, assim como quantificar hemossiderose em baço, linfonodo e fígado dos mesmos animais.

O enxofre é um antagonista importante de Cu, mas não foi realizada sua quantificação no presente estudo, pois a literatura cita os valores adequados desse mineral em conteúdo ruminal (MILLS, 1960). Assim sua quantificação nos tecidos coletados não seria representativa. Apesar de não ter sido quantificado, abordamos sua importância como antagonista na alimentação no decorrer do trabalho.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MINERAIS

Os minerais são essenciais para os animais, por atuarem na manutenção do organismo destes. Participam na estruturação dos órgãos como componentes, compõem eletrólitos de fluidos e tecidos corporais, atuam na manutenção da pressão osmótica, no equilíbrio ácido-básico e na permeabilidade das membranas celulares. Dentre outras funções, atuam como catalisadores, seja em processos enzimáticos ou como componentes integrantes de metaloenzimas e vitaminas (TOKARNIA, et al. 2000).

Dos 50 elementos minerais encontrados no organismo, 14 são essenciais nos processos metabólicos. Destes, sete são classificados como macroelementos, por serem necessários em maiores quantidades aos animais, são eles: cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl) e enxofre (S). Os demais são classificados como microelementos, pois os animais necessitam em pequenas quantidades, são eles: ferro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), iodo (I), manganês (Mn), zinco (Zn) e selênio (Se) (TOKARNIA, et al. 2000).

#### 2.1.1 Minerais na alimentação

Os níveis tolerados na dieta para bovinos, seriam para cobre 40 mg/kg, para molibdênio 5 mg/kg, para ferro 500 mg/kg, para enxofre 0,3%, para zinco 500mg/kg e para cobalto 25mg/kg. O nível máximo de cobre tolerado na dieta de bovinos é de 40 mg/kg, desde que os níveis de molibdênio permaneçam entre 1-2 mg /kg na dieta e enxofre entre 0,15 a 0,25% (NRC, 2005).

Gooneratne (1989) verificou que vacas prenhas, com concentração de cobre no fígado abaixo de 25mg/kg<sup>-1</sup> de matéria seca, podem apresentar comprometimento dos processos metabólicos cobre dependentes; os bezerros podem nascer com níveis de cobre no fígado, não adequados para atender suas necessidades metabólicas pós-natal. Ahola em 2004, observou vacas de corte que permaneceram 1 ano sem serem suplementadas com cobre, zinco e manganês, e aponta que essas apresentaram diminuição na taxa de prenhez em IATF (inseminação artificial em tempo fixo), além de alterar o desempenho reprodutivo ao longo da temporada.

A NRC (2005), estima que a porcentagem de absorção do cobre em alimentos frescos e com teores de molibdênio baixos ( $< 2\text{mg/kg}^{-1}$ ), seja de aproximadamente 9 % em cereais, 7,5% em feno, 5% na silagem e de 1,4 a 2,5% em grama.

Um estudo realizado por Machado (2013) aponta que a administração de três doses subcutâneas para suplementação de minerais traços contendo selênio, cobre, zinco e manganês, apresentou impacto positivo tanto em relação à saúde de úbere, (houve diminuição de CCS (contagem de células somáticas) e de mastite subclínica e clínica), quanto em relação à diminuição da incidência de natimortos e endometrites.

Bach (2015) comparou a suplementação mineral, com minerais traço quelados e minerais traço inorgânicos e verificou que vacas suplementadas com minerais quelados tinham menor probabilidade de serem abatidas devido à claudicação, do que vacas suplementadas com fontes inorgânicas. Outro ponto abordado nesse trabalho é que uma substituição parcial das formas inorgânico por formas queladas de Cu, Mn e Zn, apresentaram potencial para melhorar a saúde do casco.

### **2.1.2 Deficiência mineral**

As doenças carenciais mais observadas no Brasil são de fósforo e sódio, seguidos pela deficiência de cobre e cobalto (TOKARNIA, et al. 1999).

Os sinais clínicos manifestados por bovinos que possuem deficiência de P são: diminuição do apetite, diminuição da produção de leite, animais imunocomprometidos, retardo do crescimento, animais magros, com pelos ásperos, baixo rendimento de carcaça, raquitismo, osteomalácia, fraturas frequentes e comumente apresentam osteofagia (hábito de roer ossos). Com esse hábito os animais podem ingerir a toxina do *Clostridium botulinum* e acabar desenvolvendo botulismo (TOKARNIA, 2010).

As manifestações da deficiência de Na são o apetite excessivo por sal, os animais lambem-se e lambem aos outros no intuito de ingerir cloreto de sódio do suor. Animais a campo ingerem terra de barrancos que chegam a formar buracos. Em outros casos é possível observar os animais bebendo urina uns dos outros (TOKARNIA, 2010).

Bovinos com deficiência de Co podem permanecerem longos períodos em pastagens com teores baixos de Co, sem manifestarem sinais clínicos. Quando manifestam esses sinais são caracterizados pelo consumo de cascas de árvores ou pedaços de madeira. Além disso podem apresentar anorexia progressiva, na qual o animal não consome alimento nem com alta

palatabilidade. Pode haver demora no crescimento, perda de peso, com perda da massa muscular abrupta (TOKARNIA, 2010).

## 2.2 COBRE

O cobre é um metal, que possui como característica química a facilidade de oxidação, principalmente quando na forma iônica ( $Cu^+$ ). Ele compõe o sítio ativo de algumas enzimas catalizadoras de reações orgânicas oxidativas (ORTOLANI, 2017).

Este elemento possui várias funções no metabolismo, geralmente relacionadas a metaloenzimas, das quais há duas com maior destaque, em fetos e neonatos, a ceramide galactosil transferase, enzima ligada à síntese de mielina e a lisil oxidase, enzima responsável pela formação de colágeno estrutural, que posteriormente servirá de base para mineralização óssea. O cobre está ligado à produção e qualidade dos pelos, por atuar na queratinização e pigmentação, principalmente em pelos escuros (preto e vermelho), e também está ligado a imunidade. Cordeiros com baixa concentração de cobre são duas vezes mais susceptíveis a infecções, o que ocorre devido à menor capacidade de fagocitose dos leucócitos, ocasionada pela ação de radicais superóxidos desativados pela menor atividade da superóxido-dismutase, uma metaloenzima, além de estar ligado à eritropoiese, intermediado pela ceruloplasmina (ORTOLANI, 2017).

### 2.2.1 Metabolismo do cobre

Ruminantes apresentam menor absorção de cobre, comparado a monogástricos. Isso ocorre, pois no rúmen o  $Cu^{+2}$  é reduzido a  $Cu^{+1}$ , além de haver formação de sulfetos ( $S^{2-}$ ) a partir de sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ), que se ligam ao Cu formando o sulfeto cúprico ( $CuS$ ), o qual não é absorvido (ROSA, 2002).

A maior parte de cobre solúvel é absorvida na porção do intestino delgado, no qual, os enterócitos secretam L-aminoácidos no lúmen, os quais carreiam o cobre para o interior dos enterócitos. A metalotioneína é uma metaloproteína, que tem como função controlar a absorção do cobre, nessa etapa. Quando atinge a corrente sanguínea, se liga à albumina (preferencialmente) até chegar ao fígado, local de armazenamento. Dependendo das necessidades do organismo, o cobre é integrado à ceruloplasmina, uma metaloproteína e então distribuído. A principal via de excreção do cobre é a biliar, para isso é necessário ligar-se a metalotioneína, produzida pelos hepatócitos (ORTOLANI, 2017).

