UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA MARIA CONSENTINO CONTI

**Efeitos de fontes orgânicas de cobre e enxofre sobre a
interação cobre, molibdênio e enxofre na alimentação de
ovinos**

Pirassununga
2014

RENATA MARIA CONSENTINO CONTI

**Efeitos de fontes orgânicas de cobre e enxofre sobre a
interação cobre, molibdênio e enxofre na alimentação de
ovinos**

(VERSÃO CORRIGIDA)

Tese apresentada à Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade
e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcus
Antônio Zanetti

Pirassununga
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

Conti, Renata Maria Consentino

C762e Efeitos de fontes orgânicas de cobre e enxofre sobre
a interação cobre, molibdênio e enxofre na alimentação
de ovinos / Renata Maria Consentino Conti. --
Pirassununga, 2014.

84 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Aos meus pais **João Divino Breves Consentino** e **Marilda Ruggeri Vieira Consentino** pelo incansável esforço na formação de seus filhos. A vocês meu eterno amor e respeito

DEDICO

Aos meus irmãos **Rodrigo José Consentino** e **Ricardo José Consentino** pela amizade e cumplicidade

AGRADEÇO

Ao meu esposo **Mauricio Oliveira Conti** e meus filhos **Gabriel Consentino Conti** e **Mariana Consentino Conti** pela compreensão da minha ausência, pela força e motivação

OFEREÇO

Agradecimentos

Agradeço à Deus pelo dom da vida, pela saúde, por ser luz na minha vida para que eu pudesse cumprir mais esta etapa.

Ao Prof. Dr. Marcus Antônio Zanetti que como um pai, prontamente me aceitou como orientada e me deu todo suporte necessário para que eu pudesse desenvolver esse trabalho com tranquilidade. Pelos ensinamentos, gratidão.

Ao Prof. Dr. Arlindo Saran Netto e Dra. Márcia Saladini Vieira Salles pelo incentivo e ajuda, obrigada.

A Profa. Dra. Catarina Abdalla Gomide pela amizade que sempre demonstrou e pelas longas conversas que sempre me ajudaram. Obrigada por seus ensinamentos e amizade.

Aos demais professores da FZEA que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Paulo Henrique Mazza Rodrigues pelo auxílio e prontidão com conselhos pertinentes.

Aos Professores Dr. Enrico Lippi Ortolani e Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior que na qualificação me ensinaram muito e contribuíram para a realização desta tese, forte amplexo.

Aos servidores do Laboratório de Minerais, Dr. José Aparecido da Cunha e Ms. Roberta da Silva de Sousa Santana pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Ao veterinário José Carlos Guilardi Pacheco pela realização das cirurgias de biópsias e pelo acompanhamento da saúde dos animais do experimento.

Aos servidores da Fábrica de Ração, do Abatedouro, do Fistulado e da Secretaria de Pós Graduação, meu especial agradecimento.

As colegas do VNP/FMVZ, Simi, Ana Flávia, Flávio, Gilmar, Ari, Gilson, Fábria, Alessandra, Zeca, Lucinéia, João Paulo, Lourdes, Lúcia e Schmidt que comigo trabalham e convivem. Obrigada pelo incentivo, paciência e longas conversas.

Ao Fundo de Amparo a Pesquisa Do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do referido projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo para que eu pudesse concluir meus créditos e período experimental.

As amigas Flávia A. Urvaneja de Moraes e Érica Elias Baron que apesar da distância, sempre estiveram presentes. Obrigada pela amizade.

Aos amigos Jaqueline e Popô, Cristiane e Glécio, Marina e Fabrício, Valéria e Eduardo, Carolina e Giráia, Kelly e Wanderlei pelos momentos de descontração e amizade.

Aos amigos Brenda Barcellos, Gabriela Benetel, Cármen M. L. P Garrine, Carolina Yumi C. Yoshikaw, Janaína S. da Silva, Lísia B. Corrêa, Thiago C. Dias (Ruffus), Laurinda Augusto, Katiele Welter e Mikaele, pela amizade e ajuda prestada.

Aos colegas João Lucon, Samuel, Gabriel, Vinicius (Jurema), Marina pelo auxílio durante o período experimental.

A toda minha família, Rodrigo, Ricardo, Renata e Agnieszka pelo incentivo e Maria (Neguinha), Eduardo, João, Marilda pelo incondicional apoio e ajuda na criação dos meus filhos.

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este projeto e minha formação.

“ Nesta escola o Governo do Estado vos proporciona os meios de vencer na vida. O vosso sucesso depende, porém, de esforço e de persistência no estudo e no trabalho. Lembrai-vos de que na vida só o indivíduo pode lançar os alicerces da própria felicidade.”

FERNANDO COSTA

RESUMO

CONTI, R.M.C. **Efeitos de fontes orgânicas de cobre e enxofre sobre a interação cobre, molibdênio e enxofre na alimentação de ovinos.** 2014. 86f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos que as fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre possuem na interação cobre-enxofre-molibdênio, estimando a biodisponibilidade de duas fontes de cobre na dieta de ovinos. Para isso, foram utilizados 40 ovinos desmamados, com aproximadamente 3 meses e peso médio 20 kg, distribuídos em 10 tratamentos, sendo: 1) dieta basal; 2) dieta basal contendo 10 mg de molibdênio/kg de MS; 3) dieta basal + 10 mg cobre inorgânico/kg de MS + 0,2% enxofre inorgânico/kg de MS; 4) dieta basal + 10 mg cobre inorgânico/kg de MS + 0,2% enxofre orgânico/kg de MS; 5) dieta basal + 10 mg cobre orgânico/kg de MS + 0,2% enxofre inorgânico/kg de MS; 6) dieta basal + 10 mg cobre orgânico/kg de MS + 0,2% enxofre orgânico/kg de MS; 7) dieta com 10 mg molibdênio + 10 mg cobre inorgânico/kg de MS + 0,2% enxofre inorgânico/kg de MS; 8) dieta com 10 mg molibdênio + 10 mg cobre inorgânico/kg de MS + 0,2% enxofre orgânico/kg de MS; 9) dieta com 10 mg molibdênio + 10 mg cobre orgânico/kg de MS + 0,2% enxofre inorgânico/kg de MS; 10) dieta com 10 mg molibdênio + 10 mg cobre orgânico/kg de MS + 0,2% enxofre orgânico/kg de MS. O experimento teve duração total de 84 dias, sendo realizadas pesagens dos animais nos dias 1, 28, 56 e 84 dias para acompanhamento do desenvolvimento. Foram realizadas também coletas sanguíneas para estudo de teores de cobre, enxofre e molibdênio sanguíneos, teores de glicose, albumina, ureia, colesterol, triglicerídeos, hematócrito e ceruloplasmina. Foram realizadas biópsias do fígado no tempo zero para análises de cobre, enxofre e molibdênio. Ao término do período experimental os animais foram abatidos e colheu-se amostras de fígado e líquido biliar para determinação final dos teores de minerais, bem como acompanhamento do pH e peso das carcaças quente e fria. No terço final do período experimental foi realizado um balanço metabólico para cobre, enxofre e molibdênio, sendo a biodisponibilidade do cobre calculada pela técnica “slope ratio”, utilizando-se os

teores de cobre hepático. Os parâmetros foram analisados considerando-se a existência de uma estrutura de tratamento fatorial $2 \times 2 \times 2$ (com e sem molibdênio, cobre orgânico e inorgânico e enxofre orgânico e inorgânico) e uma dieta basal e uma basal mais molibdênio, em delineamento inteiramente casualizado. As concentrações de glicose, albumina, ureia, colesterol e hematócrito sanguíneos não sofreram efeito ($P > 0,05$) pela adição de molibdênio ou adição de cobre e enxofre, ou pela interação cobre-enxofre-molibdênio. Entretanto as concentrações de triglicerídeos sanguíneos foram alteradas ($P < 0,05$) pela interação cobre-enxofre, mostrando redução na sua concentração quando da adição de cobre e enxofre nas fontes orgânicas. O peso vivo dos ovinos não foi influenciado ($P > 0,05$) pelos tratamentos, porém o ganho de peso foi influenciado pela interação cobre-enxofre-molibdênio onde se observou redução no ganho de peso com a adição de molibdênio exclusivo e aumento no ganho de peso quando adicionado molibdênio com cobre e enxofre nas fontes orgânicas quando comparados com as fontes inorgânicas. A suplementação de fontes de cobre e enxofre e adição de molibdênio não influenciaram ($P > 0,05$) os valores de pH e peso das carcaças. A presença de molibdênio na dieta diminuiu os teores de ceruloplasmina e a presença e molibdênio exclusivo reduziu as concentrações de cobre no soro dos ovinos, bem como a interação cobre-enxofre-molibdênio com as fontes inorgânicas dos minerais reduziu a ceruloplasmina e cobre no soro. Em contrapartida, a ceruloplasmina mostrou aumento nos níveis quando da administração de enxofre orgânico. Os teores de enxofre sanguíneos não foram influenciados pelos tratamentos. No líquido biliar constatou-se efeito do molibdênio exclusivo sobre os minerais, mostrando redução nas concentrações de cobre e enxofre e aumento na concentração de molibdênio. Os valores hepáticos de cobre e enxofre não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos tratamentos, somente o molibdênio hepático mostrou efeito na interação cobre-enxofre-molibdênio. A biodisponibilidade do cobre proteinado (145,09%) foi superior à do sulfato de cobre (100%), independente da fonte de enxofre e na ausência e molibdênio, quando determinado pela regressão múltipla “slope ratio”.

Palavras chave: biodisponibilidade , ceruloplasmina, suplementação mineral.

ABSTRACT

CONTI, R.M.C. **Effects of organic sources of copper and sulfur on interaction copper, molybdenum and sulfur in sheep feeding** . 2014. 86f. PhD thesis-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

This research aim to study the effect of organic and inorganic copper and sulfur sources in the interaction copper-sulfur-molybdenum, estimating the bioavailability of two sources of copper in the diet of sheep. For that used 40 weaned sheep at about 3 months of age and weighing 20 kg and distributed in 10 treatments, as follows: 1) basal diet; 2) diet containing molybdenum; 3) basal diet + copper inorganic + sulfur inorganic; 4) basal diet + copper inorganic + sulfur organic; 5) basal diet + copper organic + sulfur, inorganic; 6) basal diet + copper organic + sulfur organic; 7) diet with molybdenum + copper inorganic + sulfur inorganic; 8) diet with molybdenum + copper inorganic + organic sulfur; 9) diet with molybdenum + copper organic + sulfur inorganic, 10) diet with molybdenum + organic copper + organic sulfur. The experimental period lasted 84 days, animal weighing was performed on days 0, 28, 56 and 84 days to monitor its development. Blood collections to study levels of copper, sulfur and molybdenum, concentrations of glucose, albumin, urea, cholesterol, triglycerides, hematocrit and ceruloplasmin were also performed. Liver biopsies were made on zero day for copper, sulfur and molybdenum analysis. At the end of the experimental period, the animals were slaughtered and samples were collected from liver and bile fluid for final determination of mineral, and was measured pH and weight of hot and cold carcasses. At the end of the third experimental period was done a metabolic balance of copper, molybdenum and sulfur. The bioavailability of copper was calculated by "slope ratio" technique, using the concentration of copper in the liver. The parameters were analyzed considering the existence of a factorial structure 2 x 2 x 2 (with and without molybdenum, organic and inorganic copper and organic and inorganic sulphur) and a basal diet and a basal diet plus molybdenum. The concentrations of glucose, albumin, urea, cholesterol and blood hematocrit levels were not affected ($P>0,05$) by the addition of molybdenum or adding copper and sulfur,

or the copper-molybdenum-sulfur interaction. However, blood triglyceride concentrations were changed ($P < 0.05$) by copper-sulfur interaction, with a reduction in their concentration after the addition of copper and sulfur in organic sources. The live weight of the sheep was not affected ($P > 0.05$) by the treatments, but the weight gain was influenced by the interaction copper-molybdenum-sulfur there was a reduction in weight gain with the addition of molybdenum and an increase was observed in the weight gain when added with copper and molybdenum in the organic sulfur sources compared to the inorganic sources. The supplemental sources of copper and sulfur and addition of molybdenum had no effect ($P > 0.05$) on pH values and carcass weight. The presence of molybdenum in the diet reduced the levels of ceruloplasmin and the exclusive molybdenum presence reduced copper concentrations in the serum of the sheep. The copper-molybdenum-sulfur interaction with the inorganic sources of minerals decreased serum ceruloplasmin and copper. On the other hand, there was an increase in ceruloplasmin levels with organic sulfur administration. The blood levels of sulfur were not affected by treatments. Bile liquid was affected by molybdenum, it was a reduction in the concentrations of copper and sulfur with increase in the molybdenum concentration. The copper and sulfur liver levels were not influenced ($P > 0.05$) by treatments, only the liver Molybdenum effect showed on copper-molybdenum-sulfur interaction. The bioavailability of organic copper (145.09%) was higher than that of copper sulphate (100%), irrespective of the source and in the absence and sulfur and molybdenum, as determined by multiple regression slope ratio.

Keywords: bioavailability, ceruloplasmin, mineral supplementation.

Lista de Figuras

Figura 1- Biópsia cirúrgica de fígado em ovinos	36
Figura 2 – Sutura da biópsia cirúrgica de fígado em ovinos	37

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição percentual dos ingredientes da dieta experimental, na matéria seca, fornecida aos ovinos na dieta controle	33
Tabela 2 – Composição bromatológica da dieta experimental (100% MS).....	34
Tabela 3 – Teores de cobre, molibdênio e enxofre nos tratamentos (em mg/kg)	40
Tabela 4 – Concentrações de glicose, em mg/dL, no plasma de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	41
Tabela 5– Concentrações de albumina, em g/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.	42
Tabela 6– Concentrações de uréia, em mg/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.	43
Tabela 7 – Concentrações de colesterol, em mg/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre	45
Tabela 8 – Concentrações de triglicerídeos, em mg/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	46
Tabela 9 – Concentrações de hematócrito, em porcentagem, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre	48
Tabela 10 – Peso vivo dos ovinos, em kg, por período experimental, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.	50
Tabela 11 – Ganho de peso diário dos ovinos, em kg, por período experimental, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre	51
Tabela 12 – Valores de pH e peso de carcaça quente e fria, em kg	54
Tabela 13–Valores de ceruloplasmina, em U/L em animais recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	56
Tabela 14 – Teores de cobre no soro, em mg/kg, nos ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	58
Tabela 15 – Teores de enxofre no soro, em mg/kg, nos ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre	59
Tabela 16 – Teores de molibdênio no soro, em mg/kg, nos ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre	61
Tabela 17 – Concentrações de cobre, molibdênio e enxofre, em mg/kg, no líquido biliar de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	62

Tabela 18 – Concentrações de cobre, molibdênio e enxofre, em mg/kg, no fígado ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	65
Tabela 19 – Balanço metabólico de cobre em ovinos, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	68
Tabela 20 – Balanço metabólico de molibdênio em ovinos, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	70
Tabela 21 – Balanço metabólico de enxofre em ovinos, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.....	71

Lista de Gráficos

Gráfico 1–Níveis médios de triglicerídeos no soro de ovinos na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre.....	47
Gráfico 2 – Valores médios de ganho de peso diário, em kg, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre.....	52
Gráfico 3 – Valores médios de ganho de peso diário, em kg, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre, com ou sem a inclusão de molibdênio...	52
Gráfico 4 – Valores médios de ceruloplasmina (U/L) com 84 dias experimentais, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre.....	57
Gráfico 5 – Valores médios de enxofre, em mg/kg, com 84 dias experimentais, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre no soro de ovinos....	60
Gráfico 6 – Valores médios de cobre no líquido biliar de ovinos, em mg/kg, na interação Mo x S.....	63
Gráfico 7 – Valores médios de molibdênio no líquido biliar de ovinos, em mg/kg, na interação Mo x Cu.....	64
Gráfico 8 – Concentração de cobre no fígado em mg/kg MS para fontes orgânicas e inorgânicas, independente da fonte e enxofre, sem a presença de molibdênio.....	72
Gráfico 9 – Concentração de cobre no fígado em mg/kg MS para fontes orgânicas e inorgânicas, independente da fonte de enxofre, na presença de molibdênio.	73

Lista de Abreviaturas

Cu – Cobre

Cu_i – Cobre com fonte inorgânica (sulfato de cobre)

Cu_o – Cobre com fonte orgânica (cobre proteinado)

S – Enxofre

S_i – Enxofre com fonte inorgânica (flor de enxofre)

S_o – Enxofre com fonte orgânica (enxofre-proteinado)

Mo – Molibdênio

MS – Matéria seca

MM – Matéria mineral

EE – Extrato etéreo

FDN – Fibra em detergente neutro

FDA – Fibra em detergente ácido

Ca – Cálcio

P – Fósforo

PB – Proteína bruta

GDP – Ganho de peso diário

kg – Quilo

mg – Miligrama

L - Litro

dL - Decilitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. A importância dos minerais	18
2.2. Cobre	19
2.3. Enxofre	22
2.4. Molibdênio	23
2.5. Minerais orgânicos e inorgânicos	24
2.6. Interação cobre - molibdênio - enxofre	25
2.7. Parâmetros Bioquímicos	29
3. OBJETIVO	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Animais, tratamentos e instalações	32
4.2 Dietas Experimentais dos Animais	33
4.3 Análises Bromatológicas	34
4.4 Amostra de Sangue	34
4.5 Ganho de peso	35
4.6. Biópsia cirúrgica	35
4.7. Balanço metabólico	37
4.8. Abate	38
4.9 Biodisponibilidade	39
4.10. Análise Estatística	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Análise de minerais nas dietas	40
5.2. Análises Bioquímicas	40
5.3. Resultados de desempenho	49
5.4 Ceruloplasmina	54
5.5. Minerais no soro	57
5.6. Minerais no líquido biliar	61
5.7. Minerais no fígado	64
5.8. Balanço metabólico de minerais	67
5.9. Biodisponibilidade	72
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil cresceu principalmente nas regiões norte, nordeste e sudeste. O Brasil apresentou 16.811.721 cabeças e produção de 80.000 toneladas de carne em 2009, sendo o 19º maior produtor de ovinos no mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2012). Segundo o IBGE (2014) a região sudeste é o 4º produtor de ovinos no Brasil com 762.133 cabeças e destaque para o Estado de São Paulo com 452.291 cabeças.

