

CRISTINA SIMÕES CORTINHAS

**Fornecimento de zinco, cobre e selênio orgânicos para vacas
leiteiras e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da
glândula mamária**

Pirassununga

2009

CRISTINA SIMÕES CORTINHAS

**Fornecimento de zinco, cobre e selênio orgânicos para vacas leiteiras
e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

| | |
|----------------|--|
| T.2124 FMVZ | <p>Cortinhas, Cristina Simões Fornecimento de zinco, cobre e selênio orgânicos para vacas leiteiras e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária / Cristina Simões Cortinhas. – Pirassununga : C. S. Cortinhas, 2009. 89 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2009.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.</p> <p>1. Cobre. 2. Contagem de células somáticas. 3. Fontes. 4. Selênio. 5. Zinco. I. Título.</p> |
|----------------|--|



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia


Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Suplementação de Zinco, Cobre e Selênio complexados para vacas leiteiras e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária", protocolado sob o nº1181/2007, utilizando 24 (vinte e quatro) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research "Supplementation of organic Zinc, Cooper and selenium for dairy cows and the effects on milk quality and health of mammary gland", protocol number 1181/2007, utilizing 24 (twenty for) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 20 de setembro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CORTINHAS, Cristina Simões

Título: Fornecimento de zinco, cobre e selênio orgânicos para vacas leiteiras e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*A meus pais,
Dagmar e Antonio,
por acreditar em mim
sempre e jamais medirem
esforços para que eu
chegasse até aqui.*

*A meus irmãos,
Renata, Fernanda,
Márcia e Neto, pelo incentivo,
apoio, amizade e carinho que
sempre demonstraram*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade e por disponibilizar suporte teórico e prático necessários na realização do mestrado.

À TORTUGA pelo apoio financeiro a realização da pesquisa.

Ao Professor Dr Marcos Veiga dos Santos pela orientação segura, pelos ensinamentos valiosos, pela amizade, confiança e pelo exemplo profissional.

Ao Professor Dr. Francisco Palma Rennó pela participação no projeto, disponibilidade do Laboratório de Produção de Bovinos de Leite do VNP (FMVZ-USP), ensinamentos, experiência e orientação.

Ao Professor Dr Paulo Mazza Rodrigues pela disponibilidade do setor de Fistulados do VNP (FMVZ–USP) e ensinamentos.

À Professora Dra Maria Cláudia Araripe Sucupira pela disponibilidade do Laboratório de Distúrbios Metabólicos do VCM (FMVZ-USP), e a todo pessoal do laboratório, em especial Clara Satsuki Mori, pela ajuda, ensinamento, alegria e paciência.

A todo o corpo docente do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), Prof. Gobesso, Profa. Angélica, Profa. Maria de Fátima, Prof. Messias, Prof. Gameiro, Prof. Aníbal, Prof. Romualdo, Prof. Ricardo, pela convivência e por sempre estarem dispostos para ajudar.

Aos funcionários e amigos Lucinéia Mestieri e José Franceschini pela paciência, bom-humor e, apoio e dedicação.

Aos funcionários responsáveis pelo setor de fistulados do VNP (FMVZ–USP), Gilmar Botteon e Everson de Jesus Lázaro, não só pela total disposição em ensinar e ajudar nos momentos mais difíceis.

A todos os funcionários do setor de gado de leite e da fábrica de ração da Prefeitura do Campus de Pirassununga, Srs José Antônio Coelho, Antônio Carlos

Baladore, João Paulo Pagotti, José Antônio da Silva, Luis Tadeu de Oliveira, Valmir Donizetti Botteon, Edilson Fosé da Silva, Cláudio de Jesus Aparecido São Romão, Israel Andrietta, José Luiz Landgraf.

Aos funcionários do departamento de transporte e apoio de Pirassununga (STAPIR) pela convivência: Marcão, Limarque, Paula, Reinaldo (Cebolinha) e Bigode.

À Alessandra, Zequinha e João Paulo, secretários do VNP, pela pronta disposição a todo o momento sem medir esforços.

Aos Drs. Fernando Schalch, Ubiraem Mário Schalch e José Carlos Guilardi Pacheco, pelo auxílio prestado.

A todos estagiários que auxiliaram na realização deste projeto de pesquisa, especialmente os amigos Victor Tabacou Dutra, Bruno, de Souza Mesquita, Rui de Almeida Júnior, Caio César S. Dantes, Rodolfo Daniel Mingoti.

Aos amigos de Pós-Graduação Bruno Garcia Botaro, Marco Aurélio Porcionato, Carolina Malek, Juliana Barreiro, Julianne Naves, Elmeson, Carolina Tobias, José Esler, Milton, Jeferson, Diego Marina, Rafael, Walter, Samuel, Érika, Paula, Daniela, Iaçanã, Henry, Juliana Diniz, Bruna, Octávio, Felipe (Foca), Flávio (Tenébrio), Rodrigo (Tenete), Estelinha pela alegre convivência que tivemos e ensinamentos.