## 2.2.2 Deficiência de cobre em bovinos

A deficiência de cobre (Cu) é uma enfermidade distribuída mundialmente e esta pode ser classificada como primária ou secundária. A deficiência primária é caracterizada pelo baixo consumo do mineral, enquanto na deficiência secundária, a quantidade ingerida é adequada, no entanto a absorção do mineral pelos tecidos é comprometida por antagonistas, tais como o molibdênio, enxofre, ferro e zinco presentes na dieta (ALMEIDA FILHO, 2016; RADOSTITS, 2000; TOKARNIA, 2000). A deficiência de cobre ocorre em animais herbívoros de muitas partes do mundo com diversos tipos de terrenos e climas. Em certas regiões, a deficiência de cobre e cobalto estão associadas, principalmente em terras costeiras áridas e calcárias ou podzólicas de origem granítica (UNDERWOOD, 1981).

Altos níveis de enxofre e molibdênio dietéticos, podem diminuir a disponibilidade de minerais traço, como é o caso do Cu, pois formam sulfetos insolúveis e outros complexos com os oligoelementos. A associação de enxofre e molibdênio no rúmen, em condições de anaerobiose e pH neutro, formam na porção sólida ruminal, os tiomolibdatos, estes se ligam ao Cu, formando tetratiomolibdato de cobre que torna o cobre indisponível para o animal. Os fatores que quanto maiores, mais proporcionam a estabilidade dos tiomolibdatos no rúmen seriam, o pH ruminal, a fibra bruta, a concentração de sulfetos, o número de protozoários e de matéria orgânica não digestível no conteúdo (SUTTLE, 1974; ORTOLANI, 2017; NRC, 2005).

Os sulfetos por si só podem diminuir a utilização do cobre (ORTOLANI, 2017), dietas com altos teores de enxofre de 0,2 a 0,4% podem causar uma redução de 50% do cobre absorvido na dieta. Além disso, quando os valores de enxofre e molibdênio são muito altos, pode ser absorvido pelo organismo em forma de di e tritiomolibdatos. Estes possuem efeitos sistêmicos no metabolismo do cobre, os quais seriam, excretar por via biliar o cobre armazenado no fígado, remover o cobre de metaloenzimas e ligá-lo fortemente à albumina plasmática, reduzindo drasticamente o transporte de cobre disponível para os processos bioquímicos (NRC, 2005; VARQUEZ, 2001). Malafaia e colaboradores (2014) apontam que há maiores riscos em suplementar com enxofre, comparado aos supostos benefícios dessa suplementação. Neste mesmo trabalho, os autores chamam a atenção que não há descrição de deficiência de enxofre em condições normais de criação.

O antagonismo entre cobre e molibdênio foi descoberto quando bovinos que desenvolveram diarreia, retardo de crescimento, anemia e acromotriquia, estavam em pastos com alto teores de molibdênio e os sinais clínicos foram tratados pela administração de cobre (FERGUSON, 1938). O Molibdênio, principalmente na presença de enxofre, tem a capacidade

de diminuir a deposição de cobre no fígado e sintetizar a ceruloplasmina. Como consequência há queda na excreção de Cu pela via biliar e aumento na excreção urinária (VARQUEZ, 2001). Raisbeck et al. (2006) observaram que quando vacas eram suplementadas com moderada quantidade de Cu, podiam pastar em local altamente contaminado com Mo, sem efeitos sobre a saúde geral ou a reprodução. Diferente de outros metais, o molibdênio aumenta a disponibilidade no solo quando o pH deste aumenta, isso ocorre quando esses solos são calcarizados. Outro ponto importante para a disponibilidade do molibdênio no solo é a umidade. Pois em solos mal drenados, há acúmulo de molibdato (forma absorvida pela planta), de tal maneira que podem ocasionar molibdenose em ruminantes (KUBOTA, 1961; VIDOR e PERES, 1988). O aumento de molibdênio no solo, associado ao aumento das necessidades de Cu da planta nesse período e a lixiviação do Cu, explicam as diarréias crônicas por deficiência de cobre (UNDERWOOD, 1999; VARQUEZ, 2001).

O Fe ferroso é outro elemento que em solos alagados, tem aumento da sua disponibilidade (DECHEM E NACHTIGALL, 2007). Pandolfo (2012) avaliou Fe, Zn e Cu em solos cultivados de diferentes regiões de Santa Catarina, e observou níveis altos de Fe nas regiões de Alto Vale do Itajaí e Litoral, e níveis baixos nas regiões de Planalto e Oeste. Os níveis de Cu foram altos nas regiões Oeste e Planalto e baixo nas regiões Litoral e Alto Vale, já os níveis de Zn foram altos em todas as regiões mencionadas.

O ferro diminui a disponibilidade do cobre por meio de competição pelo mesmo sítio ativo de absorção no intestino. Caso ruminantes ingiram 10% da matéria seca de solo rico em Fe junto as pastagens, pode haver uma diminuição de até 1/3 da disponibilidade de Cu (ORTOLANI, 2017). No trabalho realizado por Bremner (1987) se verificou que dietas com alta concentração de Fe associada a alta concentração de enxofre, diminui drasticamente a absorção e armazenamento do cobre. No entanto, não foram observadas alterações clínicas nesses animais e foi constatado que essas alterações são mais evidentes quando aumenta a concentração de molibdênio na dieta. Campbell (1974) verificou diminuição nos níveis de cobre em animais suplementados com hidróxido férrico por 7 meses. Esse mesmo trabalho aponta que os níveis de ferro no solo variam conforme a estação do ano e com a flutuação dos lençóis freáticos, que podem contaminar pastagens e consequentemente diminuem a absorção do cobre pelos animais. Além do antagonismo com o cobre, o ferro reduz a absorção de fósforo pelos animais (Peixoto, 2005). Ressaltando que a forma de Fe ferroso é melhor absorvida pelos animais, cerca de três vezes a mais que o Fe férrico (BOTHWELL, 1970).

Standish (1969) observou que terneiros que ingeriam dose de 1.600 mg/kg de sulfato ferroso, apresentaram redução do cobre plasmático e aumento do fosforo inorgânico, além de

redução do consumo de ração e do ganho de peso diário. Koong et al. (1970) suplementaram bezerros com níveis de ferro entre 100 e 4.000 mg/kg. Os bovinos que receberam acima de 500 mg/kg tiveram menor ganho de peso, além de diarreia quando receberam 4.000mg/kg de ferro.

Em relação ao antagonismo entre zinco e cobre, este é considerado mútuo. Pequenas quantidades de Cu e Zn no plasma podem ser ligadas à metalotioneína, e há evidências de que o Cu desloca o Zn da proteína *in vivo*. Isso poderia resultar em aumento da captação renal e excreção urinária de Cu, como Cu-metalotioneína (BREMNER, 1987; BREMNER, 1995). Em 1976, Bremner verificou que quando administradas doses maiores de zinco para ovinos, estes diminuíram a concentração de cobre no fígado.