O estudo em genética e melhoramento se intensificou nos últimos anos na criação de ovinos, envolvendo caracterização, criação e cruzamentos com novas tecnologias (McMANUS et al., 2010), mas a nutrição animal ainda é um grande desafio no sentido de aumentar a produção em rebanhos economicamente viáveis e principalmente em animais melhorados geneticamente, com crescimento muito rápido. Muito se fala do importante papel dos minerais na alimentação desses animais, pois estão vinculados a diversos fatores, sendo seu estudo complexo devido principalmente às diversas interações existentes.

Estudos recentes apresentam respostas positivas quando da inclusão dos minerais não na sua forma inorgânica, mas sim através de fontes orgânicas, principalmente em ruminantes. Neste sentido fontes orgânicas vêm sendo estudadas não somente como fatores de melhoria no desempenho e saúde animal, mas também na melhoria do metabolismo e interação dos mesmos, refletindo na biodisponibilidade desses minerais e seus benefícios para os animais, bem como a propagação desses benefícios na alimentação humana.

Através desse pressuposto, o trabalho visou estudar interação do cobre, enxofre e molibdênio na alimentação de ovinos utilizando fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre e a biodisponibilidade de cobre nesses animais através de parâmetros sanguíneos e hepáticos para que a nutrição animal evolua.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A importância dos minerais

Os minerais têm sido identificados como componentes essenciais na dieta de espécies domésticas para sua sobrevivência (BAKER et al., 2003), pois exercem diversas funções no organismo animal, estando presentes na estrutura dos tecidos, atuando em atividades hormonais como iodo, ou cofatores enzimáticos como cobre e magnésio (GONZÁLEZ, 2000), ou de forma funcional para a atividade de enzimas como molibdênio, selênio e zinco e nas vitaminas como cobalto (BERCHIELLI et al., 2006). Participam também no equilíbrio ácido base e na manutenção da pressão osmótica (GONZÁLES, 2000), interagindo com outros nutrientes e entre si, tornando seu estudo complexo (BRIZOLA e ZANETTI, 1999).

Os minerais podem se apresentar complexados com proteínas sendo as proteínas conjugadas distribuídas em seis grupos, glicoproteínas, fosfoproteínas, nucleoproteínas, lipoproteínas, cromoproteínas e metaloproteínas. Nas cromoproteínas encontramos ceruloplasmina, composta por cobre e nas metaloproteínas a tirosinase com cobre e a xantina oxidase com molibdênio (BACILA, 2003).

Dietas deficientes, não balanceadas ou com excesso de minerais podem alterar a forma e a concentração dos minerais nos tecidos ou fluídos corporais, e em alguns casos lesões hepáticas ou renais podem ocorrer (McDOWELL, 2003).

As deficiências dos minerais podem se apresentar severas ou leves, com sintomas geralmente não específicos, podendo causar problemas de fertilidade, redução no rendimento de carcaça e diminuição na produção (TOKARNIA et al., 2000).

A não suplementação mineral conforme as exigências nutricionais em ruminantes pode causar distúrbios metabólicos e com isso queda no desempenho produtivo dos animais. Quanto maior a taxa de crescimento,

maiores as quantidades exigidas, portanto as exigências de minerais são dependentes do nível de produtividade (BERCHIELLI et al., 2006).

Em sistema extensivo normalmente os animais não recebem suplementação mineral ou recebem em quantidades limitadas. Dessa maneira, os animais dependem das concentrações de minerais contidos nas forrageiras, as quais não satisfazem as necessidades animal para algum macro e/ou micro minerais, pois existem no Brasil deficiências de alguns minerais no solo em determinadas regiões (BERCHIELLI et al., 2006), como o fósforo em 70% das amostras e cobre em 82%.

Portanto somente as plantas forrageiras não são capazes de satisfazer as exigências de minerais dos animais, havendo necessidade de suplementação adequada (BERCHIELLI et al., 2006).

Várias estratégias podem ser adotadas para atender as necessidades dos animais, como a inclusão de minerais na ração, no concentrado, no suplemento mineral ou mesmo injetável.

Pesquisas têm o intuito de reduzir os níveis dos minerais na dieta, visando diminuir os custos de produção e também a excreção de elementos inorgânicos para o meio ambiente, sem prejudicar o desempenho produtivo dos animais (BERCHIELLI et al., 2006). Também se tem dado bastante ênfase na utilização de minerais orgânicos, que além de poderem diminuir as perdas pelas fezes e urina, podem evitar as interações indesejáveis a que estão sujeitas as fontes inorgânicas.

Vários fatores podem alterar as respostas das suplementações minerais, como duração, forma e concentração do suplemento mineral, estado fisiológico do animal, fatores ambientais, estresse e minerais antagonistas (BAKER, 2003).

2.2. Cobre

A maior concentração de cobre no organismo se encontra no fígado, sendo que em ovinos sua concentração aumenta com o crescimento (ANDRIGUETTO et al., 2002). Animais jovens apresentam maior absorção de

cobre quando comparados com animais adultos, sendo que de 5 a 10% do cobre na dieta é absorvido por animais adultos enquanto que em animais jovens a absorção pode chegar a 70% (NRC, 2007).

A absorção do cobre ocorre no trato intestinal, o transporte através do plasma e o armazenamento no fígado. A rota de excreção é a biliar (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992), onde pode ser detectada sua concentração (BACILA, 2003).

A eficiência na absorção do cobre varia entre raças de ovinos (SUTTLE, 2012) e o valor de cobre hepático serve como parâmetro para avaliação nutricional dos animais em relação a este mineral (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992), refletindo a eficiência dessa absorção (SUTTLE, 2012).

Em bovinos, o tecido hepático contém de 100 a 400 mg de cobre por kg/MS e no sangue observa-se valores de 0,5 a 1,5 micrograma por mL (LUCCI, 1997). Segundo Kerr (2003) as concentrações plasmáticas de cobre em animais é 0,95 a 1,91 µg/mL.

Em média trabalha-se com 10 mg/kg na ração, sendo necessário níveis maiores quando o teor de molibdênio é elevado (LUCCI, 1997). Para ovinos, a concentração máxima tolerada é de 15 mg Cu/kg de MS na dieta, (NRC, 2005). Segundo Andriguetto et al. (2002), os níveis de cobre diário para ovinos está entre 5 e 7 mg/kg de dieta.

Em ovinos existe uma proximidade entre os níveis desejados de cobre e o nível de toxicidade, bem como uma dependência do nível de molibdênio na dieta (BERCHIELLI et al., 2006). Os distúrbios metabólicos de cobre em ruminantes é normalmente a ingestão inadequada (KERR, 2003).

Animais a pasto apresentam baixa ingestão de cobre e podem apresentar grande ingestão de molibdênio (LUCCI, 1997), pois as forragens tem concentração limitada de cobre para as exigências de ruminantes (BERCHIELLI et al., 2006).

No plasma encontra-se um complexo cobre-proteína denominado ceruloplasmina (p-fenile-nodiaminaoxidase) (ANDRIGUETTO et al., 2002), sendo uma globulina responsável pelo transporte de cobre no plasma e pela regulação da absorção e distribuição do mineral (BACILA, 2003). O cobre também é constituinte de enzimas como citocromo oxidase, tirosinase, superóxido dismutase, dopamina-beta-hidroxilase (DIAS & PERRY, 1982) e

catalase. Facilita a absorção do ferro e sua mobilização para formação de hemoglobina, participa na pigmentação dos pêlos e lã e mineralização dos ossos (ANDRIGUETTO et al., 2002). E está envolvido com o metabolismo do sistema imune (BAKER, 2003) e síntese de proteínas com função enzimática (LUCCI, 1997).

A atividade sérica da ceruloplasmina é um indicador indireto da concentração sérica de cobre, quanto menor a concentração de cobre, menor a atividade da ceruloplasmina (BORGES et al., 2005).

Altos níveis de cálcio, enxofre, ferro, zinco ou molibdênio podem reduzir a absorção do cobre. Outras dietas e fatores ambientais podem influenciar a absorção de cobre incluindo agentes como aminoácidos e citratos que aumentam a absorção (McDOWELL, 2003).

Ingestão de altas concentrações de cobre normalmente não alteram as concentrações plasmáticas de cobre, pois este é estocado no fígado. Contudo, com elevados níveis de cobre no fígado, este pode eventualmente liberar repentinas doses de cobre na circulação sanguínea (KERR, 2003) e está frequentemente associado ao estresse, como vacinações e colheitas de sangue. Com o rápido aumento de cobre sanguíneo pode haver lise direta das hemácias (THRALL et al., 2006), icterícia e hemoglobinúria (LUCCI, 1997).

A deficiência ou a toxicidade de cobre depende da concentração de cobre na dieta e da concentração de minerais antagonistas que interferem na sua absorção (GOONERATINE et al., 1989), a quantidade de molibdênio na dieta pode ser aumentada para compensar os efeitos tóxicos de cobre em ovinos (HENRY & MILES, 2000), sendo que a deficiência de cobre pode se manifestar quando houver alto teor de molibdênio, baixa relação cobre e molibdênio (2:1), deficiência de cobre (menos que 5 ppm) ou níveis normais de cobre e molibdênio, mas alta proteína solúveis (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992).

Segundo Gould e Kendall (2011) a toxicidade de cobre-tiomolibdatos podem ser erroneamente confundida com deficiência de cobre.

Os sintomas da deficiência de cobre em ovinos são semelhantes aos bovinos como perda de peso, atraso na puberdade, nascimento de cordeiros com incoordenação (KERR, 2003), diminuição na produção de leite, diarreias severas, perda de coloração dos pêlos, ossos frágeis, fraturas nas costelas, fêmur e úmero, problemas reprodutivos e anemia (LUCCI, 1997).

Pelo exposto, pode-se verificar que o cobre tem uma importância muito grande na nutrição animal, principalmente na de ruminantes criados a pasto no nosso país. Além disso, deve ser ressaltado que o cobre tem sido pesquisado recentemente como elemento capaz de alterar a biohidrogenação dos ácidos graxos no rúmen, e, por conseguinte, capaz de alterar os produtos dos ruminantes: carne e leite, tornando-os mais saudáveis, ou seja, com menores proporções de ácidos graxos saturados (ENGLE, 2010).

2.3. Enxofre

O enxofre é um dos elementos mais abundantes na natureza, porém a escassez de aminoácidos sulfurados na alimentação animal pode ser um problema (McDOWELL, 2003).

As proteínas contêm enxofre, pois este mineral está presente nos aminoácidos sulfurados como metionina, cisteína e cistina (BERCHIELLI et al., 2006), podendo ainda ser encontrado em vitaminas do complexo B como tiamina e biotina (LUCCI, 1997), hormônios, condroitina, taurina e heparina, sendo que o enxofre no organismo animal totaliza 0,2% (ANDRIGUETTO et al., 2002).

Deficiências de enxofre podem ocorrer em dietas com o uso de nitrogênio não proteico, como ureia ou dietas com silagem de milho, pois esta forragem é pobre neste mineral (LUCCI, 1997), sendo nestes casos importante a suplementação com enxofre, onde a relação indicada de enxofre e nitrogênio é 1:12 (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992) e até 1:15 (LUCCI, 1997). O enxofre inorgânico pode ser uma alternativa, uma vez que microrganismos ruminais o utilizam para a síntese de aminoácido sulfurado.

Os sintomas de deficiência de enxofre, podem se confundir com a deficiência de proteína, pois os animais apresentam perda de apetite, perda de peso, fraqueza, menor produção de lã e/ou perda de lã (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992).

Na suplementação de enxofre utiliza-se flor de enxofre ou enxofre ventilado, sulfato de potássio ou sulfato de sódio como fonte de enxofre inorgânico (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992).

Para ovinos, a concentração máxima tolerada 0,30% de S/kg de MS em dietas com mais de 85% de concentrado (NRC, 2005).

Em pastagens nativas do Rio Grande do Sul encontra-se média de 0,09% de enxofre na matéria seca, não atingindo dessa maneira as necessidades dos ovinos, que pode variar de 0,13 a 0,18%(CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992).

2.4. Molibdênio

O molibdênio é um mineral essencial para animais, sendo que os tecidos contém baixas quantidades. O fígado e os rins são os órgãos que apresentam maiores quantidades do mineral. Sua absorção ocorre no trato intestinal e sua secreção é pela via urinária (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992).

O molibdênio é antagonista ao cobre no organismo, ou seja, altos níveis de molibdênio aumentam as exigências de cobre. Caso os níveis de cobre no organismo sejam baixos, menores quantidades de molibdênio se tornarão tóxicas (LUCCI, 1997).

As taxas normais de molibdênio encontradas no fígado estão entre 1 a 4 mg/kg da matéria seca e nos músculos de 0,05 a 0,1 mg/kg/MS (ANDDRIGUETTO et al., 2002).

Sabe-se que aumento nos níveis de molibdênio no fígado, diminui a síntese de ceruloplasmina, tornando o cobre não disponível. O molibdênio em altos níveis interfere também no metabolismo energético (ANDDRIGUETTO et al., 2002).

O molibdênio está envolvido na atividade de flavoproteínas enzimáticas como xantina oxidase (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992), sendo que a deficiência de molibdênio em ovinos pode produzir cálculos renais de xantina (ANDRIGUETTO et al., 2002).

Pastagens com níveis de molibdênio acima de 20mg/kg MS podem ser tóxicos para ovinos (ANDRIGUETTO et al., 2002).

Para ovinos, a concentração tolerada é de 05 a 10 mg de Mo/kg de MS na alimentação quando considerado os níveis adequados de cobre (NRC, 2005).

2.5. Minerais orgânicos e inorgânicos:

Os minerais inorgânicos são encontrados principalmente na forma de sulfatos, carbonatos, cloretos e óxidos (BAKER, 2003), sendo que os sulfatos apresentam maior disponibilidade biológica (LUCCI, 1997) enquanto a forma orgânica geralmente são íons metálicos ligados a aminoácidos ou complexo de proteína.

De acordo a com AAFCO (2000) os minerais orgânicos são classificados em quelato metal aminoácido, complexo metal aminoácido, complexo metal aminoácido específico, metal proteinado e complexo metal-polissacarídeo.

A utilização de sais orgânicos na dieta de ruminantes visa aumentar a disponibilidade dos minerais no trato digestório (PEIXOTO et al., 2010). Segundo Baruselli (2008) os minerais orgânicos possuem maior absorção, maior retenção no organismo e, portanto, maior capacidade de promover os efeitos desejáveis da suplementação quando comparados com os minerais inorgânicos.

Existe maior tolerância para fontes orgânicas que para as inorgânicas de enxofre, sendo que a parede do rumem é impermeável a este mineral (LUCCI, 1997).

A suplementação de 40 mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato fornecido a bovinos mostrou maior acúmulo deste mineral no fígado quando comparado com o fornecimento de Cu inorgânico (CORREA, 2010).

Em estudo com cobre proteinado e sulfato de cobre, Kincaid et al. (1986) observaram aumento no status de cobre em bezerros alimentados com dietas com alto teor de molibdênio (3,1 mg/kg) e baixa concentração de cobre (2,8 mg/kg). Os bezerros alimentados com cobre proteinado mostraram mais cobre

no plasma e no fígado quando comparado com os animais alimentados com sulfato de cobre, sendo os valores de 0,87 mg/L e 0,75 mg/L respectivamente no sangue e 325 e 220 mg/kg respectivamente no fígado.

Existe a premissa de que minerais orgânicos são protegidos das interações que podem prejudicar a absorção de minerais (HEMKEN in BAKER, 2003; SPEARS, 1996), além de possuírem característica de estabilidade (AAFCO, 2000) e maior biodisponibilidade que fontes inorgânicas (SPEARS, 1996; AAFCO, 2000), entretanto, HEMKEN & HARMON (1996) não observou efeito algum com fontes orgânicas, havendo necessidade de mais pesquisas, principalmente para estudar os efeitos benéficos dos minerais orgânicos nas interações minerais.

2.6. Interação cobre - molibdênio - enxofre

Biodisponibilidade é definido como o grau de um nutriente de uma determinada fonte que é absorvida e utilizada no metabolismo animal (AMMERMAN *et al.*, 1995), portanto, a biodisponibilidade de um mineral pode variar em diferentes fontes (Mc DOWELL, 1999).

Várias interações entre minerais têm sido documentada, como zinco-ferro, cobre-enxofre, cobre-molibdênio, cobre-ferro, e cobre-molibdênio-enxofre (BAKER, 2003). O enxofre, selênio e molibdênio também são bastante interligados. Um excesso de consumo em um deles pode modificar o requerimento dos outros (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992).

As interações entre minerais podem ser classificadas como diretas ou indiretas. As diretas ocorrem quando existe competição entre os minerais no processo de absorção intestinal ou utilização pelos tecidos, as interações indiretas ocorrem quando a deficiência ou excesso de um mineral traz mudanças hormonais ou danos nos tecidos que afetam o metabolismo de outro mineral ou quando um mineral está envolvido no metabolismo do outro. (COUZY *et al.*, 1993). As interações pode ser classificadas também como positivas ou sinérgicas e negativas ou antagônicas.

A deficiência de cobre pode estar relacionada com a concentração de cobre na dieta ou com a concentração de minerais antagonistas que interferem na absorção e consequentemente em processos metabólicos (GOONERATNE et al, 1989). Reações antagonistas podem ocorrer no trato digestório, sendo a mais simples a formação de um complexo insolúvel entre os minerais. Ao nível celular também podem ocorrer processos antagonistas com a formação de compostos insolúveis (HENRY & MILES, 2000).

Segundo Dick (1975) o mecanismo na formação de tiomolibdato no rumem se inicia com os sulfatos sendo reduzidos a sulfetos através da ação de microrganismo. O molibdato satura-se com as moléculas de sulfeto formando os mono, di, tri ou tetratiomolibdatos (SUTTLE, 1991) que inibem o metabolismo do cobre (MILTIMORE e MASON, 1971), pois quanto maior a quantidade de enxofre na molécula, maior sua capacidade de ligar-se ao cobre livre (SUTTLE, 1991) e na sequência ocorre a formação de cobre-tiomolibdatos que são altamente insolúveis (VÁSQUEZ *et al.*, 2001) e indisponíveis para absorção (GALBRAITH et al, 1997).

A formação de mono e di-tiomolibdatos no rumem são reversíveis e dependentes da temperatura e pH (GOULD & KENDALL, 2011), podendo ocorrer na fase líquida ou sólida (GALBRAITH et al, 1997). Os tri ou tetratiomolibdatos são irreversíveis (SUTTLE, 1991). Essas reações são impulsionadas pela disponibilidade de molibdênio e sulfureto. O oxigênio é substituído pelo enxofre (GOULD & KENDALL, 2011).

A interação cobre – molibdênio – enxofre, devido ao aumento de molibdênio e enxofre na alimentação produz um efeito negativo sobre a utilização do cobre (SUTTLE, 1974; DICK, 1975), pois reduz a absorção e utilização do cobre (GOONERAME, 1989; SUTTLE, 1991). Mesmo o enxofre ou molibdênio sozinhos podem ter efeito antagonista na absorção do cobre (BAKER, 2003), sendo que a ingestão elevada de molibdênio pode levar a deficiência fisiológica de cobre, devido a formação no rúmen de um complexo cobre-molibdênio que não pode ser quebrado e absorvido (WARD, 1978). Em ruminantes, existe o efeito antagônico do enxofre sobre o cobre, quando associado a níveis mínimos de molibdênio (POTT *et al.*, 1999).

Quanto maior a quantidade de molibdênio ministrada, maior o efeito adverso sobre a absorção do cobre, esse efeito dependerá menos da quantidade de enxofre (LUCCI, 1997)

Em dieta com níveis adequados de cobre, alto consumo de molibdênio e enxofre podem provocar um acúmulo de cobre nos rins e maior excreção desse mineral (CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992; SUTTLE, 1991).

Em regiões com forrageiras que apresentam alto teor de molibdênio, é necessário fornecer cobre em níveis 3 a 5 vezes maior para combater a toxicidade do molibdênio (BERCHIELLI et al., 2006). Apenas 3 mg/kg de molibdênio reduz em 50% a disponibilidade do cobre e 0,4% de enxofre apresenta o mesmo efeito (McDOWELL, 1999).

Moraes et al. (1994) observaram que mesmo em pastagens com níveis adequados de cobre para bovinos, porém, com altas concentrações de molibdênio e enxofre, os animais apresentaram deficiência hepática de cobre. A explicação estaria relacionada a interação cobre – molibdênio - enxofre.

O molibdênio e o enxofre são os principais antagonistas do cobre (HUMPHRIES et al., 1983), molibdênio e enxofre diminuem o depósito de cobre nos órgãos e a síntese de ceruloplasmina (VÁSQUEZ *et al*, 2001). Segundo Suttle (1975) existe possibilidade de que o enxofre orgânico não tenha participação no efeito antagonista do cobre-molibdênio, porém, em experimento com enxofre orgânico e inorgânico observou que ambos tiveram papel similar no efeito antagonista do cobre- molibdênio- enxofre.

Em experimento com ovinos, Suttle (1974) observou que as concentrações de cobre reduziram com o aumento da inclusão de enxofre na dieta destes animais, tanto na forma orgânica quanto inorgânica. A mesma redução de cobre foi encontrada em ovelhas quando incluída dietas ricas de enxofre e associados a níveis pobres de molibdênio por aumentar a concentração ruminal de sulfeto (SUTTLE, 1991)

Trabalhando com bovinos, Ward et al. (1996) observaram que o cobre orgânico apresentou maior disponibilidade com o aumento dos níveis de molibdênio na dieta, apresentando maior vantagem no efeito antagonista destes minerais.

Segundo Baker (2003), outros componentes da dieta podem impedir ou melhorar a absorção de minerais. As proteínas são exemplo dessa interferência no metabolismo, através do enxofre contido nos aminoácidos.

O aumento de cobre na dieta reduz o depósito de molibdênio no fígado e quando o nível de enxofre aumenta a excreção de molibdênio eleva-se e o depósito nos tecidos diminui (VÁSQUESZ *et al.*, 2001).

Em experimento com fontes orgânicas e inorgânicas de enxofre em bovinos, Saran Netto (2006) observou efeito antagônico do enxofre sobre o cobre sanguíneo, independente da fonte de enxofre, porém as fontes de enxofre orgânicas (carboquelato e metionina) apresentaram menor acúmulo de enxofre no fígado. A redução de cobre hepático só foi observada com a administração de enxofre metionina.

Trabalhando com bovinos, Ward *et al.* (1993) observaram concentrações plasmáticas de cobre estáveis quando administrado o proteinato de cobre, mesmo na presença de altos níveis de molibdênio e maior biodisponibilidade do cobre quando comparado com o sulfato de cobre.

Antonelli (2007) trabalhando com ovinos suplementados com cobre e molibdênio observou que quanto maior a ingestão de molibdênio, menor o acúmulo de cobre hepático e maior a excreção de cobre.

Marques *et al.* (2011) determinaram os teores de cobre, molibdênio, ferro e zinco no soro e no fígado de 141 ovinos e 141 caprinos no Estado de Pernambuco com o objetivo de estabelecer se a carência de cobre era primária, ou seja, pela deficiência de cobre ou secundária, pela ingestão excessiva de ferro ou molibdênio. O cobre sérico nos ovinos foi $9,85 \pm 2,71 \mu\text{mol/L}$ e a média hepática de cobre foi $158,45 \pm 83,05 \text{ mg/kg}$. A concentração de molibdênio no soro foi $0,31 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$ e no fígado $8,10 \pm 4,01 \text{ mg/kg}$. A grande variação nas concentrações dos minerais foi justificado pelo período sazonal (épocas de chuva e seca), raça e sexo, sendo que a deficiência de cobre na região estudada tem características de deficiência primária, considerando os teores de molibdênio encontrados.

Em experimento com bovinos leiteiros, não foi encontrado alteração na concentração sérica da superóxido dismutase, glutational peroxidase e ceruloplasmina quando administrado na dieta zinco, cobre e selênio na forma orgânica (CORTINHAS, 2009).

A maioria dos experimentos usa um mineral inorgânico como controle e compara com outra fonte orgânica do mineral. Os resultados demonstraram que o mineral orgânico tem apresentado maior biodisponibilidade que os inorgânicos (BAKER, 2003), possuem maior solubilidade e estrutura química estável, portanto, as moléculas orgânicas podem não participar de reações que transformariam o metal livre em compostos insolúveis (SALVADOR *et al.*, 2008).

No experimento de Hansen *et al.* (2008) foi estudada a biodisponibilidade do cobre glicinato e do sulfato de cobre em dietas com níveis elevados de enxofre e de molibdênio, segundo os autores, os resultados apenas sugeriram que o cobre orgânico foi mais biodisponível que o inorgânico na presença de alta dose de molibdênio.

Outro fator a ser considerado é que com o aumento da eficiência produtiva aumentam também subprodutos da produção como fezes, urina e gases, trazendo impactos ao meio ambiente (BAKER, 2003). Nitrogênio, fósforo, cobre e zinco de resíduos de animais se acumulam no solo e na água. Algumas regiões da Europa já estão praticamente saturadas com estes minerais, principalmente cobre e zinco (RÖMKENS *et al.*, 2008), apesar de o Brasil ainda não apresentar problema, é de grande importância o estudo dos minerais orgânicos visando reduzir os níveis de utilização e, portanto, a contaminação do meio ambiente pelos dejetos.

2.7. Parâmetros Bioquímicos

Para o perfil metabólico de um rebanho é necessário a determinação do hematócrito, níveis de hemoglobina, glicose, ureia, albumina, globulina, proteína total, fosfatos inorgânicos, cálcio, potássio, magnésio, sódio, cobre e ferro (BACILA, 2003).

Segundo Gonzáles (2000), o perfil metabólico auxilia na avaliação de índices produtivos, para tanto, se faz análises de componentes bioquímicos do sangue, que demonstram de maneira confiável a absorção e a eliminação dos minerais e a metabolização de nutrientes nos tecidos.

Em ovinos, o valor de hematócrito se apresenta entre 27 e 45%, muito similar a outros ruminantes, como bovinos que possuem valores de 24 a 46% (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994).

Albumina, globulinas, fatores de coagulação (KERR, 2003), hormônios, enzimas, anticorpos, proteínas de transporte entre outros estão presentes no plasma, sendo as proteínas responsáveis por diversas configurações químicas e funções, entre elas equilíbrio ácido-base e pressão coloidal osmótica (SINK & FELDMAN, 2006).

As determinações de proteína plasmática são úteis na avaliação das alterações de líquidos e eletrólitos e no diagnóstico de anemias, sendo 6 a 7,5 g/dl valores normais de proteína plasmática (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994). Valores similares, de 60 a 80 g/L para proteína total são citados por Kerr (2003) e albumina variando entre 25 e 35 g/L (ORTOLANI, 1997; KERR, 2003). Níveis elevados podem ocorrer devido a desidratação, inflamações, por exemplo, e valores reduzidos costumam estar associados à redução de albumina como gastroenteropatia, uropatia, doença hepática, hemorragias crônicas (SINK & FELDMAN, 2006), dieta deficiente em proteínas, condições virais e má absorção (KERR, 2003).

A albumina, por ter grande afinidade com ânions, é responsável pelo transporte de ácidos graxos, sendo considerada uma lipoproteína de alta densidade. Liga-se ao cálcio e está envolvida no transporte de magnésio, zinco e cobre (BACILA, 2003).

A ureia é outro metabólito envolvido na excreção de nitrogênio também presente no plasma. É um metabólito nitrogenado formado no fígado como produto final da quebra de aminoácidos ou da amônia que atravessa a parede do rúmex. Depois de formada no fígado é transportada pelo plasma até a saliva ou rins e excretada via urina (BERG ET AL., 2004).

Devido a este transporte na corrente sanguínea, a ureia pode sofrer alteração por diversos fatores como dieta com excesso de proteína na alimentação, proteína alimentar de baixa qualidade, deficiência de carboidratos ou fatores não nutricionais envolvendo septicemia grave, anormalidades hormonais, estado catabólico, falha no ciclo da ureia e insuficiência renal (KERR, 2003).

Portanto, fatores que aumentam a produção de ureia no fígado, promovem elevação na concentração sanguínea de ureia (THRALL et al., 2006).

No animal em jejum as concentrações plasmáticas de glicose são mantidas pela mobilização de carboidratos, geralmente pela glicogenólise e gliconeogênese, glicólise e glicogênese (BERG et AL., 2004).

A concentração plasmática de glicose em ruminantes em jejum varia entre 77 a 115 mg/dL (KERR, 2003).

O conteúdo dos triglicerídeos na corrente sanguínea em níveis normais reflete o equilíbrio entre absorção no intestino delgado, sua síntese e secreção nos hepatócitos e absorção pelo tecido adiposo (THRALL ET AL., 2006).

O colesterol pode ser absorvido pelo intestino ou sintetizado pelo organismo. O excesso de colesterol é secretado pela bile (KERR, 2003).

3. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos que as fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre possuem na interação cobre-enxofre-molibdênio, estimando a biodisponibilidade de duas fontes de cobre na dieta de ovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

4.1 Animais, tratamentos e instalações.

Foram utilizados 40 cordeiros, não castrados, mestiços Dorper x Santa Inês, com idade aproximada de 3 meses e peso médio de 20 kg distribuídos em 10 tratamentos.

Os tratamentos estão identificados abaixo, em concentração na matéria seca da ração:

- Dieta basal;
- Dieta contendo 10 mg de Mo/kg de MS;
- Dieta basal + 10 mg de Cu inorgânico/kg de MS + 0,2% de S inorgânico/kg de MS;
- Dieta basal + 10 mg de Cu inorgânico/kg de MS + 0,2% de S orgânico/kg de MS;
- Dieta basal + 10 mg de Cu orgânico/kg de MS + 0,2% de S inorgânico/kg de MS;
- Dieta basal + 10 mg de Cu orgânico/kg de MS + 0,2% de S orgânico/kg de MS;
- Dieta com 10 mg de Mo + 10 mg de Cu inorgânico/kg de MS + 0,2% de S inorgânico/kg de MS;
- Dieta com 10 mg de Mo + 10 mg de Cu inorgânico/kg de MS + 0,2% de S orgânico/kg de MS;
- Dieta com 10 mg de Mo + 10 mg de Cu orgânico/kg de MS + 0,2% de S inorgânico/kg de MS;
- Dieta com 10 mg de Mo + 10 mg de Cu orgânico/kg de MS + 0,2% de S orgânico/kg de MS (T9)

A fonte de enxofre inorgânico foi enxofre puro (flor de enxofre), o enxofre orgânico foi o enxofre-proteinato, o cobre inorgânico foi o sulfato de cobre e o cobre orgânico foi o cobre proteinado e a fonte de molibdênio utilizada foi o molibdato de sódio (POTT et. al, 1999).

Antes do início do experimento, os animais receberam vermífugo, a base de moxidectina (Cydectin®), brincos para identificação e foram colhidas amostra de fígado através de biópsia cirúrgica (SARAN NETTO et al., 2004).

Houve um período de adaptação de 14 dias antes do início da colheita das amostras, sendo que os animais receberam água e alimento à vontade até um máximo de 3% do peso vivo. Os animais permaneceram em gaiolas para estudo de metabolismo, revestidas de plástico para evitar possíveis contaminações, instaladas em galpão coberto equipado com cortinas laterais, comedouros e bebedouros individuais, durante um período experimental de 84 dias.

No terço final do experimento foi realizado um balanço de minerais com coleta total de fezes e urina.

4.2 Dietas Experimentais dos Animais

Os animais foram alimentados com ração total duas vezes ao dia, às 7:00 e às 15:00 horas com inclusão volumoso (casca de algodão) no intuito de evitar seleção (ZANETTI e CUNHA, 1997). As dietas foram formuladas para atender as exigências nutricionais recomendadas pelo NRC (2007), sendo que a dieta controle encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição percentual dos ingredientes da dieta experimental, na matéria seca, fornecida aos ovinos na dieta controle

Ingrediente	Porcentagem
Fubá de milho	54,93
Farelo de trigo	1,00
Casca de algodão	24,83
Farelo de soja	12,41
Óleo de soja	1,10
Calcário	1,32
Fosfato bicálcico	2,21
Ureia	1,10
Mistura vitamínica*	0,55
Mistura mineral **	0,55
Total	100,0

Fonte: Zanetti e Cunha, 1997.

* Composição de vitaminas por quilograma de mistura mineral: Vitamina A (400.000UI) e vitamina E (4.000UI). **Composição dos minerais por quilograma de mistura mineral: Iodo (100 mg), Ferro (4000 mg), Cobalto (40 mg), Manganês (3000 mg), Selênio (40 mg), Zinco (4000 mg) e Cloreto de sódio (216 g). Composição dos minerais experimentais cobre, enxofre e molibdênio foram acrescidas de acordo com cada tratamento.

Amostras semanais da ração foram retiradas para análise bromatológica.