Cozzolino (1997) destaca que a vitamina C pode prejudicar a absorção do cobre, devido à redução de Cu<sup>2+</sup> para Cu<sup>+</sup>, que é menos absorvida pelo organismo. Van Den Berg & Beynen (1992) avaliaram os efeitos do ácido ascórbico sobre o metabolismo do cobre e observaram redução da absorção, aumento da captação pelo fígado, assim como da excreção biliar de cobre. Sendo esse efeito, mais acentuado em animais deficientes em cobre.

### **2.2.3 Sinais clínicos de deficiência de cobre em bovinos**

Na deficiência primária por cobre, os animais podem apresentar diminuição na produtividade, anemia em bovinos adultos, pelos ásperos e descorados, principalmente os vermelhos e pretos e também prurido e lambedura. Enquanto na deficiência secundária por cobre, além dos sinais clínicos de deficiência primária, os animais podem apresentar diarreia e sua intensidade varia conforme a quantidade de molibdênio ingerida (SUTTLE, 1976; RADOSTITS, 2000).

A deficiência de cobre pode ser agravada, assim como pode agravar o quadro clínico de outras doenças, como foi observado em búfalos diagnosticados com paratuberculose (BELO REIS, 2016).

Segundo Tokarnia et al. (2000), há correlação entre deficiência de determinados minerais com determinadas áreas geográficas. E a manifestação clínica dessas deficiências podem ser severas, manifestando alterações clínicas umas mais e outras menos características ou podem ser leves, com sinais clínicos não específicos, tais como problemas reprodutivos, baixa produtividade de leite ou de carne e desenvolvimento retardado.

#### **2.2.4 Diagnóstico de deficiência de cobre**

Segundo Tokarnia, et al. (2000) exames hepáticos são eficientes para verificar a condição do animal em relação aos níveis de Cu, Co, Mn, Se e Zn. A quantificação pode ser realizada pela técnica de espectrometria de absorção atômica com amostragem de eletrodos sólidos (SS-ETAAS) ou pela técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP-OES) (BELO REIS, 2016; NOMURA, 2005; NRC, 2005). Levando em consideração que para bovinos, as concentrações adequadas no fígado são: para cobre entre 100 e 300 mg/kg da matéria seca, para ferro entre 180 e 280 mg/kg, para zinco varia entre 100 a 200 mg/kg de matéria seca e para molibdênio entre 2,0 e 4,0 mg/kg (UNDERWOOD, 1977). Para Rosemberger (1975) níveis de Mo abaixo de 2mg/kg não causam intoxicação, entre 2 e 5 mg/kg pode causar intoxicação, mas essa depende da quantidade dos demais elementos e acima de 5 mg/kg certamente haverá intoxicação e interferência principalmente no Cu.

No caso de deficiência de cobre, no exame macroscópico quando há alterações, estas são diretamente ligadas aos sinais clínicos. Pode ser observada palidez de carcaça e vísceras, assim como pigmentos castanhos em linfonodos. Em exames histopatológicos realizados em bovinos com deficiência de cobre, pode se observar hemossiderose em baço, linfonodos e ocasionalmente em fígado e rim (TOKARNIA, 2010).

#### **2.2.5 Suplementação e tratamento para deficiência de cobre**

O cobre suplementar para ruminantes que pastam em áreas com deficiência de cobre tem sido frequentemente fornecido como um sal de cobre misturado com outros compostos minerais e oferecido a animais em pastejo em uma base de livre escolha. Em geral, este tem sido um meio satisfatório de suplementação de cobre; a ingestão variável e às vezes, insuficiente da mistura mineral pode resultar em ingestões inadequadas do elemento. Outras formas de suplementar cobre foram desenvolvidas para diminuir este problema e para fornecer Cu, em situações que este elemento é um limitante de produção (AMMERMAN, 1995).

A suplementação mineral deve ser realizada conforme as necessidades regionais, pois em regiões onde não há deficiência, o fornecimento de diversos minerais não traz benefício algum aos animais, apenas aumento de custo de produção (Peixoto, 2005).

O tratamento para deficiência de Cobre secundária à molibdenose, consiste na administração de sulfato de cobre em altas doses, sendo 2g/dia para bovinos adultos e 1g/dia para animais jovens (FERGUNSON, 1938; LENTZ, 2012).

## 2.3 DEFICIÊNCIA DE COBRE EM BOVINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Em Santa Catarina, a deficiência de Cu foi relatada pela primeira vez por Tokarnia et al. (1971), em bovinos de corte, no qual foram examinados 10 bovinos da região do Alto Vale do Itajaí; destes, nove bovinos apresentaram deficiência de Cu, e todos apresentaram níveis de Co normais. Neste mesmo trabalho foram examinados quatro bovinos, na região Litoral Sul do Estado, dos quais, dois bovinos apresentaram deficiência de cobre, e um bovino subdeficiência deste mineral. Em relação ao cobalto, apenas o bovino que apresentou subdeficiência de Cu, também apresentou subdeficiência de Co; os demais apresentaram níveis normais deste elemento. Abrahão, em 1985, avaliou bovinos de corte na região do Planalto Catarinense, e verificou deficiência de cobre em três das cinco propriedades avaliadas. Em 2012, Lentz avaliou no Estado, seis biópsias hepáticas de bovinos com quadro de diarreia crônica, quatro animais apresentaram deficiência de cobre e dois subdeficiência. Um dos animais com subdeficiência eram do Planalto Norte e os outros cinco bovinos eram do Oeste de Santa Catarina. Em relação ao molibdênio, não foi considerado tóxico, e assim o autor concluiu que os animais podem ter apresentado deficiência de cobre primária ou então deficiência secundária causada por outro elemento antagonista.

### **3. OBJETIVOS**

Avaliar os teores de cobre, assim como seus antagonistas: molibdênio, ferro e zinco, em amostras de fígado de vacas leiteiras das diferentes regiões do estado de Santa Catarina.

Avaliar possíveis lesões histológicas produzidas pela deficiência destes minerais em vacas com aptidão leiteira.

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE Cu, Fe, Zn e Mo EM FÍGADO DE VACAS LEITEIRAS, NAS DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL.**

##### **4.1 RESUMO**

Para bovinos os minerais são elementos essenciais para manutenção do metabolismo e da produtividade. Quando algum elemento é ingerido em baixa quantidade, podem surgir enfermidades que levam a graves prejuízos para a vida dos animais e a perdas econômicas. No Brasil, a maioria dos estudos sobre carências minerais foram realizados principalmente nas regiões Norte e Centro Oeste. Em Santa Catarina a deficiência de cobre foi relatada em bovinos de corte. O presente trabalho teve como objetivo avaliar teores de cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn) e molibdênio (Mo) em fígado de vacas leiteiras de diferentes regiões do estado de Santa Catarina e quantificar hemossiderose em baço, fígado e linfonodo mesentérico dos mesmos animais. Foram coletadas 49 amostras de fígado de vacas leiteiras; destas, 27 da região Oeste de Santa Catarina, 13 do Meio Oeste, cinco do Planalto e quatro do Alto Vale do Itajaí. As amostras foram coletadas em frigoríficos ou, através de necropsias. Fragmentos de baço, fígado e linfonodo mesentérico foram conservados em formalina a 10%. Uma parte do fígado foi congelada. As amostras em formol foram processadas rotineiramente para coloração em hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas em microscópio óptico. Para avaliação dos minerais estudados neste trabalho, os fígados foram descongelados, desidratados, secos até peso constante, triturados e peneirados. A pré-digestão foi realizada com 2 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio e a digestão foi completada em forno micro-ondas (Microwave 3000, Anton Paar, Graz, Austria). A quantificação de Cu, Fe, Zn e Mo, foi realizada em espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP – OES). Na quantificação dos minerais em fígado, a maioria das amostras apresentaram níveis adequados para os elementos estudados. Níveis abaixo dos considerados adequados foram encontrados para Fe (19 vacas – 38,78%) e Cu (4 vacas - 8,16%). Das quatro vacas com deficiências de cobre, duas foram classificadas com deficiência primária e duas com deficiência secundária, sendo nas duas últimas, o antagonismo ocasionado em uma vaca pelo excesso de Fe e na outra pelos níveis elevados de Zn. Na histologia, nos bovinos em que a hemossiderose foi observada em quantidades significativas em baço e/ou linfonodo mesentérico, as lesões foram associadas a níveis elevados de ferro no fígado e não relacionadas à deficiência de cobre.