A composição bromatológica da dieta experimental encontra-se na tabela 2 .

Tabela 2 – Composição bromatológica da dieta experimental (100% MS).

MM	EE	FDN	FDA	Ca	P	PB
5,70	4,28	28,20	16,64	1,18	0,58	15,73

4.3 Análises Bromatológicas

As análises bromatológicas foram realizadas nos Laboratórios de Bromatologia e de Minerais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP. Logo após a colheita, as amostras dos alimentos foram pesadas e secas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C, durante 72 horas. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho com peneira de orifício 2 mm, retirando-se uma sub-amostra para análises de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) de acordo com AOAC (1996), sendo as respectivas normas: 930.15, 942.05, 988.05, 954.02. Também foram realizadas as análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), conforme Silva e Queiroz (2005), no laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da FZEA/USP. As análises de cálcio, fósforo, cobre, molibdênio e enxofre foram determinadas por espectrometria de emissão ótica (ICP-OES) no laboratório de Minerais do Departamento de Zootecnia da FZEA/USP (MÉTODOS...,2013).

4.4 Amostra de Sangue

Foram realizadas colheitas de sangue em cada animal por punção na veia jugular (GARG et al., 2008) observando-se todos os cuidados de assepsia, na semana inicial (0) antes do início do experimento e mais 3 colheitas a cada

28 dias durante o período experimental, totalizando 84 dias, para as análises de cobre, molibdênio, enxofre, hematócrito, ceruloplasmina, glicose, colesterol, triglicerídeos, ureia e albumina.

As amostras para determinação de minerais foram centrifugadas logo após a colheita para obtenção de soro em centrífuga a 3200 rotações por minuto durante 15 minutos e congeladas (-20 C) em frascos eppendorf. Para as dosagens de glicose e hematócrito foram utilizados tubos vaccuntainer com fluoreto na colheita de sangue. Para a determinação de hematócrito foi utilizado o método de micro hematócrito (SINK & FELDMAN, 2006). A ceruloplasmina foi determinada por espectrofotometria, com leitura em absorbância em 450 nm, seguida pela metodologia descrita por Schoslnsky et al., (1974).

Os minerais sanguíneos foram analisados por espectrometria de emissão ótica (ICP-OES) no Laboratório de Minerais do Departamento de Zootecnia da FZEA/USP (MÉTODOS...,2013).

Os parâmetros sanguíneos ureia e albumina destinam-se ao metabolismo proteico e glicose; colesterol e triglicerídeos para metabolismo energético, sendo as análises determinadas pelo método enzimático colorimétrico através de “ kits” comerciais da marca Laborlab®.

4.5 Ganho de peso

As pesagens dos animais para acompanhamento de crescimento e ganho de peso aconteceram nos dias 1º, 28º, 56º e 84º do período experimental, onde foram pesados individualmente em jejum de sólidos de 16 horas.

4.6. Biópsia cirúrgica

No início do experimento, houve biópsia em todos os animais para coleta de amostras de fígado, utilizando procedimento descrito por Saran Netto et al.

(2004) e ao término do experimento os animais foram abatidos e colhidas amostras de fígado, para determinação de cobre, molibdênio e enxofre. As amostras colhidas foram lavadas em água destilada e congeladas para posterior análise.

Para a biópsia foi realizada a tricotomia dos animais na região das costelas flutuantes e região de flanco do lado direito, bem como o jejum de 12 horas.

Foi aplicado Acepran® 1% e posteriormente sedados com Cloridrato de Ketamina (Dopalen®) e anestesia local com Cloridrato de lidocaína momentos antes da cirurgia. Para exposição do lóbulo caudal do fígado foi realizada uma incisão da pele e tecidos de aproximadamente 10 cm logo após última costela e com auxílio de pinça hemostática e bisturi retirada uma amostra do fígado. A sutura foi realizada com fio Catgut nº 2 e a sutura da pele com fio de nylon nº1.

Figura 1- Biópsia cirúrgica de fígado em ovinos (Fonte: arquivo pessoal, 2013)

Figura 2 – Sutura da biópsia cirúrgica de fígado em ovinos (Fonte: arquivo pessoal, 2013).

Após a realização da cirurgia, os animais receberam pomada cicatrizante e repelente Unguento Pearson®, bem como antibiótico e anti-inflamatório da marca Pencivet® PLUS PPU intramuscular por um período de quatro dias.

4.7. Balanço metabólico

Faltando 10 dias para o término do período experimental foi realizado um balanço de minerais com 5 dias de duração, com colheita diária de amostras de alimentos ofertado, urina e fezes (10% do total diário), que foram congeladas para análise posterior (VILELA et al., 2011).

As fezes foram colhidas com o auxílio de bolsas forradas internamente com plástico e arreios para que ficassem presas aos animais, e fechadas com zíper, onde ocorreu a colheita das fezes a cada 24 horas, sempre às 9 horas (GARG et al., 2008), sendo que a adaptação dos animais às bolsas foi de 7 dias (ZANETTI e PETTINATI, 1991). Através da abertura com zíper, as fezes eram retiradas, pesadas, amostradas e congeladas. A urina foi coletada diariamente às 9 horas com o auxílio de baldes com 100 ml de ácido Clorídrico

(HCl) 3N (POTT et al., 1999). A urina era medida em proveta, amostrada e congelada. Foram analisados os seguintes parâmetros: quantidade de minerais (Mo, Cu e S) ingeridos (mg/dia), quantidade de minerais excretados nas fezes e na urina (mg/dia), absorção e retenção aparentes de minerais (mg/dia) e porcentagem de minerais absorvidos e retidos em função do mineral ingerido (%). Para tanto foram utilizados os seguintes cálculos:

- Mineral ingerido (mg/dia) = concentração do mineral no alimento fornecido (mg/kg) x quantidade do alimento ingerido (kg/dia), com base na MS;
- Mineral excretado nas fezes ou urina (mg/dia) = concentração do mineral nas fezes ou urina (mg/kg) x quantidade excretada (kg/dia), fezes com base na MS;
- Absorção aparente do mineral (mg/dia) = mineral ingerido (mg/kg) – mineral excretado nas fezes (mg/dia);
- Porcentagem no mineral absorvido = (mineral absorvido x 100) / mineral ingerido;
- Mineral retido (mg/dia) = mineral absorvido – mineral excretado na urina;
- Porcentagem mineral retido/ingerido = (mineral retido x 100) / mineral ingerido;
- Porcentagem mineral retido/absorvido = (mineral retido x 100) / mineral absorvido.

4.8. Abate

O abate foi realizado no matadouro escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), sendo realizado após jejum de 16 horas. Os animais foram insensibilizados com uso de uma pistola de ar

comprimido e abatidos por sangria pela veia jugular em posição vertical. Seguidos de esfolagem, evisceração, inspeção, serragem das carcaças ao meio e toalete. Durante estes procedimentos foram retiradas amostras de fígado e líquido biliar para análises de minerais, sendo cobre, enxofre e molibdênio.

Um hora após o abate, as carcaças foram pesadas e fez-se a medição de pH no músculo *Longissimus dorsi* da meia carcaça direita, utilizando-se peagâmetro digital modelo HI 8314 da marca Hanna Instruments, calibradas com pH 4,0 e 7,0. As carcaças foram mantidas em câmara frigorífica a 0°C e após 24 horas de resfriamento foram novamente pesadas e verificado o pH.

4.9 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade foi realizada pelo método de slope ratio ou relação dos coeficientes de regressão, utilizando-se como variável dependente (Y) concentração dos minerais nos tecidos e como variável independente (X) o nível do mineral na ração (AMMERMAN, 1995).

4.10. Análise Estatística

Os parâmetros foram analisados considerando-se a existência de uma estrutura de tratamento fatorial 2 x 2 x 2 (com e sem molibdênio, cobre orgânico e inorgânico, enxofre orgânico e inorgânico, além de uma dieta basal e uma basal com molibdênio), em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento e considerando cada animal como uma unidade experimental (PIMENTEL GOMES, 1985).

Para as análises de minerais no fígado, as concentrações de cobre, enxofre e molibdênio na biópsia foram usados como covariável, o mesmo ocorreu para análise de ganho de peso, onde o peso inicial também foi utilizado como covariável.

Para a comparação dos parâmetros nos diferentes tempos, os dados foram analisados utilizando-se o PROC MIXED do SAS (2000), com nível de significância de 5%

A análise de biodisponibilidade realizada segundo Ammerman et al. (1995).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de minerais nas dietas

Os teores de minerais nos tratamentos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Teores de cobre, molibdênio e enxofre nos tratamentos (em mg/kg)

Tratamento	Cobre	Molibdênio	Enxofre
Basal	9,96	1,02	2561,9
Basal contendo Mo	8,42	9,54	2369,5
Basal + Cu _i + S _i	15,7	1,05	4340,0
Basal + Cu _i + S _o	15,72	0,97	5178,2
Basal + Cu _o + S _i	17,22	1,18	4829,9
Basal + Cu _o + S _o	17,61	0,9	5209,7
Basal + Mo + Cu _i + S _i	15,74	11,6	4645,5
Basal + Mo + Cu _i + S _o	19,91	10,21	5288,5
Basal + Mo + Cu _o + S _i	16,67	11,92	5190,8
Basal + Mo + Cu _o + S _o	17,16	11,72	4906,3

5.2. Análises Bioquímicas

Os resultados de glicose, albumina e ureia obtidos no período experimental estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6.

A concentração plasmática de glicose, albumina e ureia não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, nem interação entre tempo*tratamento. Entretanto houve efeito quadrático em relação ao tempo para os parâmetros de glicose e ureia.

Em estudo com sal orgânico e inorgânico, Peixoto et.al. (2010) encontraram valores de 38 mg/dL de ureia em média e 63 mg/dL de glicose, resultados estes semelhantes aos encontrados no presente estudo.

A constância nas concentrações de glicose sanguínea se deve a eficiência de mecanismos hormonais como as vias glicolítica, gliconeogênese, glicogenólise e glicogênese.

Tabela 4 – Concentrações de glicose, em mg/dL, no plasma de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	58,3	67,8	62,0	66,5	63,7
Com	Sem	Sem	58,8	67,8	58,8	68,8	63,5
Sem	Inorgânico	Inorgânico	54,3	65,5	60,7	61,0	60,3
		Orgânico	59,3	74,3	63,8	67,3	66,1
	Orgânico	Inorgânico	61,5	70,5	62,7	70,0	66,4
		Orgânico	58,5	71,5	63,8	67,3	65,3
Com	Inorgânico	Inorgânico	57,8	68,0	59,5	65,0	62,6
		Orgânico	61,3	72,8	63,0	68,5	66,4
	Orgânico	Inorgânico	71,3	71,5	59,0	69,8	67,9
		Orgânico	64,0	69,8	62,3	70,8	66,7
Efeitos Principais							
Sem			58,4	70,4	62,9	66,4	64,6
Com			63,6	70,5	60,9	68,5	65,9
	Inorgânico		58,1	70,1	61,8	65,4	63,9
	Orgânico		63,8	70,8	61,9	69,4	66,6
		Inorgânico	61,2	68,9	60,3	66,4	64,3
		Orgânico	60,8	72,1	63,2	68,4	66,1
Dados Médios							
Média			60,4	69,8	61,6	67,4	64,8
EPM			1,14	0,95	0,78	0,76	0,55
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais							NS
Mo exclusivo vs demais							NS
Presença de Mo							NS
Forma de Cu							NS
Forma de S							NS
Mo*Cu							NS
Mo*S							NS
Cu*S							NS
Mo*Cu*S							NS

Tratamento: 0,3180

Tempo: 0,0001

Tratamento*Tempo: 0,3763

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Tabela 5– Concentrações de albumina, em g/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	2,61	2,64	2,67	2,69	2,65
Com	Sem	Sem	2,96	2,86	2,92	2,84	2,85
Sem	Inorgânico	Inorgânico	2,84	2,71	2,85	2,63	2,76
		Orgânico	2,76	2,81	2,86	2,91	2,83
	Orgânico	Inorgânico	2,90	2,84	2,88	2,70	2,83
		Orgânico	2,80	2,71	2,80	2,86	2,79
Com	Inorgânico	Inorgânico	2,86	2,91	2,90	2,80	2,87
		Orgânico	2,68	2,93	2,70	2,84	2,79
	Orgânico	Inorgânico	2,59	2,69	2,81	2,71	2,70
		Orgânico	2,74	2,78	2,94	2,83	2,82
Efeitos Principais							
Sem			2,82	2,77	2,85	2,78	2,80
Com			2,72	2,84	2,83	2,79	2,79
	Inorgânico		2,79	2,84	2,82	2,80	2,81
	Orgânico		2,76	2,76	2,86	2,78	2,79
		Inorgânico	2,80	2,8	2,86	2,71	2,79
		Orgânico	2,75	2,81	2,82	2,86	2,81
Dados Médios							
Média			2,75	2,78	2,82	2,78	2,78
EPM			0,04	0,04	0,04	0,03	0,02
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais							NS
Mo exclusivo vs demais							NS
Presença de Mo							NS
Forma de Cu							NS
Forma de S							NS
Mo*Cu							NS
Mo*S							NS
Cu*S							NS
Mo*Cu*S							NS

Tratamento: 0,8242

Tempo: 0,3126

Tratamento*Tempo: 0,8314

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Tabela 6– Concentrações de uréia, em mg/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	32,8	31,8	31,3	30,8	31,7
Com	Sem	Sem	27,0	25,8	27,8	26,0	26,6
Sem	Inorgânico	Inorgânico	32,8	25,8	24,8	22,5	26,4
		Orgânico	29,5	25,8	29,0	30,5	28,7
	Orgânico	Inorgânico	34,3	31,3	31,0	35,5	33,0
		Orgânico	35,0	27,5	31,8	29,8	31,0
Com	Inorgânico	Inorgânico	34,0	33,0	30,7	31,5	32,4
		Orgânico	32,3	26,5	29,0	30,3	29,5
	Orgânico	Inorgânico	32,5	31,3	29,3	29,0	30,5
		Orgânico	34,8	24,8	26,5	32,3	29,6
Efeitos Principais							
Sem			32,9	27,6	29,1	29,6	29,8
Com			33,4	28,9	28,7	30,8	30,5
	Inorgânico		32,1	27,8	28,2	28,7	29,2
	Orgânico		34,1	28,7	29,6	31,6	31,0
		Inorgânico	33,4	30,3	28,8	29,6	30,6
		Orgânico	32,9	26,1	29,1	30,7	29,7
Dados Médios							
Média			32,5	28,5	29,2	29,9	30,0
EPM			0,88	0,87	0,89	0,95	0,46
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais							NS
Mo exclusivo vs demais							NS
Presença de Mo							NS
Forma de Cu							NS
Forma de S							NS
Mo*Cu							NS
Mo*S							NS
Cu*S							NS
Mo*Cu*S							NS

Tratamento: 0,2809

Tempo: 0,0004

Tratamento*Tempo: 0,6913

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

As concentrações de albumina estão dentro da normalidade (KERR, 2003) e de acordo com valores encontrados por Ortolani (1997) em ovinos suplementados com molibdênio e enxofre e Peixoto et al. (2010) que suplementou ovinos com sal mineral orgânico e inorgânico. Observa-se dessa maneira níveis adequados de proteína na dieta e ausência de efeitos tóxicos devidos aos tratamentos utilizados.

Níveis elevados de albumina podem ocorrer devido a desidratação, inflamações e níveis elevados ligados a gastroenterites, problemas hepáticos entre outros (SINK & FELDMAN, 2006), auxiliando na avaliação do perfil metabólico dos animais. Um fator importante para acompanhamento da albumina se deve ao fato dela e outras proteínas carreadoras se ligarem ao cobre no processo de absorção e carregá-lo ao fígado, local de estocagem para posterior utilização pelo organismo animal. A albumina se liga ao cobre transportando 10% do cobre plasmático, mas com menor afinidade que a ceruloplasmina, por isso a facilidade da albumina em liberar o cobre aos tecidos para estocagem (RAND et al., 1998). Os níveis normais de albumina também são um importante indicador de que não houve problema hepático nos animais em virtude dos tratamentos utilizados.

Por ser um produto final na quebra de aminoácidos, a ureia pode sofrer alterações por fatores alimentares, como excesso na alimentação, ou proteína de baixa qualidade, deficiência de carboidrato entre outros (KERR, 2003) auxiliando assim a avaliação alimentar e o desenvolvimento da saúde animal. Os níveis normais de ureia também podem indicar ausência de problema hepático.

Nas tabelas 7 e 8 encontram-se os valores séricos de colesterol e triglicerídeos.

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros de colesterol total e triglicerídeos no soro dos ovinos. Observou-se efeito quadrático em relação ao tempo ($P < 0,05$) para os parâmetros de colesterol e triglicerídeos no soro. A interação cobre-enxofre mostrou efeito significativo ($P < 0,05$) nos níveis de triglicerídeos, diminuindo os valores sanguíneos de triglicerídeos quando administrado cobre e enxofre nas fontes orgânicas, como pode ser observado também no gráfico 1.

Tabela 7 – Concentrações de colesterol, em mg/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	65,3	70,8	60,2	64,8	65,3
Com	Sem	Sem	70,5	67,5	69,5	65,5	68,3
Sem	Inorgânico	Inorgânico	90,5	86,8	78,3	70,8	82,3
		Orgânico	69,5	75,5	63,8	67,3	69,0
	Orgânico	Inorgânico	72,8	72,8	64,8	64,5	68,7
		Orgânico	77,0	76,8	67,5	74,5	73,9
Com	Inorgânico	Inorgânico	71,0	83,0	72,0	71,3	74,5
		Orgânico	68,3	89,8	64,0	75,0	74,3
	Orgânico	Inorgânico	64,3	86,3	79,8	73,3	75,9
		Orgânico	71,3	82,0	69,8	70,8	73,4
Efeitos Principais							
Sem			78,2	77,9	68,6	69,3	73,5
Com			68,7	85,3	71,3	72,6	74,5
	Inorgânico		75,6	83,7	69,3	71,1	75,0
	Orgânico		71,3	79,4	70,4	70,8	73,0
		Inorgânico	75,4	82,2	73,8	69,9	75,3
		Orgânico	71,5	81,0	66,3	71,9	72,7
Dados Médios							
Média			72,0	78,7	68,4	69,5	72,2
EPM			2,42	2,22	1,94	2,13	1,13
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais							NS
Mo exclusivo vs demais							NS
Presença de Mo							NS
Forma de Cu							NS
Forma de S							NS
Mo*Cu							NS
Mo*S							NS
Cu*S							NS
Mo*Cu*S							NS

Tratamento: 0,4646

Tempo: 0,0001

Tratamento*Tempo: 0,3767

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Tabela 8 – Concentrações de triglicerídeos, em mg/dL, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	32,7	27,5	27,3	27,7	28,8
Com	Sem	Sem	35,5	34,8	42,5	26,5	34,8
Sem	Inorgânico	Inorgânico	32,8	32,5	36,3	21,8	30,8
		Orgânico	41,5	33,0	36,8	36,3	36,9
	Orgânico	Inorgânico	40,8	32,5	36,0	27,8	34,3
		Orgânico	26,3	24,3	29,8	27,8	27,0
Com	Inorgânico	Inorgânico	32,0	27,3	34,5	32,5	31,6
		Orgânico	34,0	33,5	28,0	32,8	32,1
	Orgânico	Inorgânico	31,5	38,0	38,3	30,8	34,6
		Orgânico	29,8	30,8	34,3	29,5	31,1
Efeitos Principais							
Sem			35,3	30,6	34,7	28,4	32,2
Com			31,8	30,4	33,8	31,4	32,3
	Inorgânico		35,1	31,6	33,9	30,8	32,8
	Orgânico		32,1	31,4	34,6	28,9	31,7
		Inorgânico	34,3	32,6	36,3	28,2	32,8
		Orgânico	32,9	30,4	32,2	31,6	31,8
Dados Médios							
Média			33,6	31,2	34,0	29,2	32,0
EPM			1,27	1,30	1,25	0,98	0,61
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais							NS
Mo exclusivo vs demais							NS
Presença de Mo							NS
Forma de Cu							NS
Forma de S							NS
Mo*Cu							NS
Mo*S							NS
Cu*S							0,0162
Mo*Cu*S							NS

Tratamento: 0,1456

Tempo: 0,0026

Tratamento*Tempo: 0,1690

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Gráfico 1–Níveis médios de triglicerídeos no soro de ovinos na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre.

Os valores médios encontrados neste estudo estão de acordo com os apresentados por Peixoto et al. (2010), sendo 73 mg/dL para colesterol e 23 mg/dL de triglicerídeos plasmáticos.

Garrine (2013) não observou efeito significativo ($P>0,05$) nas concentrações de triglicerídeos e colesterol total plasmático com suplementação de Cu ficando os valores de colesterol total entre 82 e 96 mg/dL e os valores de triglicerídeos entre 19 e 27 mg/L.

Em outro estudo com adição de 10 ou 20 mg cobre/kg MS (cobre-lisina e cloreto do cobre tribásico) na alimentação de ovinos, Cheng et al. (2008) observaram redução nos níveis de colesterol sanguíneo quando adicionado cobre, independente da fonte e aumento nas concentrações de triglicerídeos.

Segundo Bakalli (1995) a síntese de colesterol pode ter relação com a suplementação de cobre, pois o aumento do cobre hepático pode diminuir a concentração de glutathione reduzida e consequentemente reduzir a enzima limitante na síntese de colesterol, denominada 3-hidroxi-3 metil glutaril coenzima A-redutase (HMG-CoA redutase). O efeito do cobre no colesterol geralmente surge com níveis de cobre acima dos níveis utilizados no presente experimento.

Os valores de hematócrito aparecem na tabela 9, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) independente da inclusão de minerais ou das fontes, somente efeito quadrático no tempo.

Tabela 9 – Concentrações de hematócrito, em porcentagem, no soro de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	28,83	29,17	28,17	28,25	28,60
Com	Sem	Sem	32,25	30,88	31,25	27,88	30,56
Sem	Inorgânico	Inorgânico	32,75	33,88	33,13	32,38	33,03
		Orgânico	31,63	33,25	31,38	30,13	31,59
	Orgânico	Inorgânico	33,50	32,88	31,88	30,75	32,25
		Orgânico	31,88	30,88	29,50	29,63	30,47
Com	Inorgânico	Inorgânico	32,00	31,88	31,75	30,88	31,63
		Orgânico	29,75	31,00	30,00	27,38	29,53
	Orgânico	Inorgânico	28,00	29,25	28,75	29,50	28,88
		Orgânico	32,00	33,38	29,38	27,00	30,19
Efeitos Principais							
Sem			32,44	32,72	31,47	30,72	31,84
Com			30,44	31,13	29,97	28,69	30,05
	Inorgânico		31,53	32,50	31,56	30,19	31,45
	Orgânico		31,34	31,34	29,88	29,22	30,45
		Inorgânico	31,56	31,97	31,38	30,88	31,45
		Orgânico	31,31	31,88	30,06	28,53	30,45
Dados Médios							
Média			31,14	31,43	30,40	29,32	30,57
EPM			0,52	0,47	0,52	0,45	0,25
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais							NS
Mo exclusivo vs demais							NS
Presença de Mo							NS
Forma de Cu							NS
Forma de S							NS
Mo*Cu							NS
Mo*S							NS
Cu*S							NS
Mo*Cu*S							NS

Tratamento: 0,1932

Tempo: 0,0001

Tratamento*Tempo: 0,6192

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Os valores de hematócrito em ovinos encontrados neste estudo estão dentro da normalidade, que pode variar de 27 a 45% (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994) e a normalidade também indica que não houve problema por excesso de cobre.

A intoxicação pelo cobre ocorre em duas etapas, sendo a primeira as alterações nas enzimas hepáticas e uma anemia crônica, que tem duração variável, dependendo da dose e a segunda etapa caracterizada por uma crise hemolítica em virtude de grandes liberações de cobre hepático na corrente sanguínea, o que conseqüentemente leva a uma hemoglobinúria (MESCHY, 2010)

5.3. Resultados de desempenho

Os resultados referentes ao peso vivo e ganho de peso dos animais durante o período experimental encontram-se nas tabelas 10 e 11. O peso inicial dos ovinos serviu como covariável para os cálculos de ganho de peso diários.

Não se observou efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) sobre o peso vivo e o ganho de peso dos animais, e sim efeito no tempo ($P < 0,05$). Isso é explicado pelo fato dos animais estarem em fase de crescimento. Foi detectado efeito da interação Mo x Cu x S sobre o ganho de peso no período experimental, como observado nos gráficos 2 e 3.

A inclusão de fontes orgânicas de cobre e enxofre com adição de molibdênio aumentou significativamente o ganho de peso diário quando comparada com as mesmas fontes sem a adição de molibdênio. As fontes inorgânicas apresentaram menor desempenho, possivelmente pela melhor utilização dos minerais orgânicos. Este é um dado de grande importância uma vez que mostra que a interação mineral pode influenciar o desempenho dos animais e que os minerais orgânicos utilizados foram menos sensíveis às interações.

Dezfoulan et al. (2012) em estudo com doses (10 e 20 mg/kg MS) e fontes de cobre (sulfato de cobre e cobre proteinado) na alimentação de

ovinos, não observaram efeito significativo no ganho de peso diário, no entanto, a suplementação com cobre teve efeito sobre a taxa de conversão alimentar.

Tabela 10 – Peso vivo dos ovinos, em kg, por período experimental, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	23,87	27,71	32,91	37,21	30,42
Com	Sem	Sem	21,53	24,31	29,54	34,28	27,41
Sem	Inorgânico	Inorgânico	21,98	24,68	30,28	33,85	27,69
		Orgânico	22,38	25,65	31,89	35,85	28,94
	Orgânico	Inorgânico	22,61	25,83	31,23	36,01	28,92
		Orgânico	22,64	25,88	30,94	35,25	28,68
Com	Inorgânico	Inorgânico	22,31	25,63	30,56	35,40	28,48
		Orgânico	21,66	25,45	30,11	34,80	28,01
	Orgânico	Inorgânico	20,91	23,98	28,79	32,86	26,63
		Orgânico	21,60	25,26	31,45	36,75	28,77
Efeitos Principais							
Sem			22,40	25,51	31,08	35,24	28,56
Com			21,62	25,08	30,23	34,95	27,97
	Inorgânico		22,08	25,35	30,71	34,98	28,28
	Orgânico		21,94	25,23	30,60	35,22	28,25
		Inorgânico	21,95	25,03	30,21	34,53	27,93
		Orgânico	22,07	25,56	31,10	35,67	28,60
Dados Médios							
Média			22,23	25,34	30,87	35,32	28,49
EPM			0,67	0,83	0,96	1,09	0,59
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais							NS
Mo exclusivo vs demais							NS
Presença de Mo							NS
Forma de Cu							NS
Forma de S							NS
Mo*Cu							NS
Mo*S							NS
Cu*S							NS
Mo*Cu*S							NS

Tratamento: 0,9986

Tempo: 0,0001

Tratamento*Tempo: 0,7909

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Tabela 11 – Ganho de peso diário dos ovinos, em kg, por período experimental, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)			
Mo	Cu	S	28	56	84	Média
Combinações						
Sem	Sem	Sem	0,14	0,19	0,15	0,16
Com	Sem	Sem	0,10	0,19	0,17	0,15
Sem	Inorgânico	Inorgânico	0,10	0,20	0,14	0,15
		Orgânico	0,12	0,22	0,14	0,16
	Orgânico	Inorgânico	0,11	0,19	0,17	0,16
		Orgânico	0,12	0,18	0,15	0,15
Com	Inorgânico	Inorgânico	0,12	0,18	0,17	0,16
		Orgânico	0,12	0,17	0,17	0,15
	Orgânico	Inorgânico	0,10	0,17	0,15	0,14
		Orgânico	0,13	0,22	0,19	0,18
Efeitos Principais						
Sem			0,11	0,20	0,15	0,15
Com			0,12	0,18	0,17	0,16
	Inorgânico		0,11	0,19	0,16	0,15
	Orgânico		0,11	0,19	0,16	0,16
		Inorgânico	0,11	0,19	0,16	0,15
		Orgânico	0,12	0,20	0,16	0,16
Dados Médios						
Média			0,12	0,19	0,16	0,16
EPM			0,007	0,007	0,007	0,005
Probabilidades estatísticas dos contrastes						
Basal vs demais						NS
Mo exclusivo vs demais						NS
Presença de Mo						NS
Forma de Cu						NS
Forma de S						NS
Mo*Cu						NS
Mo*S						NS
Cu*S						NS
Mo*Cu*S						0,0283

Tratamento: 0,2912

Tempo: 0,0014

Tratamento*Tempo: 0,7918

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Gráfico 2 – Valores médios de ganho de peso diário, em kg, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre.

Gráfico 3 – Valores médios de ganho de peso diário, em kg, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre, com ou sem a inclusão de molibdênio.

Em estudo similar de doses (10 e 20 mg/kg MS) e fontes de cobre (cloreto de cobre tribásico e cobre-lisina) na alimentação de ovinos, Cheng (2008) não detectou diferença significativa para ganho de peso diário e conversão alimentar independente da dose e fonte administrada.

Avaliando teores (10, 20 e 30 mg/kg MS) e fontes de cobre (sulfato e cobre e cobre-metionina) não se observou efeito dos tratamentos sobre o peso vivo e o ganho de peso nos ovinos (YOSHIKAWA, 2014), sendo resultados similares a este estudo.

Suttle (2012) em experimento com ovinos suplementados com molibdênio, enxofre e zinco não observou efeito dos tratamentos sobre o ganho de peso.

Com a inclusão de 7,5 mg de Mo/kg de MS ou 15 mg de Mo/kg de MS na dieta de cabras, Galbraith et al. (1997) não observaram efeito no consumo de matéria seca, ganho de peso ou conversão alimentar.

Os animais mesmo estando em gaiolas para estudo de metabolismo apresentaram ganhos médios diários acima de 200g aos 56 dias de experimento, valor este quase o dobro do obtido por Costa et al. (2012) com ovinos semelhantes, só que mantidos em pastagem.

Com relação aos valores de pH e peso de carcaça dos ovinos, os mesmo se apresentam na tabela 12, onde, não foi observado efeito dos tratamentos sobre estes parâmetros.

Os dados estão dentro da normalidade e de acordo com os apresentados por Garrine (2013) onde os ovinos apresentaram semelhança no peso de abate e rendimento de carcaça ($41,82 \pm 0,51$ kg e $49,53 \pm 0,70\%$ respectivamente) independente dos tratamentos (doses e fontes de cobre). Yoshikawa, 2014 não observou efeito significativo nos parâmetros de ganho de peso, peso vivo, peso e carcaça e rendimento e carcaça em ovinos suplementados com cobre.

Em estudo com doses e fontes de cobre na alimentação de ovinos, Cheng et al., (2008) não observou efeito sobre o peso de carcaça com a inclusão de cobre na forma orgânica ou inorgânica.

O peso de carcaça fria não sofreu efeito do tratamento quando incluído molibdênio na dieta de cabras (GALBRAITH et al, 1997).

Tabela 12 – Valores de pH e peso de carcaça quente e fria, em kg

Tratamentos			Variáveis			
Mo	Cu	S	pH 0 horas	pH 24 horas	Peso carcaça quente (kg)	Peso carcaça fria (kg)
Combinações						
Sem	Sem	Sem	6,17	5,62	19,65	19,04
Com	Sem	Sem	6,15	5,63	17,50	16,80
Sem	Inorgânico	Inorgânico	6,48	5,77	17,30	16,70
		Orgânico	6,46	5,60	18,50	17,90
	Orgânico	Inorgânico	6,36	5,68	19,03	18,33
		Orgânico	6,16	5,66	19,05	18,43
Com	Inorgânico	Inorgânico	6,60	5,71	18,15	17,50
		Orgânico	6,45	5,85	18,00	17,43
	Orgânico	Inorgânico	6,51	5,70	16,80	16,18
		Orgânico	6,34	5,64	18,93	18,23
Efeitos Principais						
Sem			6,36	5,68	18,47	17,84
Com			6,47	5,72	17,97	17,33
	Inorgânico		6,50	5,73	17,99	17,38
	Orgânico		6,34	5,67	18,45	17,79
		Inorgânico	6,49	5,72	18,82	17,18
		Orgânico	6,35	5,69	18,62	17,99
Dados Médios						
Média			6,36	5,68	18,35	17,72
EPM			0,052	0,024	0,608	0,598
Probabilidades estatísticas dos contrastes						
Basal vs demais			NS	NS	NS	NS
Mo exclusivo vs demais			NS	NS	NS	NS
Presença de Mo			NS	NS	NS	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	NS
Mo*Cu*S			NS	NS	NS	NS

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

5.4 Ceruloplasmina

Na tabela 13 e gráfico 4 encontram-se os resultados referentes aos valores de ceruloplasmina plasmática.

Ao término do período experimental, pôde-se verificar efeito significativo ($P < 0,05$) nos resultados obtidos na análise de ceruloplasmina quando realizado

estatística dos contrastes. Verificou-se diminuição nos valores de ceruloplasmina na presença de molibdênio, na forma de enxofre inorgânico, bem como efeito significativo na interação de fontes Cu x S como apresentado no gráfico 3 e na interação Cu x Mo x S que mostrou teores menores de ceruloplasmina quando o molibdênio foi adicionado junto com o cobre e o enxofre inorgânicos.

Quanto menor a concentração de cobre, menor a atividade da ceruloplasmina, como indicado por McDowell (2003), e essa relação é observada no trabalho, pois na presença de molibdênio, observa-se valores reduzidos na atividade da ceruloplasmina e redução na concentração de cobre plasmático.

Yoshikawa (2014) não verificou efeito significativo nas concentrações de ceruloplasmina em ovinos quando administrado diferentes fontes de cobre (sulfato de cobre e cobre-metionina) e teores (10 ou 30 mg/kg) de cobre.