**Palavras chave:** deficiência mineral, cobre, ferro, zinco, molibdênio, bovinos, hemossiderose.

##### **4.2 ABSTRACT**

For cattle, minerals are essential elements for the maintenance of metabolism and productivity. When some element is ingested in low quantity, diseases can appear that lead to serious damages to the life of the animals and to economic losses. In Brazil, most studies on mineral deficiencies were carried out mainly in the North and Midwest regions. In Santa Catarina, copper deficiency was reported in beef cattle. The objective of this study was to evaluate copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn) and molybdenum (Mo) levels in liver of dairy cows from different regions of the state of Santa Catarina and quantify hemosiderosis in spleen, liver and lymph

node of the same animals. A total of 49 liver samples were collected from dairy cows; of these, 27 from the West region of Santa Catarina, 13 from the Midwest, five from the Plateau and four from the Upper Vale do Itajaí. The samples were collected in refrigerators or, through necropsies. Fragments of spleen, liver and mesenteric lymph node were preserved in 10% formalin. A part of the liver was frozen. The formalin samples were routinely processed for hematoxylin and eosin (HE) staining and evaluated under an optical microscope. To evaluate the minerals studied in this study, the livers were thawed, dehydrated, dried to constant weight, crushed and sieved. Pre-digestion was performed with 2 mL of nitric acid and 2 mL of hydrogen peroxide and the digestion was completed in a microwave oven (Microwave 3000, Anton Paar, Graz, Austria). The quantification of Cu, Fe, Zn and Mo, was performed in plasma optical emission spectrometry (ICP - OES). In the quantification of minerals in the liver, most of the samples presented adequate levels for the studied elements. Levels below those considered adequate were found for Fe (19 cows - 38.78%) and Cu (4 cows - 8.16%). Of the four cows with copper deficiency, two were classified as primary deficiency and two with secondary deficiency, the latter two being the antagonism caused in one cow by excess of Fe and in the other by elevated levels of Zn. In histology, in bovines in which hemosiderosis was observed in significant amounts in spleen and / or mesenteric lymph node, lesions were associated with elevated iron levels in the liver and not related to copper deficiency.

**Keywords:** mineral deficiency, copper, iron, zinc, molybdenum, bovine. hemosiderosis.

#### 4.3 INTRODUÇÃO

Segundo Tokarnia (2000), no Brasil, as doenças carenciais mais comuns são as deficiências dos macroelementos: fósforo (P) e sódio (Na), seguida das deficiências dos microelementos: cobre (Cu) e cobalto (Co). A maioria dos estudos sobre deficiências de minerais no Brasil, foram realizadas nas regiões Centro Oeste e Norte (TOKARNIA, 1988).

O Cu, embora em pequenas quantidades, é um elemento essencial para a manutenção das funções vitais, principalmente devido à sua participação em enzimas Cu-dependentes. Em consequência, a deficiência desse elemento acarreta em sinais clínicos muito diversificados, tais como alterações em pelagem (mais evidente em animais de pelagem preta e vermelha), diarreia, diminuição no desenvolvimento corporal ou até mesmo emagrecimento, diminuição da imunidade, alterações reprodutivas e anemia (ORTOLANI, 2017; RADOSTITS, 2000; SUTTLE, 1976).

A deficiência por Cu pode ser classificada em primária ou secundária. A deficiência primária é caracterizada pelo consumo de baixa quantidade do mineral. Enquanto na deficiência secundária, a quantidade ingerida é adequada, mas a absorção do mineral é comprometida por antagonistas presentes na alimentação em concentrações acima das adequadas. Os principais antagonistas conhecidos para o elemento Cu são: molibdênio, ferro, zinco e enxofre, (RADOSTITS, 2000). O Mo quando em excesso produz carência secundária de Cu, que ocorre

principalmente em bovinos mantidos em solos íngremes e sem suplementação mineral e após longos períodos de chuva (ROSA, 2002; ROSEMBERGER, 1975).

Este trabalho teve como objetivo, avaliar as concentrações de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático de vacas com aptidão leiteira, de diferentes regiões do estado de Santa Catarina, assim como quantificar hemossiderose em baço, linfonodo e fígado dos mesmos animais.

#### 4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.4.1 Área de estudo

Foram coletadas 49 amostras de fígado, baço e linfonodo mesentérico de vacas, com aptidão leiteira em dois frigoríficos, e três amostras (6, 41 e 45) foram coletadas em necropsias. Do total coletado, 27 bovinos são da região Oeste, 13 da região Meio Oeste, quatro Alto Vale do Itajaí e cinco do Planalto (Figura 1).

As vacas foram selecionadas antes do abate e anotado o número dos brincos dos animais e dados do proprietário. Estes dados foram utilizados posteriormente para rastrear a origem dos animais, visando o contato com o produtor para a obtenção de informações sobre alimentação e suplementação mineral.

Figura1. Mapa do estado de Santa Catarina e suas respectivas regiões, nas quais foram realizadas as coletas das amostras de fígado, baço e linfonodo mesentérico de vacas leiteiras.



Fonte: Wikipédia, 2018 – adaptado pelo autor.

Amostras de fígado, baço e linfonodo mesentérico foram coletadas na linha de abate, com auxílio de faca inoxidável, armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados e acondicionadas em caixas de isopor com gelo. Posteriormente, segmentos de fígado, baço e linfonodo foram conservados em formalina a 10% e parte do fígado foi acondicionado em sacos plásticos e congelados em freezer com temperaturas abaixo de 0°C. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética de Uso Animal CEUA-CAV/UDESC e protocolado nº5036160418.

#### 4.4.2 Quantificação de minerais

Ao término das coletas, as amostras foram descongeladas, desidratadas em micro-ondas doméstico (Consul), pesadas, secadas em estufa de fluxo contínuo com temperatura média de 65 °C durante 3 dias. Foram realizadas pesagens diárias, até obter-se peso constante das amostras.

As amostras foram trituradas em liquidificador doméstico, peneiradas em peneira de 0,6 micra e então armazenadas em sacos plásticos identificados e fechados. Esses foram guardados em caixa plástica com sílica, para conservação das amostras.

Para digestão foram utilizados 0,5 g de fígado triturado, 2 mL de ácido nítrico PA 65% (REATEC) e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (MERCKE). As amostras ficaram durante 24h em contato com ácido nítrico e 12 h com o peróxido de hidrogênio, para uma pré-digestão e liberação de gás (USEPA 3051A). Para finalizar a digestão, foram colocadas por um período de 40 minutos, em um sistema fechado de radiação em micro-ondas (Microwave 3000; Anton Paar, Graz, Áustria). Após, foi adicionada água deionizada até completar 15 mL de solução.

Para controle dos procedimentos, foram realizadas triplicatas de todas as amostras e em cada bateria de digestão foram utilizadas: uma amostra referenciada: RM-Agro E3001a: Tecido animal (Bovine liver) Embrapa e duas provas em branco para posterior cálculo do limite de detecção instrumental dos elementos Cu, Fe, Zn e Mo.

No total foram utilizadas 10 provas em branco. As provas em branco foram utilizadas para o cálculo do limite de detecção qualitativo (LDQ). Para o cálculo foi utilizada a equação  $LDQ = (M \pm t \times s)$  (APHA, 2005), onde a média das provas em branco foram (M) somadas à multiplicação do *t-student* com intervalo de confiança de 99% com os desvios padrão (s) das amostras em branco.

As quantificações foram realizadas em espectrometria de emissão óptica com plasma – ICP-OES. Optima 8000® (Perkin Elmer). As condições de quantificação foram as indicadas

pelo fabricante. Os valores de recuperação da amostra referenciada podem ser observados na Tabela 1.

Para interpretação dos valores analíticos de Cu, Fe, Zn, e Mo em fígado bovino, seguiu-se a classificação de Underwood (1977), usada também por Tokarnia (1999), onde para Cu, valores menores que  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , foram classificados como deficientes, valores entre 51 e 100  $\text{mg/kg}$  como subdeficientes, de 101 a  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  como níveis adequados e acima de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  em excesso. Para os valores analíticos de Fe, considerou-se normal valores entre 180 e  $380 \text{ mg kg}^{-1}$ . Para o elemento Zn foram considerados níveis adequados, valores entre 101 e 200  $\text{mg kg}^{-1}$  e valores normais de Mo níveis entre 2 e  $4 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Tabela 1. Teores médios e porcentagem de recuperação obtidos após digestão de fígado da amostra referenciada RM-Agro E3001a: Tecido animal (Bovine liver) Embrapa pelo Método USEPA 3051 A.

Elementos	Cu	Fe	Zn	Mo
Média ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	207	146,3	121,3	3,00
Valores de Referência ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	232,7	200	175,9	4,07
Recuperação (%)	88,8	73,2	69	73,8
LDQ	0,051	0,191	0,085	0,020

Fonte: elaborada pelo autor, 2019

#### 4.4.3 Histopatologia

As amostras conservadas em formalina a 10% foram clivadas e processadas rotineiramente para coloração em hematoxilina e eosina (HE). Para avaliação de hemossiderose nos respectivos órgãos, foi utilizada a classificação preconizada por Tokarnia (1998), onde “+++” indica lesão acentuada, “++” lesão moderada, “+” lesão leve, “(+)” lesão discreta e “-” ausência de lesão.

#### 4.5 RESULTADOS

Os dados analíticos foram agrupados por região nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, nas quais pode-se observar as quantificações individuais dos minerais avaliados (Cu, Fe, Zn e Mo), além da quantificação de hemossiderose em baço e linfonodo. Na histologia, os fígados não apresentaram lesões de hemossiderose.

Na Tabela 6, foram copilados todos os resultados das amostras estudadas, de acordo com a concentração dos minerais, sendo estas classificadas em baixa, adequada ou elevada, conforme classificação de Underwood (1977).

Na Tabela 7, foram copilados os dados regionais dos animais avaliados neste trabalho para os teores dos minerais estudados, assim como dos diferentes graus de intensidade de lesão de hemossiderose,

Tabela 2. Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região Meio Oeste de Santa Catarina.

Prop.	Núm.	Coleta	Teores				Hemossiderose	
			Cu	Fe	Zn	Mo	Baço	Linf.
<b>mg kg<sup>-1</sup></b>								
20	28	26/01/18	171,30	173,00	126,50	2,31	+	-
20	29	26/01/18	307,82	143,53	129,21	2,49	-	-
20	30	26/01/18	283,85	145,63	114,13	3,02	+	-
20	31	26/01/18	326,34	210,79	116,73	3,67	-	(+)
21	32	26/01/18	154,37	223,95	115,90	1,03	+	++
22	33	02/02/18	331,74	267,41	117,89	3,00	+++	(+)
22	34	02/02/18	439,89	422,31	177,65	3,09	+++	+++
23	35	23/02/18	200,65	401,85	137,78	3,09	+++	-
24	36	23/02/18	244,69	142,58	117,26	2,33	+	-
25	37	23/02/18	263,39	353,83	113,84	2,98	++	-
26	38	23/02/18	207,50	250,06	147,78	3,00	++	-
27	39	23/02/18	68,03	555,94	102,95	< NDQ	+++	-
27	40	23/02/18	673,82	281,69	191,36	2,32	-	+++
		M	282,56	274,82	131,46	2,53		
		s	150,00	126,60	26,34	0,86		
		CV%	53,27	46,07	20,04	34,00		

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 3. Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região Oeste de Santa Catarina.

Prop.	Nº	Coleta	Teores				Hemossiderose	
			Cu	Fe	Zn	Mo	Baço	Linf
<b>mg kg<sup>-1</sup></b>								
1	1	26/01/18	137,73	363,32	176,76	2,52	++	(+)
1	2	26/01/18	194,49	405,59	129,24	2,72	+++	(+)
1	3	26/01/18	166,60	395,71	152,82	3,43	+++	++
1	4	26/01/18	162,37	653,16	164,81	2,81	+++	++
1	5	26/01/18	203,67	590,13	153,38	1,90	+++	+
2	6	20/02/18	519,05	323,68	247,63	2,85	+++	+++
3	7	23/02/18	309,65	158,53	98,34	2,67	-	+
3	8	23/02/18	37,83	301,73	288,53	3,11	+++	+
4	9	23/02/18	278,84	200,03	126,67	3,31	+	-
5	10	23/02/18	322,82	135,50	127,54	3,18	-	++
6	11	23/02/18	455,70	343,74	121,31	2,84	+++	+++
7	12	23/02/18	630,06	156,92	220,70	3,00	-	-
8	13	09/03/18	351,09	484,41	426,84	1,71	+++	-
9	14	09/03/18	285,62	326,39	112,87	2,70	++	-
10	15	09/03/18	109,48	198,80	147,13	2,51	-	-
11	16	09/03/18	442,54	124,73	140,63	2,66	-	-
12	17	09/03/18	244,38	513,93	161,12	2,17	+++	+
13	18	09/03/18	223,33	259,73	115,33	2,56	++	-
14	19	09/03/18	226,15	237,03	96,92	2,62	+++	+++
14	20	09/03/18	442,38	152,84	119,58	2,72	++	+
15	21	09/03/18	407,52	111,65	195,39	2,92	-	+++
16	22	09/03/18	125,67	214,29	93,75	2,77	+	-
17	23	14/06/18	146,29	96,15	104,03	1,53	-	-
18	24	14/06/18	137,21	374,86	153,12	2,62	++	-
19	25	14/06/18	232,97	152,15	107,82	3,28	+	-
19	26	14/06/18	260,52	166,22	145,01	2,83	++	-
19	27	14/06/18	292,27	245,00	145,42	2,49	++	-
			M	272,08	284,67	158,25	2,68	
			s	139,47	150,43	70,76	0,45	
			CV%	51,26	52,84	44,71	16,80	

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 4. Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região Planalto de Santa Catarina.