Em contrapartida Dezfoulan et al. (2012) observaram aumento da ceruloplasmina em ovinos com inclusão de cobre proteinado. A adição de 20 mg cobre-lisina/kg MS na alimentação de ovinos não afetou a concentração de ceruloplasmina aos 30 dias, mas afetou aos 60 dias, mostrando elevação de 18 para 30 U/L na concentração de ceruloplasmina.

A inclusão de molibdênio na dieta de cabras não afetou a atividade da ceruloplasmina plasmática (GALBRAITH et al., 1997).

A ceruloplasmina é uma α -globulina com alto teor de cobre, isso permite que 90% do cobre seja transportado no plasma. A quantidade de ceruloplasmina se apresenta diminuída na presença de doenças hepáticas ou metabolismo anormal do cobre (RAND et al., 1998) fator não observado neste trabalho. Através dos contrastes, o que se observa foi a diminuição na atividade da ceruloplasmina pela inclusão de molibdênio (16,34 U/L sem a inclusão do molibdênio e 13,31 com a inclusão do molibdênio), o mesmo é observado entre as fontes de enxofre (12,75 U/L na presença de enxofre inorgânico e 16,89 U/L com enxofre orgânico).

Tabela 13—Valores de ceruloplasmina, em U/L em animais recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	21,58	17,28	23,37	20,15	20,59
Com	Sem	Sem	13,32	14,82	17,06	11,44	14,16
Sem	Inorgânico	Inorgânico	22,96	17,12	17,98	15,65	18,30
		Orgânico	20,70	15,85	18,26	21,41	19,05
	Orgânico	Inorgânico	18,85	15,99	13,02	11,43	14,82
		Orgânico	17,33	15,76	16,62	16,88	16,65
Com	Inorgânico	Inorgânico	13,04	14,47	12,73	8,02	12,06
		Orgânico	19,63	15,24	16,59	18,26	17,43
	Orgânico	Inorgânico	17,73	17,04	17,86	15,92	17,14
		Orgânico	14,38	16,34	13,12	11,03	13,71
Efeitos Principais							
Sem			19,84	16,18	16,47	16,34	17,21
Com			16,19	15,77	15,07	13,31	15,09
	Inorgânico		18,96	15,67	16,39	15,84	16,71
	Orgânico		17,07	16,28	15,15	13,81	15,58
		Inorgânico	18,02	16,15	15,40	12,75	15,58
		Orgânico	18,01	15,80	16,14	16,89	16,71
Dados Médios							
Média			18,08	16,05	16,98	15,26	16,59
EPM			0,76	0,64	0,97	0,82	0,41
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais			0,0345	NS	NS	0,0013	0.0053
Mo exclusivo vs demais			0,0430	NS	NS	NS	NS
Presença de Mo			0,0196	NS	NS	0,0254	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	0,0310	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	0,0055	NS
Mo*Cu*S			NS	NS	NS	0,0074	NS

Tratamento: 0,0246

Tempo: 0,0021

Tratamento*Tempo: 0,0349

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Gráfico 4 – Valores médios de ceruloplasmina (U/L) com 84 dias experimentais, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre.

5.5. Minerais no soro

Os teores de cobre, enxofre e molibdênio no soro os ovinos encontram-se nas tabelas 14, 15 e 16.

Os níveis de cobre diminuíram no tratamento com molibdênio exclusivo ($P < 0,05$) e com a interação $\text{Cu} \times \text{S} \times \text{Mo}$ como observado na tabela 14. A dieta basal mostrou aumento nos teores de Cu sanguíneos quando os contrastes foram analisados. Observou-se efeito quadrático no tempo. É importante ressaltar que o cobre sérico total tem pouco significado na presença de enxofre e de molibdênio quando os níveis estão normais ou aumentados. O cobre pode estar aumentado no plasma, mas não disponível para absorção pelos tecidos, devido a ligações insolúveis.

Em experimento com ovinos, Suttle (2012) administrou molibdênio, enxofre e zinco através da alimentação e observou que o cobre plasmático não apresentou diferença significativa entre os tratamentos

Yoshikawa, (2014) não verificou efeito significativo nos níveis de cobre séricos, com a suplementação de cobre independente das fontes e teores.

Foi observado aumento nas concentrações de cobre sérico (0,96 mg/L) com suplementação de 10 mg cobre lisina/kg MS após 60 dias experimentais (CHENG et al., 2011) e acréscimo do cobre sérico com inclusão de cobre independente da fonte (DEZFOULIAN et al., 2012).

Tabela 14 – Teores de cobre no soro, em mg/kg, nos ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	0,45	0,43	0,46	0,45	0,45
Com	Sem	Sem	0,35	0,36	0,35	0,25	0,33
Sem	Inorgânico	Inorgânico	0,43	0,39	0,37	0,40	0,40
		Orgânico	0,44	0,33	0,30	0,34	0,35
	Orgânico	Inorgânico	0,44	0,33	0,30	0,32	0,35
		Orgânico	0,35	0,40	0,38	0,43	0,39
Com	Inorgânico	Inorgânico	0,30	0,33	0,32	0,31	0,31
		Orgânico	0,45	0,36	0,41	0,43	0,41
	Orgânico	Inorgânico	0,41	0,36	0,37	0,39	0,39
		Orgânico	0,30	0,35	0,34	0,35	0,33
Efeitos Principais							
Sem			0,42	0,36	0,34	0,37	0,37
Com			0,37	0,35	0,36	0,37	0,36
	Inorgânico		0,41	0,35	0,35	0,37	0,37
	Orgânico		0,38	0,36	0,35	0,37	0,36
		Inorgânico	0,40	0,35	0,34	0,36	0,36
		Orgânico	0,39	0,36	0,36	0,39	0,37
Dados Médios							
Média			0,40	0,37	0,36	0,37	0,37
EPM			0,015	0,013	0,016	0,013	0,007
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais			NS	NS	0,0212	0,0088	NS
Mo exclusivo vs demais			NS	NS	NS	0,0024	NS
Presença de Mo			NS	NS	NS	NS	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			0,0084	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu*S			NS	NS	NS	0,0022	NS

Tratamento: 0,2413

Tempo: 0,0057

Tratamento*Tempo: 0,0001

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Tabela 15 – Teores de enxofre no soro, em mg/kg, nos ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	1227,11	1021,41	1159,69	1170,30	1144,63
Com	Sem	Sem	1437,58	1245,49	1559,48	1479,99	1430,63
Sem	Inorgânico	Inorgânico	1318,22	1144,77	1488,13	1481,75	1358,22
		Orgânico	1324,11	1121,26	1330,45	1351,19	1281,75
	Orgânico	Inorgânico	1311,83	1127,96	1200,98	1220,72	1215,37
		Orgânico	1401,44	1255,69	1503,38	1687,64	1462,03
Com	Inorgânico	Inorgânico	1400,63	1224,19	1490,01	1506,15	1405,24
		Orgânico	1348,67	1200,14	1422,88	1458,74	1357,60
	Orgânico	Inorgânico	1241,01	1021,26	1101,20	1067,52	1107,75
		Orgânico	1393,11	1234,41	1451,48	1517,24	1399,06
Efeitos Principais							
Sem			1338,90	1162,42	1380,74	1435,32	1329,34
Com			1345,85	1170,0	1366,39	1387,41	1317,41
	Inorgânico		1347,90	1172,59	1432,87	1449,46	1350,70
	Orgânico		1336,85	1159,83	1314,26	1373,28	1296,05
		Inorgânico	1317,92	1129,54	1320,08	1319,04	1271,64
		Orgânico	1366,83	1202,87	1427,05	1503,70	1375,11
Dados Médios							
Média			1334,98	1153,07	1360,72	1383,46	1308,06
EPM			23,36	20,67	49,25	53,39	20,81
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais			NS	NS	NS	NS	NS
Mo exclusivo vs demais			NS	NS	NS	NS	NS
Presença de Mo			NS	NS	NS	NS	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	NS	0,0355
Mo*Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS

Tratamento: 0,1992

Tempo: 0,0001

Tratamento*Tempo: 0,4175

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

A partir dos resultados obtidos na análise de enxofre no soro não se observou diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$), somente efeito no tempo. Entretanto analisando os contrastes estudados, observa-se efeito na média pela interação Cu x S como demonstrado na gráfico 5, com valores maiores quando foi utilizado o enxofre orgânico.

Gráfico 5 – Valores médios de enxofre, em mg/kg, com 84 dias experimentais, na interação de fontes orgânicas e inorgânicas de cobre e enxofre no soro de ovinos.

Como a suplementação de enxofre atendia as exigências nutricionais e na dieta não houve o uso de nitrogênio não proteico, a concentração plasmática de enxofre não apresentou grandes variações. Porém se observa que o uso de minerais, cobre e enxofre na fonte orgânica elevaram os teores de enxofre no plasma.

Ao término do experimento observou-se efeito significativo ($P < 0,05$) na concentração de molibdênio sérico quando se adicionou molibdênio aos tratamentos (tabela 16). Este aumento nas concentrações de Mo estão de acordo com os encontrados por Pott et al.(1999). Galbraith et al. (1997) também observaram aumento na concentração de molibdênio plasmático quando adicionado 7,5 mg de Mo/kg de MS ou 15 mg de Mo/kg de MS na dieta. É interessante ressaltar que a dieta basal apresentou níveis séricos de Mo maiores que os tratamentos que receberam cobre e enxofre, independente das fontes, possivelmente pelo efeito da interação Mo X Cu X S.

O excesso de molibdênio absorvido para a corrente sanguínea também pode ter interferido no sistema metabólico do cobre onde se observa aumento significativo nos níveis de molibdênio e redução nos níveis de cobre (tabela 14).

Tabela 16 – Teores de molibdênio no soro, em mg/kg, nos ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Tempo (dias)				
Mo	Cu	S	0	28	56	84	Média
Combinações							
Sem	Sem	Sem	0,036	0,014	0,055	0,054	0,070
Com	Sem	Sem	0,022	0,89	0,715	0,991	0,654
Sem	Inorgânico	Inorgânico	0,032	0,075	0,212	0,032	0,087
		Orgânico	0,028	0,072	0,027	0,027	0,039
	Orgânico	Inorgânico	0,024	0,068	0,031	0,027	0,037
		Orgânico	0,027	0,087	0,024	0,026	0,041
Com	Inorgânico	Inorgânico	0,029	0,141	0,097	0,113	0,095
		Orgânico	0,033	0,142	0,128	0,103	0,102
	Orgânico	Inorgânico	0,042	0,146	0,147	0,139	0,118
		Orgânico	0,027	0,134	0,064	0,097	0,081
Efeitos Principais							
Sem			0,028	0,075	0,073	0,028	0,051
Com			0,033	0,141	0,109	0,113	0,099
	Inorgânico		0,031	0,108	0,116	0,069	0,081
	Orgânico		0,030	0,109	0,067	0,072	0,069
		Inorgânico	0,032	0,107	0,122	0,078	0,085
		Orgânico	0,029	0,109	0,060	0,063	0,066
Dados Médios							
Média			0,030	0,187	0,145	0,156	0,129
EPM			0,0029	0,0372	0,0372	0,0441	0,0176
Probabilidades estatísticas dos contrastes							
Basal vs demais			NS	NS	NS	0,0021	NS
Mo exclusivo vs demais			NS	0,0001	0,0001	0,0001	NS
Presença de Mo			NS	0,0182	NS	0,0054	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS

Tratamento: 0,0001

Tempo: 0,0001

Tratamento*Tempo: 0,0001

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

5.6. Minerais no líquido biliar

As concentrações de Cu, Mo e S no líquido biliar estão demonstradas na tabela 17.

Tabela 17 – Concentrações de cobre, molibdênio e enxofre, em mg/kg, no líquido biliar de ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Minerais no líquido biliar (mg/kg)		
Mo	Cu	S	Cu	Mo	S
Combinações					
Sem	Sem	Sem	2,10	0,09	13146,9
Com	Sem	Sem	1,09	0,42	12115,1
Sem	Inorgânico	Inorgânico	2,93	0,05	14825,8
		Orgânico	2,35	0,05	15163,2
	Orgânico	Inorgânico	3,78	0,06	13117,7
		Orgânico	2,76	0,04	16815,7
Com	Inorgânico	Inorgânico	1,64	0,11	11558,2
		Orgânico	1,58	0,10	11659,9
	Orgânico	Inorgânico	1,60	0,15	11082,7
		Orgânico	2,27	0,17	13492,1
Efeitos Principais					
Sem			2,99	0,05	14980,6
Com			1,77	0,13	11948,2
	Inorgânico		2,11	0,08	13301,8
	Orgânico		2,60	0,11	13627,1
		Inorgânico	2,49	0,09	12646,1
		Orgânico	2,23	0,09	14282,7
Dados Médios					
Média			2,20	0,11	13290,6
EPM			0,153	0,013	515,04
Probabilidades estatísticas dos contrastes					
Basal vs demais			NS	0,0028	NS
Mo exclusivo vs demais			0,0021	0,0001	NS
Presença de Mo			NS	NS	0,0124
Forma de Cu			NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	0,0057	NS
Mo*S			0,0402	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS
Mo*Cu*S			NS	NS	NS

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

A excreção do cobre se dá principalmente pela via biliar, e uma quantidade muito pequena é eliminada pela urina (RAND et al., 1998; CAVALHEIRO & TRINDADE, 1992) como observado neste trabalho, onde se encontra no líquido biliar concentrações elevadas quando comparadas com as concentrações de cobre na urina, identificadas no balanço metabólico.

Os teores de cobre no líquido biliar reduziram com a inclusão de molibdênio, conforme observado no gráfico 6. Os teores de molibdênio se

elevam quando administrado molibdênio exclusivo na dieta dos ovinos. O efeito observado na interação Mo x Cu se apresenta no gráfico 7.

Os valores de enxofre apresentaram redução na concentração biliar na presença de molibdênio ($P < 0,05$) como observado na tabela 16 evidenciando a relação antagonista entre os dois elementos.

Observou-se efeito significativo nas concentrações de cobre no líquido biliar com queda na presença exclusiva de molibdênio e na interação Mo x S. Essa diminuição pode ser explicada pela menor absorção aparente do Cu na presença de molibdênio, conforme observado no balanço metabólico do cobre (tabela 19).

A concentração de Mo aumentou no líquido biliar em virtude do aumento na dieta, sendo que apesar da interação negativa, houve aumento na absorção e consequente eliminação pela bile.

Gráfico 6 – Valores médios de cobre no líquido biliar de ovinos, em mg/kg, na interação Mo x S.

Gráfico 7 – Valores médios de molibdênio no líquido biliar de ovinos, em mg/kg, na interação Mo x Cu.

5.7. Minerais no fígado

Na tabela 18 são apresentados os valores de cobre, molibdênio e enxofre no fígado, sendo os valores na biópsia e no abate. Os valores da biópsia foram utilizados como covariável na análise estatística.

Como esperado, a maior concentração de cobre se encontra no fígado (ANDRIGUETTO et al, 2002). Foi observado que os valores de cobre hepáticos ao término do período experimental apresentaram efeito significativo mostrando-se reduzido na presença de molibdênio quando comparados com outras médias. Isso demonstra a ação antagônica do molibdênio frente ao cobre, observando-se a interação cobre –molibdênio produzindo um efeito negativo na absorção e armazenamento do cobre.

Tabela 18 – Concentrações de cobre, molibdênio e enxofre, em mg/kg, no fígado ovinos recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre

Tratamentos			Variável					
Mo	Cu	S	Cu B	Cu A	Mo B	Mo A	S B	S A
Combinações								
Sem	Sem	Sem	105,79	261,85	0,82	0,89	4063,79	4459,96
Com	Sem	Sem	111,97	146,70	1,02	4,92	5391,56	3954,33
Sem	Inor	Inor	104,50	330,98	1,04	1,09	4940,19	3279,29
		Org	106,21	277,84	0,86	0,93	4016,84	3154,08
	Org	Inor	108,87	320,98	0,86	0,92	4151,96	3705,89
		Org	111,71	326,22	1,04	1,00	5164,62	2922,34
Com	Inorg	Inor	108,03	194,94	0,83	3,17	4694,50	3884,00
		Org	107,88	180,45	0,92	2,78	4731,67	3068,88
	Org	Inor	116,08	227,62	1,43	2,70	4776,37	3755,39
		Org	113,42	264,98	0,89	2,54	4502,94	3302,61
Efeitos Principais								
Sem			107,82	314,0	0,95	0,98	4568,40	3265,40
Com			111,35	217,0	1,02	2,79	4676,37	3502,72
	Inor		106,65	246,05	0,91	1,99	4595,80	3346,56
	Org		112,52	284,95	1,05	1,79	4648,97	3421,56
		Inor	109,37	268,63	1,04	1,97	4640,75	3656,14
		Org	109,81	262,37	0,93	1,81	4604,02	3111,98
Dados Médios								
Média			109,26	253,66	0,97	1,97	4615,84	3592,07
EPM			2,27	12,13	0,038	0,20	153,17	131,12
Probabilidades estatísticas dos contrastes								
Basal vs demais			NS	NS	NS	0,0001	NS	0,0051
Mo exclusivo vs demais			NS	0,0002	NS	0,0001	NS	NS
Presença de Mo			NS	0,0001	NS	NS	NS	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu*S			NS	NS	0,0017	0,0352	NS	NS

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo; Cu B – teor de cobre hepático na biópsia; Cu A – teor de cobre hepático no abate; Mo B- teor de molibdênio hepático na biópsia; Mo A - teor de molibdênio hepático no abate; S B - teor de enxofre hepático na biópsia; S A - teor de enxofre hepático no abate.