Prop.	Núm.	Coleta	Teores				Hemossiderose	
			Cu	Fe	Zn	Mo	Baço	Linf.
$\text{mg kg}^{-1}$								
28	41	14/12/17	256,00	184,80	109,70	2,85	-	-
29	42	02/02/18	202,16	152,73	112,16	3,53	-	-
29	43	02/02/18	405,18	174,98	114,07	2,00	+++	++
30	44	02/02/18	178,31	156,68	115,18	4,25	+	-
31	45	06/06/18	46,86	177,85	93,33	1,07	(+)	-
		M	217,71	169,40	108,90	2,74		
		s	130,00	13,95	8,94	1,25		
		CV%	59,71	8,24	8,21	45,71		

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 5. Teores de cobre, ferro, zinco e molibdênio em tecido hepático e grau de hemossiderose em baço e linfonodo de vacas leiteiras, da região do Alto Vale do Itajaí - Santa Catarina.

Prop.	Núm.	Coleta	Teores				Hemossiderose	
			Cu	Fe	Zn	Mo	Baço	Linf.
$\text{mg kg}^{-1}$								
32	46	26/01/18	134,02	222,95	137,43	1,91	+++	(+)
33	47	26/01/18	89,54	252,65	139,87	2,99	+	++
34	48	02/02/18	118,86	120,21	112,96	2,80	++	++
35	49	09/03/18	235,46	151,85	133,55	2,04	-	-
		M	144,47	186,91	130,95	2,44		
		s	63,41	61,37	12,27	0,54		
		CV %	43,89	32,83	9,37	22,10		

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 6. Quantidade e porcentagem de animais com valores: baixo, adequado e em excesso dos minerais Cobre, Ferro, Zinco e Molibdênio, no estado de Santa Catarina.

Mineral	Baixo		Adequado		Excesso	
	Quant	%	Quant	%	Quant	%
<b>Cobre</b>	4	8,16	30	61,22	15	30,61
<b>Ferro</b>	19	38,78	21	42,86	9	18,37
<b>Zinco</b>	4	8,16	41	83,67	4	8,16
<b>Molibdênio</b>	7	14,29	41	83,67	1	2,04

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

Tabela 7. Número de animais com as diferentes intensidades dos minerais estudados e de hemossiderose, nas respectivas regiões do estado de Santa Catarina.

		Teores				Hemossiderose			
		Intens	Cobre	Ferro	Zinco	Mo	Intens	Baço	Linfonodo
<b>Oeste</b>	Bx	1	9	3	3	3	-	7	14
	Adeq	17	12	20	24		(+)/+	3	6
	Exc	9	6	4	0		++	7	3
	M	272,08	284,67	158,25	2,68		+++	10	4
<b>Meio Oeste</b>	Bx	1	4	0	2	2	-	3	8
	Adeq	7	6	13	11		(+)/+	4	2
	Exc	5	3	0	0		++	2	1
	M	282,56	274,82	131,46	2,53		+++	4	2
<b>Planalto</b>	Bx	1	4	1	1	1	-	2	4
	Adeq	3	1	4	3		(+)/+	2	0
	Exc	1	0	0	1		++	0	1
	M	217,71	169,4	108,89	2,74		+++	1	0
<b>Alto Vale</b>	Bx	1	2	0	1	1	-	1	1
	Adeq	3	2	4	3		(+)/+	1	1
	Exc	0	0	0	0		++	1	2
	M	144,47	186,91	130,95	2,44		+++	1	0

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

#### 4.6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a avaliação dos minerais (Cu, Fe, Zn e Mo) no tecido hepático de vacas leiteiras, mostram valores variáveis (ver Tabela 6). Na maioria dos fígados avaliados ficou constatado que os níveis desses minerais se encontram em níveis adequados, quando comparados aos preconizados por Underwood (1977).

Os níveis de Cu, em sua maioria foram adequados (61,22 %), ou, acima destes (30,61%). A deficiência deste mineral foi observada em apenas 4 vacas (8,16 %), uma em cada região avaliada. Os baixos níveis desse mineral ( $37,83 \text{ mg kg}^{-1}$  – vaca nº 8 - Região Oeste e  $68,02 \text{ mg kg}^{-1}$  – vaca nº 39 – Região Meio Oeste) podem estar relacionados ao antagonismo exercido pelos níveis elevados de Zn ( $288,53 \text{ mg kg}^{-1}$  – vaca nº 8) e de Fe ( $555,94 \text{ mg kg}^{-1}$  – vaca nº 39). A deficiência de Cu observada nas vacas nº 45 (Região do Planalto) e nº 47 (Região do alto Vale do Itajaí), possivelmente estão relacionadas à carência primária. O animal 45 durante o período seco foi mantido em campo nativo, sem suplementação com grãos de cereais.

Hill (1970) constatou, nas situações em que os animais que receberam dietas com teores baixos de Cu, a suscetibilidade ao Zn foi muito maior. Teores de 200 - 400  $\text{mg kg}^{-1}$  de Zn na

dieta, induziram a sinais clínicos de deficiência de Cu. Indo de acordo com os valores encontrados no presente trabalho no animal nº 8 que apresentou Cu baixo e Zn em excesso.

Para o Fe, de acordo com Underwood (1977), a maioria dos animais (42,86%), encontravam-se em níveis adequados ( $180 - 280 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Níveis elevados (acima de  $280 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram encontrados em 18,37 % das vacas. Valores abaixo dos níveis normais (menores que  $180 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram encontrados em fígados de 19 vacas (38,78%). Embora o número de vacas com níveis de ferro abaixo de  $180 \text{ mg kg}^{-1}$  tenha sido significativo, os valores encontram-se dentro ou próximos aos valores considerados marginais por Underwood (1999). Considerando a região de origem das vacas, observa-se que as vacas oriundas do Planalto Serrano tem valores de Fe abaixo dos valores adequados (Tabela 7). Pandolfo (2012) observou níveis baixos de Fe em solos cultivados na mesma região. Dessa forma é muito provável que os níveis de Fe disponíveis nas forrageiras desta região não esteja dentro do adequado, justificando os níveis observados. Também deve ser levado em consideração o tipo de alimentação fornecida a vacas produtoras de leite. Estas geralmente recebem alimentos oriundos de pastagens cultivadas e tomam água em bebedouros. Nesta situação o ferro geralmente está em concentração mais baixa, ao contrário do observado em bovinos de corte (MORAES, 1999). Isto pode ser explicado pelo fato de que bovinos de corte geralmente pastejam em gramíneas mais baixas e tomam água de locais variáveis (açudes, córregos, poças), o que favorecem a ingestão de solo rico em ferro.

Em relação aos níveis de Zn, a maioria dos animais (83,67%) apresentaram níveis dentro do adequado ( $101 - 200 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Valores em excesso ( $>200 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram observados em quatro vacas (8,16%). Valores abaixo dos níveis normais ( $<100 \text{ mg kg}^{-1}$ ), segundo Underwood, (1977), foram observados em quatro amostras de fígado, no entanto todas estão próximas ao valor limítrofe.