Garrine (2103) encontrou efeito significativo na concentração média de cobre hepático quando adicionado cobre (10mg de Cu/kg de MS ou 30 mg de Cu/kg de MS) na dieta de ovinos, bem como aumento no teor de Cu hepático quando adicionado de 30 mg de Cu metionina comparado a adição de 10 mg de cobre metionina nesses ovinos.

Teores reduzidos de cobre hepático foram observados por Suttle (2012) quando administrado molibdênio, enxofre e zinco na alimentação de ovinos. Em contrapartida Galbraith et al. (1997) não observaram efeito significativo no cobre hepático com a inclusão de molibdênio nas doses de 7,5 ou 15 mg/kg MS.

A adição de 20 mg de cobre/kg MS na alimentação de ovinos acresceu a concentração e cobre independente da fonte (CHENG et al., 2011).

Sinclair et al. (2013) em estudo com vacas leiteiras incluindo adição de fontes orgânicas e inorgânicas de Cu com ou sem a adição de molibdênio enxofre observaram que a adição de molibdênio e enxofre reduziram os níveis de cobre hepáticos.

As concentrações de cobre no fígado não foram afetadas pela inclusão de 7,5 mg de Mo/kg de MS ou 15 mg de Mo/kg de MS na dieta de cabras (GALBRAITH et al., 1997).

Os valores de molibdênio hepáticos mostraram aumento significativo ($P < 0,05$) quando administrado molibdênio exclusivo aos ovinos, bem como efeito significativo na interação Mo x Cu x S com redução no Mo na presença de Cu e de S, em virtude da interação tríplice, possivelmente com a formação de tiomolibdato de cobre.

Segundo Andriguetto et al. (2002) aumento nos níveis de molibdênio hepático, diminuem a síntese de ceruloplasmina, relação observada no presente experimento.

Com relação ao enxofre hepático, somente o tratamento com dieta basal apresentou diferença com os demais tratamentos demonstrando valores superiores. A adição tanto de cobre quanto de molibdênio reduziu o S, demonstrando o efeito antagônico destes minerais no enxofre.

O que se observa é a redução nos níveis de Cu na presença de Mo, aumento nos níveis de Mo somente na dieta basal acrescida de Mo e aumento de enxofre na dieta basal, demonstrando assim que provavelmente ocorreu a formação de tiomolibdatos que deixam esses minerais indisponíveis para absorção.

5.8. Balanço metabólico de minerais

O balanço metabólico dos minerais estudados, cobre, molibdênio e enxofre se encontra respectivamente nas tabelas 19, 20 e 21. Os teores desses minerais na ração dos diferentes tratamentos corresponderam ao esperado, conforme análise bromatológica, conseqüentemente houve a ingestão esperada dos minerais pelos ovinos de acordo com cada tratamento.

O cobre ingerido, a excreção de cobre nas fezes, porcentagem de cobre absorvido e relação de cobre retido pelo ingerido apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) do tratamento controle e inclusão exclusiva de molibdênio com os demais contrastes, visto que nestes tratamentos não ocorreu a inclusão de cobre inorgânico ou orgânico, sendo esperado menor ingestão deste mineral. É interessante ressaltar que a porcentagem de absorção e de retenção do cobre nas dietas basal e basal com inclusão de molibdênio (sem a inclusão do cobre) foi maior que os demais tratamentos possivelmente pelo menor nível de cobre nas rações controles. Geralmente quando a ingestão é baixa há uma compensação com maior absorção.

Com relação à excreção de cobre via urina, observa-se maior excreção quando administrado cobre inorgânico (0,52 mg/kg) com relação ao cobre orgânico (0,33 mg/kg). É importante ressaltar que a eliminação do cobre pela via urinária é menor que a eliminação pela bile, como foi demonstrado neste estudo. Contudo houve efeito das fontes de cobre.

Observa-se também interferência significativa da interação Cu-S-Mo nos níveis de cobre excretado nas fezes, na absorção aparente, na porcentagem de cobre absorvido, no cobre retido e conseqüentemente na relação cobre retido pelo ingerido. Demonstrando assim que a interação cobre – molibdênio - enxofre reduz a absorção e utilização do cobre, em virtude da formação de tiomolibdato (SUTTLE, 1991).

Tabela 19 – Balanço metabólico de cobre em ovinos, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.

Tratamentos			Variável							
Mo	Cu	S	Cu ing	Cu Fez	Abs Ap	% Cu Abs	Cu Uri	Cu Ret	Cu R/I	Cu R/A
Combinações										
Sem	Sem	Sem	8,54	5,17	3,37	39,71	0,27	3,10	36,12	91,01
Com	Sem	Sem	6,88	3,89	2,96	43,36	0,35	2,65	38,25	88,16
Sem	Inor	Inor	13,10	8,96	4,14	31,44	0,69	3,45	26,36	83,86
		Org	14,19	10,83	3,36	22,81	0,44	2,92	19,83	87,34
	Org	Inor	15,39	12,11	3,29	21,16	0,33	2,95	18,95	89,69
		Org	15,53	11,92	3,61	22,86	0,37	3,24	20,56	89,63
Com	Inorg	Inor	13,24	11,19	2,06	15,35	0,35	1,71	12,70	89,14
		Org	14,59	10,36	4,23	28,72	0,62	3,62	24,28	84,38
	Org	Inor	13,10	10,23	2,87	22,01	0,29	2,58	19,72	89,66
		Org	15,79	13,66	2,14	13,35	0,35	1,79	11,24	85,79
Efeitos Principais										
Sem			14,55	10,95	3,60	24,57	0,46	3,14	21,42	87,63
Com			14,18	11,36	2,82	19,85	0,41	2,42	16,98	87,12
	Inor		13,78	10,34	3,45	24,58	0,52	2,92	20,79	85,98
	Org		14,95	11,98	2,97	19,84	0,33	2,64	17,62	88,69
		Inor	13,71	10,62	3,09	22,49	0,42	2,67	19,43	88,02
		Org	15,02	11,69	3,33	21,94	0,44	2,89	18,98	86,78
Dados Médios										
Média			12,93	9,72	3,21	26,41	0,40	2,81	23,12	87,91
EPM			0,60	0,55	0,18	1,55	0,035	0,16	1,42	0,79
Probabilidades estatísticas dos contrastes										
Basal vs demais			0,0010	0,0001	NS	0,0001	NS	NS	0,0001	NS
Mo exclusivo vs demais			0,0001	0,0001	NS	0,0004	NS	NS	0,0001	NS
Presença de Mo			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	0,0156	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu*S			NS	0,0352	0,0090	0,0004	NS	0,0123	0,0001	NS

Cu ing = cobre ingerido (mg/dia); Cu Fez = cobre excretado nas fezes (mg/dia); Abs ap = absorção aparente do cobre(mg/dia); %Cu Abs = porcentagem do cobre absorvido; Cu Uri = cobre excretado na urina (mg/dia); Cu ret = Cobre retido; Cu R/I = porcentagem de cobre retido pelo ingerido; Cu R/A = porcentagem de cobre retido pelo absorvido; EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Dezfoulia (2012) não encontrou diferença significativa para os parâmetros de cobre retido e absorção aparente do cobre entre as fontes estudadas (sulfato de cobre e cobre proteinado), mas diminuição da absorção aparente quando incluído cobre em relação a dieta controle. Possivelmente pelo fato já citado de que a absorção geralmente é mais eficiente com níveis baixos na dieta.

Com relação ao balanço de molibdênio (tabela 20), observa-se que a dieta basal apresentou diferença significativa quando comparada com as demais, sendo que a menor excreção de molibdênio pelas fezes e pela urina e a maior absorção e retenção deve ter ocorrido em virtude da menor quantidade na dieta, como já explicado anteriormente para os outros minerais.

Os teores de molibdênio absorvido, retido, retido pelo ingerido e retido pelo absorvido foram maior nos tratamentos com a inclusão de molibdênio.

No estudo das interações observou-se efeito significativo na interação Cu x S no molibdênio retido pelo ingerido e a interação Cu x S x Mo apresentou diferença significativa somente na ingestão e excreção do mineral pelas fezes, como esperado, a presença de cobre e enxofre aumentaram a eliminação de molibdênio nas fezes.

No estudo metabólico do enxofre (tabela 21) observa-se na dieta com inclusão exclusiva de molibdênio correu menor absorção aparente do enxofre, porcentagem de enxofre absorvido e menor enxofre retido. Este resultado confirma o antagonismo entre os dois minerais em virtude da formação de tiomolibdatos.

A dieta basal apresentou a maior porcentagem de absorção e de retenção de enxofre possivelmente por apresentar uma ingestão menor que os suplementados em virtude do aumento na eficiência na absorção

O enxofre orgânico apresentou maior excreção nas fezes e menor porcentagem de enxofre absorvido quando comparado com o enxofre inorgânico. Estes resultados a princípio não eram esperados, uma vez que os minerais orgânicos geralmente são melhor utilizados que os inorgânicos ou ao menos não possuem diferença, mas neste caso foi inferior. É importante ressaltar que o enxofre orgânico utilizado não foi os aminoácidos sulfurados e sim um “proteinato de enxofre” , obtido pela combinação do enxofre com

proteína hidrolisada. Trata-se de um produto novo e o seu estudo é de grande importância.

Tabela 20 – Balanço metabólico de molibdênio em ovinos, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.

Tratamentos			Variável							
Mo	Cu	S	Mo ing	Mo Fez	Abs Ap	% Mo Abs	Mo Uri	Mo Ret	Mo R/I	Mo R/A
Combinações										
Sem	Sem	Sem	0,87	0,49	0,38	44,24	0,02	0,36	41,61	94,39
Com	Sem	Sem	7,80	5,11	2,69	34,25	0,11	2,58	32,90	96,15
Sem	Inor	Inor	0,88	0,60	0,27	31,36	0,04	0,24	26,95	86,50
		Org	0,87	0,62	0,25	28,53	0,02	0,23	26,12	91,37
	Org	Inor	1,05	0,77	0,28	26,33	0,07	0,21	19,93	76,13
		Org	0,80	0,51	0,28	34,54	0,05	0,23	28,68	83,87
Com	Inorg	Inor	9,76	5,59	4,16	42,50	0,29	3,87	39,53	93,00
		Org	7,47	4,55	2,92	39,20	0,22	2,70	36,24	92,47
	Org	Inor	9,36	5,31	4,06	43,97	0,29	3,76	40,63	92,56
		Org	10,72	5,95	4,76	43,78	0,33	4,44	40,89	93,50
Efeitos Principais										
Sem			0,90	0,63	0,27	30,19	0,04	0,23	25,42	84,47
Com			9,32	5,35	3,98	42,36	0,28	3,69	39,32	92,88
	Inor		4,74	2,84	1,90	35,40	0,14	1,76	32,21	90,84
	Org		5,48	3,13	2,35	37,15	0,18	2,16	32,54	86,52
		Inor	5,26	3,07	2,19	36,04	0,17	2,02	31,76	87,04
		Org	4,97	2,91	2,06	36,51	0,15	1,90	32,98	90,30
Dados Médios										
Média			4,86	2,89	1,97	37,05	0,14	1,83	33,55	90,10
EPM			0,68	0,39	0,30	1,26	0,02	0,28	1,30	1,15
Probabilidades estatísticas dos contrastes										
Basal vs demais			0,0001	0,0001	0,0001	0,0035	0,0040	0,0001	0,0002	NS
Mo exclusivo vs demais			0,0001	0,0001	0,0001	NS	NS	0,0001	NS	0,0091
Presença de Mo			0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,0459	NS
Mo*Cu*S			0,0252	0,0226	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Mo ing = molibdênio ingerido (mg/dia); Mo Fez = molibdênio excretado nas fezes (mg/dia); Abs ap = absorção aparente do molibdênio (mg/dia); % Mo Abs = porcentagem do molibdênio absorvido; Mo Uri = molibdênio excretado na urina (mg/dia); Mo ret = molibdênio retido; Mo R/I = porcentagem de molibdênio retido pelo ingerido; Mo R/A = porcentagem de molibdênio retido pelo absorvido; EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

Tabela 21 – Balanço metabólico de enxofre em ovinos, recebendo dieta controle ou suplementados com molibdênio ou fontes de cobre e enxofre.

Tratamentos			Variável							
Mo	Cu	S	S ing	S Fez	Abs Ap	% S Ab	S Uri	S Ret	S R/I	S R/A
Combinações										
Sem	Sem	Sem	2197,13	594,63	1602,49	74,24	157,21	1445,28	67,52	90,74
Com	Sem	Sem	1937,02	650,39	1286,62	66,09	224,61	1062,02	54,46	81,06
Sem	Inor	Inor	3621,56	1525,7	2095,86	56,74	368,61	1587,62	42,61	73,47
		Org	4673,03	1790,51	2882,52	60,52	371,54	2510,98	52,53	86,21
	Org	Inor	4312,76	1695,26	2617,50	61,83	327,27	2290,23	54,46	86,87
		Org	4594,14	2507,24	2086,89	44,64	411,42	1675,47	35,88	79,26
Com	Inorg	Inor	3908,63	1778,43	2130,20	52,86	488,29	1641,92	39,89	72,62
		Org	3870,79	2220,01	1650,78	42,27	384,59	1266,19	31,85	81,18
	Org	Inor	4078,04	1649,71	2428,34	59,43	380,28	2048,05	50,22	83,11
		Org	4509,37	2516,46	1992,92	42,71	479,23	1513,69	31,90	72,29
Efeitos Principais										
Sem			4300,37	1879,68	2420,69	55,98	369,78	2016,07	46,29	81,45
Com			4091,71	2041,15	2050,56	49,32	433,10	1617,46	38,46	77,04
	Inor		4018,50	1828,66	2189,84	53,10	405,57	1751,68	41,72	78,18
	Org		4373,58	2092,17	2281,41	52,15	399,55	1881,86	43,04	80,38
		Inor	3980,25	1662,27	2317,97	57,72	392,61	1891,95	46,79	79,02
		Org	4411,83	2258,55	2153,28	47,53	411,70	1741,58	37,96	79,64
Dados Médios										
Média			3731,88	1666,05	2065,83	56,57	354,02	1697,83	46,62	80,92
EPM			185,91	118,05	119,02	2,29	23,97	116,39	2,63	1,78
Probabilidades estatísticas dos contrastes										
Basal vs demais			0,0001	0,0001	NS	0,0006	0,0008	NS	0,0011	0,0354
Mo exclusivo vs demais			0,0001	0,0001	0,0139	0,0288	0,0130	0,0479	NS	NS
Presença de Mo			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Forma de Cu			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Forma de S			NS	0,0005	NS	0,0142	NS	NS	NS	NS
Mo*Cu			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mo*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,0145
Mo*Cu*S			NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

S ing = enxofre ingerido (mg/dia); S Fez = enxofre excretado nas fezes (mg/dia); Abs ap = absorção aparente do enxofre (mg/dia); % S Abs = porcentagem do enxofre absorvido; S Uri = enxofre excretado na urina (mg/dia); S ret = enxofre retido; S R/I = porcentagem de enxofre retido pelo ingerido; S R/A = porcentagem de enxofre retido pelo absorvido; EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo

5.9. Biodisponibilidade

No gráfico 8 são apresentados os valores de cobre no fígado para sulfato de cobre e cobre-proteinado, com as respectivas equações de regressão.

Gráfico 8 – Concentração de cobre no fígado em mg/kg MS para fontes orgânicas e inorgânicas, independente da fonte e enxofre, sem a presença de molibdênio.

Utilizando-se a técnica de Slope ratio, segundo Ammerman et al. (1995), calculou-se a biodisponibilidade o cobre através da concentração hepática de cobre. Considerando o sulfato de cobre como padrão (100%), o cobre proteinado apresentou valor de 145,09%, neste caso independente da fonte de enxofre e sem a presença de molibdênio.

O mesmo estudo de biodisponibilidade do cobre na presença de molibdênio, independente da fonte de enxofre não pode ser calculado, pois os valores hepáticos neste caso apresentaram-se abaixo do valor controle, indicando redução nos níveis de Cu e não sendo possível o cálculo com valores negativos. Apesar disto, é importante ressaltar que na presença de Mo, a fonte inorgânica de cobre propiciou um nível hepático de 187,34 mg/kg, enquanto que a orgânica 246,3, ou seja, 31,47% superior, caso fosse utilizado o slope ratio a biodisponibilidade seria de 479%. No gráfico 9 são apresentados os valores de cobre no fígado das diferentes fontes, na presença de molibdênio com as respectivas curvas de regressão.

Gráfico 9 – Concentração de cobre no fígado em mg/kg MS para fontes orgânicas e inorgânicas, independente da fonte de enxofre, na presença de molibdênio.

A biodisponibilidade do cobre depende de vários fatores, onde a estrutura química da fonte de cobre apresenta alto grau de importância, assim como a presença de molibdênio e/ou enxofre (ORTOLANI, 1997).

Em estudos de biodisponibilidade em ovinos comparando sulfato de cobre e cobre metionina, através da estimativa pela regressão múltipla slope ratio, Yoshikawa (2014) acrescentou os minerais até 30 mg/kg MS e detectou a biodisponibilidade do cobre metionina de 150,64% em relação ao sulfato de cobre; Pal et al. (2010) encontrou valor de 151%. Estes resultados estão próximos do valor encontrado no presente experimento.

6. CONCLUSÕES

A suplementação com molibdênio e/ou fontes de cobre e enxofre reduziram as concentrações de triglicerídeos na presença de fontes orgânicas de cobre e enxofre, porém não foram observados efeitos para os outros parâmetros bioquímicos estudados.

O peso vivo dos ovinos, valores de pH e peso de carcaças não foram influenciado pelos tratamentos, porém o ganho de peso foi influenciado pela interação cobre-enxofre-molibdênio onde se observou redução no ganho de peso com a adição de molibdênio exclusivo e aumento no ganho de peso quando adicionado molibdênio com cobre e enxofre nas fontes orgânicas.

Como esperado, a presença de molibdênio reduziu os teores de ceruloplasmina, cobre plasmático e cobre e enxofre no líquido biliar. No estudo da interação cobre-enxofre e molibdênio as fontes orgânicas aumentaram a atividade da ceruloplasmina, mas as fontes inorgânicas reduziram a atividade da ceruloplasmina e o cobre plasmático, bem como os níveis de cobre retido. Contudo os tratamentos não afetaram os valores hepáticos.

A biodisponibilidade do cobre-metionina foi superior à do sulfato de cobre, independente da fonte de enxofre e na ausência de molibdênio, quando determinado pela regressão múltipla slope ratio.

A administração de fontes somente orgânicas ou somente inorgânicas de Cu e S se mostraram mais eficientes que fontes alternadas de Cu e S.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAFCO Association of American Feed Control Officials, 2000

AMMERMAN, C.B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals**. San Diego: Academic press, 1995, 441p.

ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J.S.; SOUZA, G.A.; BONA FILHO, A. **Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal**. São Paulo, Editora Nobel, v. 1, 2002. 395 p.

ANTONELLI, A.C. **Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulada em ovinos**. 2007. 123p. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Departamento de clínica Médica, São Paulo.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis.16.ed.Arlington: AOAC, 1996. 1298 p.

BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. 2 ed., São Paulo, robe Editorial, 2003.583 p.

BAKALLI, R.I.; PESTI, G.M.; RAGLAND, W.L.; KONJUFCA, V. Dietary copper in excess of nutritional requirement reduces plasma and breast muscle cholesterol of chickens. **Poultry Science**, v.74, n.2, p.: 360-365, 1995.

BAKER, D.S.; AHOLA, J.K.; BURNS, P.D.; ENGLE, T.E. Trace mineral metabolism in ruminants: impact in production, reproduction and the environment. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries**. Proceedings of Alltech's nineteenth Annual Symposium.1ed, 2003.

BARUSELLI, M.S. Benefícios do uso de minerais sob a forma orgânica no balanceamento de rações para ruminantes. In: Congresso Brasileiro de Nutrição Animal, 1, 2008, Fortaleza. [Anais...], 2008, 21 p.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. 1ed., Jobaticabal, Funep, 2006. 583 p.

- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRAYER, L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara-koogan, 2004. 1059 p.
- BORGES, A.S.; AMORIM, R.M.; KUCHEMBUCK, M.R.G. ARAÚJO, R.S. SILVA, S.B.; SILVA, H.F.; BENESI, F.J.; MIRANDOLA, R.; MORGANO, M. Correlação Entre atividade sérica da ceruloplasmina e os teores séricos e hepáticos de cobre em novilhas Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, 2005.
- BRIZOLA, M.L.; ZANETTI, M.A. Efeitos de níveis elevados de selênio e enxofre na dieta de cordeiros sobre o metabolismo do cobre, do zinco e do ferro. In : XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Porto Alegre, 1999, Anais.
- CAVALHEIRO, A.C.L.; TRINDADE, D.S. Os minerais para bovinos e ovinos criados em pastejo. Porto Alegre, Sagra, 1992. 142 p.
- CHENG, J.; FAN, C.; ZHANG, W.; ZHU, X.; YAN, X.; WANG, R.; JIA, Z. Effects of dietary copper source and level on performance carcass characteristics and lipid metabolism in lambs. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 21, n. 5, p. 685-691, 2008.
- CHENG, J.; MA, H.; FAN, C.; ZANG, Z.; JIA, Z.; ZHU, X.; WANG, L. Effects of different copper sources and peroxidation, and copper status of lambs. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1-3, p. 570-579, 2011.
- CORREA, L.B. **Efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre no desempenho, “status” de Cu, fermentação ruminal, metabolismo e oxidação de lipídeos em bovinos**. 2010. 124p. Tese (doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- CORTINHAS, S.C. **Fornecimento de zinco, cobre e selênio orgânicos para vacas leiteiras e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária**. 2009. 89p. Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

- COSTA, D. S. et al., Desempenho ponderal de cordeiros Santa Inês e F1 Dorper x Santa Inês em pastagens naturais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n.1, p.237-243 , 2012.
- COUZY, F.; KEEN, C.; GERSHWIN, M.E.; MARESCHI, J.P. Nutritional implication of the interactions between minerals. **Progress in food and nutrition science**, v.17, p.65-87, 1993.
- DEZFOULAN, A.H.; ALIARABI, H.; TABATABAEI, M.M.; ZAMANI, P.; ALIPOUR, D.; BAHARI, A.; FADAYIFAR, A. Influence of different levels and sources of copper supplementation on performance, some blood parameters, nutrient digestibility and mineral balance in lambs. **Livestock Science**, v.147, p. 9-19, 2012.
- DIAS, R.D.; PERRY, M.L.S. Nutrição e vitaminas IN: ZANINI A.G.; SEIZI, O. **Farmacologia aplicada**. 2ed., São Paulo: Atheneu, p. 587-617, 1982
- DICK, A.T.; DEWEY, D.W.; GAWTHORNE, J.M. Thiomolybdates and copper–molybdenum–sulfur interaction in ruminant nutrition. **Journal Agric Science**, v. 85, p 567–568, 1975
- ENGLE, T.E. Copper and lipid metabolism in beef cattle: A review. *Journal Animal Science*, p. 591-6, 2010.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Statistical**. 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>. Acesso em: 6 jul. 2012.
- GALBRAITH, H.; CHIGWADA, W.; SCAIFE, J.R.; HUMPHRIES, W.R. The effect of dietary molybdenum supplementation on tissue copper concentrations, mohair fibre and carcass characteristics of growing Angora goats. **Animal Feed Science Technology**, v. 7, p.83-90, 1997.

- GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. Técnicas hematológicas. In: _____
Manual de hematologia veterinária. São Paulo: Livraria Varela, 1994. p. 69-89.
- GARG, A.K.; MUDGAL, V.; DASS, R.S. Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. **Animal Feed Science and technology**, v. 144, n. 1-2, 2008
- GARRINE, C.M.L.P. **Efeito de dois níveis de sulfato e cobre e cobre metionina no metabolismo e oxidação de lipídeos em ovinos**. 2013. 94 p. Tese. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga
- GOULD, L.; KENDALL, N.R. Role of the rumen in copper and thiomolybdate absorption. **Nutrition Research Reviews**, v. 24, p. 176-182, 2011.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; DURR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Perfil Metabólico em ruminantes**: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre :Gráfica UFRGS, 2000. p.
- GOONERATNE, S.R.; BUCKLEY, W.T.; CHRISTENSEN, D.A. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. **Canadian Journal Animal Science**, v. 679, p. 819-845, 1989.
- HENRY, P.R.; MILES, R.D. Interactions among the trace minerals. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 95-106, 2000.
- HEMKEN, R. W. ; HARMON, R. J. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulfate or copper proteinate. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 10, p. 1873-80, 1996.
- HUMPHRIES, W.R.; PHILLIPPO, M.; YOUNG, B.W.; et al. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. **British Journal Nutrition**, v. 49, p. 77-86, 1983.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)
Agropecuária. Brasília, 2014 Disponível em:

<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?Vcodigo=PPMOI&sv=59&t=efetivo-dos-rebanhos-por-tipo-de-rebanho>. Acesso em 19 de dezembro de 2014.

KERR, M.G. Introdução à bioquímica clínica. In: _____. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária, Bioquímica clínica e Hematologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Roca, 2003. p. 81 a 230.

KINCAID, R.L.; BLAUWIEKEL, R.M.; CRONRATH, J.D. Supplementation of copper as copper sulfate or copper proteinate for growing calves fed forages containing molybdenum. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 160, 1986.

LUCCI, C.S. Nutrição e manejo de bovinos leiteiros. 1ed., São Paulo, Editora Manole, 1997. 169p.

MARQUES, A.V.S.; SOARES, P.C.; RIET-CORREA, F.; MOTA, I.O.; SILVA, T.L.A.; BORBA NETO, A.V.; SOARES, F.A.P.; ALENCAR, S.P. Teores séricos e hepáticos de cobre, ferro, molibdênio e zinco em ovinos e caprinos no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 5, 2011

McDOWELL, L.R. Minerals in Animal and Human Nutrition. 2 ed. Elsevier, 2003, 644 p.

McDOWELL, L.R. Minerais para ruminantes sob pastejo em regiões tropicais enfatizando o Brasil. Gainesville: University of Flórida, 1999. 93p.

McMANUS, C.; PAIVA, S.R.; ARAÚJO, R.O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 236-246, 2010.

McMANUS, C.; PINTO, B.F.; MARTINS, R.F.S.; LOUVANDINI, H.; PAIVA, S.R.; BRACCINI NETO, J.; PAIM, T.P. Selection objectives and criteria for sheep in Central Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n.12, 2011.

MESCHY, F. Nutrition minérale des ruminants, Editions Quae, Versailles, França, 2010, 208 p.

MÉTODOS analíticos. In: CAPUTI, Bruno et al. **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal**. 4.ed. São Paulo: Sindirações, 2013. 1 v. (várias paginações).

- MILTIMORE, J.E.; MASON, J.L. Copper to molybdenum ratio and molybdenum and copper concentration in ruminant feeds. **Canadian Journal Animal Science**, v. 51 p. 193-200, 1971
- MORAES, S.S.; SILVA, G.N.; DÖBEREINER, J. Microelementos minerais e a “cara inchada” dos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 25-33, 1994.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington, D.C. National Academy Press, 2001. 363p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Mineral Tolerance of Animals, second revised ed. National Academy Press, Washington, DC, USA, 2005. 496p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants, Washington, DC, USA, 2007. 362p.
- ORTOLANI, E.L. **Efeitos da suplementação dieta de molibdênio e enxofre sobre a infestação de Haemonchus contortus (rudolphi, 1803), em ovinos. Estudo de alguns aspectos do metabolismo de cobre e sódio, e da resposta celular do hospedeiro.** 1997. 94p. Tese (livre-docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PAL, D.T.; GOWDA, N.K.; PRASAD, C.S.; AMARNATH, R.; BHARADWAJ, U.; SURESH BABU, G.; SAMPATH, K.T. Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 24, n. 2, p. 89-94, 2010.
- PEIXOTO, L.A.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S.; NORNBERG, J.L.; PAZINI, M. Desempenho reprodutivo em metabólitos sanguíneos de ovelhas Ile de France sob suplementação com sal orgânico ou sal comum durante estação de monta. **Revista Brasileira de zootecnia**, v. 39, n. 1, 2010.

- PEIXOTO, P.V.; MALAFAIA, P.; BARBOSA, J.D. TOKARNIA, C.H. Princípios de suplementação mineral em ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 195-200, 2005.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11 ed., Piracicaba, Nobel, ESALQ, 1985. 464p.
- POTT, E.B.; HENRY, P.R. ZANETTI, M.A.; RAO, P.V.; HINDERBERGER Jr.,E.J.; AMMERMAN, C.B. Effects of high dietary molybdenum concentration and duration of feeding time on molybdenum and copper metabolism in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 93-105, 1999.
- RAND, M.L.; HARFENIST, E.J.; MURRAY, R.K. Proteínas plasmáticas, imunoglobulinas e coagulação sanguínea. IN: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica** .8 ed. São Paulo: Atheneu, p. 707-732, 1998.
- RÖMKENS, P.F.A.M., MOOLENAAR, S.W.; GROENENGERGG, J.E.; BONTEN, L.T.C., VRIES, W. Copper and zinc in feed (additives): an essential burden? In: Trace elements in animal production systems, SCHLEGEL, P. et al., Wageningen Academic, Netherlands, 2008, p. 115-136.
- RUN-LIAN, W.; WEI, Z.; XIAO-PING, Z. et al. Influence of different ratios of cobalt and copper supplementation on vitamin B(12) status and nutrient utilization in sheep. **Agricultural sciences in China**, v.9, n. 12, 2010.
- SALVADOR, S.C.; PEREIRA, M.N.; SANTOS, J.F.; MELO, L.Q.; CHAVES, M.L. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos I: consumo e digestão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n. 3, 2008.
- SARAN NETTO, A.; PACHECO, J.C.G.; ZANETTI, M.A.; SALLES, M.S.V.; DEL CLARO, G.R. Técnica de biópsia para obter amostra de fígado de cordeiros em crescimento. **Revista de Ciências Veterinárias**. v. 2, n.2, p. 170-173, 2004.

- SARAN NETTO, A. **Efeitos de fontes orgânicas e inorgânicas de enxofre na dieta de bovinos**. 2006. 72 p. Tese. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- SAS. Institute SAS/STAT. Guide for personal computers. Cary: SAS Institute Inc, 2000.
- SCHOSLNSKY, K.H.; LEHMANN, H.P.; BEELER, M.F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. **Clinical Chemistry**, v.20, n.12, p. 1556-1563, 1974.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005. 235p.
- SINCLAIR, L.A.; HART, K.J.; JOHNSON, D.; MACKENZIE, A.M. Effect of inorganic or organic copper fed without or with added sulfur and molybdenum on the performance, indicators of copper status, and hepatic mRNA in dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 96, p. 4355–4367, 2013
- SINK, C.A.; FELDMAN, B.F. Hematologia – Coleta e Avaliação da Amostra. In: _____ **Urinálise e hematologia: laboratorial para o clínico de pequenos animais**. São Paulo: Editora Roca, 2006, p.45 – 60.
- SPEARS, J.W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, p. 151-163, 1996.
- SUTTLE, N.F. Effects of organic and inorganic sulphur on the availability of dairy copper to sheep. **British Journal Nutrition**, v. 32 p. 559-567, 1974.
- SUTTLE, N.F. The role of organic sulphur in the copper-molybdenum-S interrelationship in ruminant nutrition. **Bristish Journal Nutrition**.v.34, p. 411-420, 1975.
- SUTTLE, N.F. The interaction between copper, molybdenum and sulfur in ruminants nutrition. **Annual Veterinary Nutrition**. v. 11, p.121-140, 1991.
- SUTTLE, N.F. Control of hepatic copper retention in Texel ram lambs by dietary supplementation with copper antagonists followed by a copper depletion regimen. **Animal Feed Science and Technology**. v. 173, p. 194– 200, 2012.

- THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. Bioquímica clínica aplicada aos principais animais domésticos. In: _____ **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2006. p. 282-430.
- 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, 1999.
- TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER J.; PEIXOTO, P.V. 2000. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 20, n.3, p.127-138, 2000.
- VÁSQUEZ, E.F.A.; HERRERA, A.P.N.; SANTIAGO, G.S. Interação cobre, molibdênio e enxofre em ruminantes. **Ciência Rural**. v. 31, n. 6, 2001.
- VILELA, F.G.; ZANETTI, M.A.; SARAN NETTO, A.; FREITAS JÚNIOR, J.E.; YOSHIKAWA, C.Y.C. Biodisponibilidade de fontes orgânicas e inorgânicas de zinco em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n.2, 2011.
- WARD, G.M., Molybdenum toxicity and hypocuprosis in ruminants: a review. **Journal of Animal Science**, v. 46, p. 1078-1085, 1978.
- WARD, J.D.; SPEARS, J.W.; KEGLEYU, E.B. Effect of copper level and source (copper lysine vs copper sulfate) on copper status, performance, and immune response in growing steers fed diets with or without supplemental molybdenum and sulfur. **Journal Animal Science**. v. 71, p. 2748-2754, 1993.
- WARD, G.M.; SPEARS, J.W.; KEGLEY, E.B. Bioavailability of copper proteinate and copper carbonate relative to copper sulfate in cattle. **Journal Dairy of Science**. v.79, p. 127-132, 1996.
- YOSHIKAWA, C.Y.C. **Avaliação de fontes de cobre para ovinos com ensaio de biodisponibilidade**. 2014. 60 p. Tese. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

ZANETTI, M.A.; CUNHA, J. Biodisponibilidade de fontes orgânicas e inorgânicas de selênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v 26, p. 623-627, 1997.

ZANETTI, M.A.; PETTINATI, R.L. Balanço de fontes orgânicas e inorgânicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 26, n. 4, 1991.