Para Mo, a maioria das amostras (83,67%) tiveram as concentrações dentro dos níveis adequados ( $2 - 4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou abaixo deste (14,29%). Na literatura não foi encontrado relato, sobre deficiência de molibdênio em bovinos. Isto se justifica, devido o requerimento diário desse mineral ser baixo (UNDERWOOD, 1981). Apenas uma vaca (vaca nº 44 - 2,04% - Região Planalto), teve Mo em excesso ( $4,25 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Apesar deste valor ser considerado alto, não houve carência dos demais minerais avaliados (Cu, Fe, Zn). De acordo com Rosemberger, (1975), teores de Mo acima de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  são tóxicos para ruminantes e influenciam na absorção de Cu, ocasionando deficiência secundária deste e, como consequência, em bovinos, produz diarreia crônica que ocorre em bovinos mantidos em solos com alto declive após chuvas intensas e é conhecida como molibdenose. Em Santa Catarina essa doença tem sido

diagnosticada na primavera, em gado de corte não suplementado com mineral, que permanece em terreno íngreme e em períodos de chuva intensa (LENTZ, 2012). Em vacas leiteiras essa enfermidade não é observada, possivelmente porque essas são alimentadas com grãos de cereais e suplementadas com sal mineral, onde os valores de Cu são maiores.

Através da avaliação histológica observou-se hemossiderose no baço e/ou linfonodo, de intensidade moderada a acentuada em 26 vacas (53,06 %) e baixa ou, ausente em 23 (46,94 %) das amostras avaliadas. Tokarnia et al, (2010) citam a hemossiderose no baço, linfonodo e eventualmente no fígado e rim, como um achado frequente em animais com deficiência de cobre. Neste estudo, verificou-se que a maioria das vacas com hemossiderose, em quantidade moderada a alta está relacionada a animais com níveis de Fe normais a altos e níveis de Cu adequados ou elevados. Das quatro vacas que mostraram baixos níveis de cobre, três (vaca nº 8, 39 e 45) tiveram hemossiderose alta, associada a níveis de Fe adequados ou altos. Em apenas uma vaca (nº 45), que apresentou Cu e Fe em níveis baixos (46,86 e 177,85 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente), na qual a hemossiderose foi discreta no baço.

#### 4.7 CONCLUSÃO

A maioria das amostras de fígado de vacas leiteiras do estado de Santa Catarina, avaliadas no presente estudo, tiveram valores adequados para Cu, Fe, Zn e Mo.

A deficiência de Cu foi observada em 8,16% das vacas avaliadas e o Fe foi o mineral com maior número de amostras (38,78%) com níveis abaixo do considerado adequado (<180 mg kg<sup>-1</sup>).

A hemossiderose, nas vacas de leite avaliadas, quando observada em quantidades significativas no baço e linfonodo mesentérico foi relacionada a concentrações elevadas de Fe e pode ser utilizada como ferramenta para avaliação deste mineral através de exames histológicos.

## REFERÊNCIAS ARTIGO

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. USA: United Book Press, Inc. Baltimore, Maryland. 2005.

BRASIL. IBGE. **Censo Agropecuário**, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6783>>. Acessado em: 28 nov. 2018.

GIPP, E.F. et al. Effect of Dietary Copper, Iron and Ascorbic Acid Levels on Hematology, Blood and Tissue Copper, Iron and Zinc Concentrations and Cu and Fe Metabolism in Young Pigs. **Journal of Nutrition**, v. 104, p. 532-541, 1974.

HILL, C. H. e MATRONE G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. **Federation Proceedings**. v. 29, n. 4, p. 1474-1481, julho/agosto, 1970.

LENTZ, D. Deficiência De Cobre Como Causa De Enfermidade Sazonal Em Bovinos No Estado De Santa Catarina. 2012. 51p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina- Santa Catarina, 2012.

MORAES, S.S.; TOKARNIA, C.H. e DOBEREINER, J. Deficiência e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 19, n. 1, p. 19-33, jan./mar. 1999.

ORTOLANI, E. F. Macroelementos e Microelementos. In: SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia Aplicada à medicina veterinária**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap. 60.

PANDOLFO, C. M., VEIGA, M., SPAGNOLLO, E. Macro e micronutrientes no solo em lavouras amostradas no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 11, n. 1, p. 7-16, 2012.

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**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1737 p.

ROSA, D. E.; MATTIOLI, G. A. Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. **Analecta Veterinaria Journal**, v. 22, n. 1, p. 7-16, 2002. Disponível em: <[http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol22n1/051\\_VE22n1\\_rosa\\_metabolismo\\_cobre.pdf](http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol22n1/051_VE22n1_rosa_metabolismo_cobre.pdf)>. Acessado em: 20 ago. 2018.

ROSENBERGER, G. **Mallatie Del Bovino**. Piacenza: Essegivi, 1975. 1385 p.

SUTTLE, N.F. e ANGUS, K.W. Experimenta copper deficiency in the calf. **Journal of Comparative Pathology**. v.86, p. 595-608, 1976.

TOKARNIA, C.H. et al. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos em algumas regiões do brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 6, p. 61-77, 1971.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. e MORAES, S.S. Situação atual e perspectiva da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 8, n. ½, jan./jun., 1988.

TOKARNIA, C.H. e DOBEREINER, J. Sobre o “ronca”, doença de etiologia obscura em bovinos, caracterizada por respiração ruidosa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 18, n. ¾, jul./dez., 1998.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; MORAES, S. S.; PEIXOTO, P. V. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos – revisão dos estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 47-62, abr./jun. 1999

TOKARNIA, C. H., DOBEREINER, J. e PEIXOTO, P. V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 20, n. 3, p. 127-138, jul./set., 2000.

TOKARNIA, C.H. et al. **Deficiência Minerais em Animais de Produção**. Rio de Janeiro: Heliabthus, 2010. 200 p.

UNDERWOOD, E. J. **Trace Elements in Human and Animals Nutrition**. 4. ed. New York: Academic Press, 1977.

UNDERWOOD, E. J. **Los minerales em la nutrión de ganado**. Espanã: Acribia Zaragoza: 1981. 210 p.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of Livestock**. 3. ed. New York: CABI Publishing, 1999. 614 p.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ABRAHÃO, J.J. dos S. Estudo de Minerais. In: RITTER, W. e SORRENSEN, W.J. **Produção de Bovinos no Planalto de Santa Catarina, Brasil.** Eschborn, Alemanha: GTZ, 1985. Cap. 6.4.

AHOLA, J.K. et al. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. **Journal Animal Science:** v.82, p. 2375-2383, 2004.

ALMEIDA FILHO, S.L. **Minerais para ruminantes.** Uberlândia: EDUFU, 2016. 138 p.

AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals** – Amino acids, Minerals, and vitamins. California: Academic Press, 1995. 441p.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. USA: United Book Press, Inc. Baltimore, Maryland. 2005.

BACH, A.; PINTO, A.; BLANCH, M. Association between chelated trace mineral supplementation and milk yield, reproductive performance, and lameness in dairy cattle. **Livestock Science**, v. 182, p. 69–75, 2015.

BELO REIS, A.S. et al Teores de cobre, zinco e ferro no fígado de búfalos (*Bubalus bubalis*) com paratuberculose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n.1, p. 24-28, jan. 2016.

BRASIL. IBGE. **Censo Agropecuário**, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6783>>. Acessado em: 28 nov. 2018.

BREMNER, I.; YOUNG, B.W.; MILLS, C.F. Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep. **British Journal Of Nutrition**, v. 36, p. 551-561, 1976.

BREMNER, I. et al. Iron-induced copper deficiency in calves: dose-response relationships and interactions with molybdenum and sulphur. **Animal Science**, v. 45, n. 3, p. 403-414, Dez. 1987.

BREMNER, I.; BEATTIE, J. H. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.54, p. 489-499, 1995.

BOTHWELL, T. H. e CHARLTON, R. W. Asortion Of Iron. **Annual Review of Medicine.** v.21, p.145-156, 1970.

CAMPBELL, A. G. et al. Effect of elevated iron intake on the copper status of grazing cattle. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 17, n. 4, p. 393-399, 1974.

COZZOLINO, S.M. F. BIODISPONIBILIDADE DE MINERAIS. **Revista De Nutrição Campinas**, v.10, n. 2, p. 87-98, jul./dez., 1997 1997

DECHEM, A.R.; NACHTIGALL, G.R.A. Elementos requeridos à nutrição das plantas. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.) **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.91-132.

FERGUSON, W.S.; LEWIS, A.H.; WATSON, S. J. Action of Molybdenum in Nutrion of Milki the cattle. **Nature Publication Group**, v. 26, n. 3569, p. 553, March, 1938.

GIPP, E.F. et al. Effect of Dietary Copper, Iron and Ascorbic Acid Levels on Hematology, Blood and Tissue Copper, Iron and Zinc Concentrations and Cu and Fe Metabolism in Young Pigs. **Journal of Nutrition**, v. 104, p. 532-541, 1974.

GOONERATNE, S.R.; CHRISTENSEN, D. A. A Survey Of Maternal Copper Status And Fetal Tissue Copper Concentrations In Saskatchewan Bovine. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 69, p. 141-150, Mar. 1989.

HILL, C. H. e MATRONE G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. **Federation Proceedings**. v. 29, n. 4, p. 1474-1481, jul./ago., 1970.

KOONG, L.J., WISE, M.B., BARRICK, E.R. Effect of elevated dietary levels of iron on the performance and blood constituents of calves. **Journal of Animal Science**. V.31, p. 422-427, 1970.

KUBOTA, J. et al. The relations of soils to molybdenum toxicity in cattle in Nevada. **Journal Soil Science Society America**. v. 25, p.227-232, mai. 1961.

LENTZ, D. Deficiência De Cobre Como Causa De Enfermidade Sazonal Em Bovinos No Estado De Santa Catarina. 2012. 51p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina- Santa Catarina, 2012.

MACHADO, V.S. et al. Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows. **The Veterinary Journal**, v.197, p. 451–456, 2013.

MALAFIA, P. et al. Equívocos arraigados no meio pecuário sobre deficiências e suplementação minerais em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 244-249, març. 2014.

MORAES, S.S.; TOKARNIA, C.H. e DOBEREINER, J. Deficiência e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 19, n. 1, p. 19-33, jan./mar. 1999.

MILLS, C.F. Comparative studies of copper, molybdenum and sulphur metabolism in the ruminant and the rat. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.19, p. 162-169, 1960

NRC 2005. Mineral Tolerance of Animals. 2ed. National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, DC. 496p.

NOMURA, C. S. Bovine liver sample preparation and micro-homogeneity study for Cu and Zn determination by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 60, p. 673– 680, 2005.

ORTOLANI, E. F. Macroelementos e Microelementos. In: SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia Aplicada à medicina veterinária**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap. 60.

PANDOLFO, C. M., VEIGA, M., SPAGNOLLO, E. Macro e micronutrientes no solo em lavouras amostradas no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 11, n. 1, p. 7-16, 2012.

PEIXOTO, P.V. et al. Princípios de suplementação mineral em ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, n. 3, p. 195-200, jul-set. 2005.

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**.9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1737 p.

RAISBECK, M. F., SIEMION, R. S., SMITH, M. A. Modest copper supplementation blocks molybdenosis in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 18, p. 566–572, 2006.

ROSA, D. E.; MATTIOLI, G. A. Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. **Analecta Veterinaria Journal**, v. 22, n. 1, p. 7-16, 2002. Disponível em: <[http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol22n1/051\\_VE22n1\\_rosa\\_metabolismo\\_cobre.pdf](http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol22n1/051_VE22n1_rosa_metabolismo_cobre.pdf)>. Acessado em: 20 ago. 2018.

ROSENBERGER, G. **Mallatie Del Bovino**. Piacenza: Essegivi, 1975. 1385 p.

STANDISH, J.F. et al. Influence of Graded Levels of Dietary Iron, as Ferrous Sulfate, on Performance and Tissue Mineral Composition of Steers, **Journal of Animal Science**. v. 29, n. 3, p.496-503, Sept. 1969.

SUTTLE, N.F. Recent studies of the copper-molybdenum antagonism. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 33, p. 299-305, 1974.

SUTTLE, N.F. e ANGUS, K.W. Experimental copper deficiency in the calf. **Journal of Comparative Pathology**. v.86, p. 595-608, 1976.

TOKARNIA, C.H. et al. Deficiências de cobre e cobalto em bovinos e ovinos em algumas regiões do brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 6, p. 61-77, 1971.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. e MORAES, S.S. Situação atual e perspectiva da investigação sobre nutrição mineral em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 8, n. ½, jan./jun., 1988.

TOKARNIA, C.H. e DOBEREINER, J. Sobre o “ronca”, doença de etiologia obscura em bovinos, caracterizada por respiração ruidosa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 18, n. ¾, jul./dez., 1998.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; MORAES, S. S.; PEIXOTO, P. V. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos – revisão dos estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 47-62, abr./jun. 1999

TOKARNIA, C. H., DOBEREINER, J. e PEIXOTO, P. V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 20, n. 3, p. 127-138, jul./set., 2000.

TOKARNIA, C.H. et al. **Deficiência Minerais em Animais de Produção**. Rio de Janeiro, Heliabthus, 2010. 200 p.

UNDERWOOD, E. J. **Trace Elements in Human and Animals Nutrition.** 4. ed. New York: Academic Press, 1977.

UNDERWOOD, E. J. **Los minerales em la nutrión de ganado.** Espanã: Acribia Zaragoza: 1981. 210 p.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of Livestock.** 3. ed. New York: CABI Publishing, 1999. 614 p.

VAN DEN BERG, G. J. & BEYNEN, A. C. Influence of ascorbic acid supplementation on copper metabolism in rats. **British Journal of Nutrition.** v.68, p. 701-715, 1992.

VARQUEZ, E. F. A., HERRERA, A. P. N., SANTIAGO, S. G. Interação Cobre, Molibdênio E Enxofre Em Ruminantes. Ciêncie Rural, Santa Maria, v. 31, n. 6, p.1101-1106, 2001.

VIDOR, C. e PERES, J.R.R. Nutrição das plantas com Molibdênio e Cobalto. In: XVII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo, 1986. Paraná. **ANAIIS ENXOFRE E MICRONUTRIENTES NA AGRICULTURA BRASILEIRA.** Paraná: EMBRAPA, 1988, p. 179 – 203.