RESUMO

CORTINHAS, C. S. **Fornecimento de zinco, cobre e selênio orgânicos para vacas leiteiras e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária.** [Organic zinc, copper and selenium supplementation in dairy cows and effects on milk quality and mammary gland health]. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Os objetivos gerais deste estudo foram avaliar o efeito suplementação de zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio (Se) orgânicos para vacas leiteiras e os seus efeitos sobre a qualidade do leite, saúde da glândula mamária e consumo de alimentos. Os objetivos específicos foram avaliar: a contagem de células somáticas (CCS), a prevalência de mastite clínica e subclínica, a produção e composição de leite nos 80 primeiros dias de lactação; monitorar a atividade enzimática de superóxido dismutase (CuZnSOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e ceruloplasmina (CP); o consumo de alimentos; a concentração plasmática de Zn, Cu e Se; e as variações de peso e escore dos animais. Dezenove vacas leiteiras, com prenhez confirmada, foram selecionadas por peso, escore de condição corporal (ECC), número de lactações e produção de leite da lactação anterior, e distribuídas ao acaso em dois grupos para receber fontes de Zn, Cu e Se orgânica (n=9) ou inorgânica (n=10). As dietas foram formuladas para suprir os requerimentos nutricionais dos animais dos 60 dias antes da data prevista do parto aos 80 dias de lactação. Amostras dos alimentos fornecidos e das sobras foram coletadas diariamente para posterior análise de composição. O leite foi coletado semanalmente a partir da 3ª semana de lactação para determinação da composição e CCS, e nos dias 1 e 7 de lactação, e quando diagnosticados casos clínicos de mastite, para cultura microbiológica. Amostras de sangue foram coletadas aos -60, -21, 1, 21, 40 e 80 dias do período experimental para análises da concentração de CuZnSOD, GSH-Px e CP. Para determinação das concentrações plasmáticas de Zn, Cu e Se amostras de sangue foram coletadas aos 60 dias antes da data prevista de parto, e no 1º, 40º e 80º dias de lactação. Avaliações do escore de condição corporal (ECC) e do peso corporal (PC) foram realizadas no início e final do experimento, no parto, e uma vez por semana durante todo o período experimental. A incidência (novos casos) e o total de casos de

mastite subclínica foi menor para o grupo de vacas alimentadas com fontes orgânicas de Zn, Cu e Se em comparação com os animais que receberam fontes inorgânicas. A CCS durante os primeiros 80 dias de lactação foi menor ($P = 0,056$) para o grupo alimentado com Zn, Cu e Se orgânicos. Não foram observados efeitos de fontes orgânicas de Zn, Cu e Se sobre as concentrações de CuZnSOD, GSH-Px e CP, Zn, Cu e Se plasmáticos, produção e composição de leite, consumo de nutrientes, ECC, mudança de ECC e PC. Foi observado efeito ($P=0,024$) da fonte sobre a mudança de PC.

Palavras-chave: Cobre. Contagem de células somáticas. Fontes. Selênio. Zinco.

ABSTRACT

CORTINHAS, C. S. **Organic zinc, copper and selenium supplementation in dairy cows and effects on milk quality and mammary gland health.** [Fornecimento de zinco, cobre e selênio orgânicos para vacas leiteiras e efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária]. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

The general objectives of this study were to evaluate the effect organic zinc (Zn), copper (Cu) and selenium (Se) supplementation to dairy cows on milk quality, mammary gland health and feed intake. The specific objectives were to evaluate: the somatic cell count (SCC), clinical and subclinical mastitis prevalence, milk production and composition during the first 80 days of lactation; the superoxide dismutase (CuZnSOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and ceruloplasmin (CP) enzyme activity; the nutrients intake; Zn, Cu and Se plasmatic concentrations; changes in weight and body condition score. Nineteen dairy cows, with confirmed pregnancy, were selected by body weight (BW), body condition score (BCS), number of lactation, and milk yield in previous lactation, and randomly distributed among two groups to receive organic (n=9) or inorganic (n=10) sources of Zn, Cu and Se. The diets were formulated to meet the nutritional requirements of animals from 60 days before the expected date of calving up to 80 days of lactation. Every day, food samples and leftovers were collected for composition analysis. Milk samples was collected weekly after 15 days of lactation to determine the composition and CCS, on days 1 and 7 of lactation, and when a mastitis clinical case was diagnosed for microbiological culture. Blood samples were collected on -60, -21, 1, 21, 40 and 80 days of the experimental period for CuZnSOD, GSH-Px, and CP analysis. For plasma concentrations of Zn, Cu and Se blood samples were collected at 60 days before calving, and at 1st, 40th and 80th days of lactation. Assessments of body condition score (BCS) and body weight (BW) were performed at the beginning and at the end of the experiment, the day of calving, and once a week throughout the experimental period. The incidence (new cases) and total number of subclinical mastitis cases was lower for the group of cows fed organic Zn, Cu and Se in comparison with animals that received the inorganic sources. The SCC during the first 80 days of

lactation was lower ($P = 0,056$) for the group fed organic Zn, Cu and Se. There were no effects of Zn, Cu and Se organic supply on concentrations of CuZnSOD, GSH-Px and CP, Zn, Cu and Se plasma, production and composition of milk, consumption of nutrients, BW, BCS and changes on BCS. It was observed effect of source on BW changes ($P=0,024$).

Keywords: Copper. Selenium Somatic cell count. Sources. Zinc.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| CCS | Contagem de células somáticas |
| CMS | Consumo de matéria seca |
| CNF | Carboidratos não fibrosos |
| Co | Cobalto |
| CT | Carboidratos totais |
| CuZnSOD | Superóxido dismutase |
| ECC | Escore de condição corporal |
| EE | Extrato etéreo |
| EL | Energia líquida |
| ESD | Extrato seco desengordurado |
| EST | Extrato seco total |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FDA | Fibra em detergente ácido |
| FDN | Fibra em detergente neutro |
| GSH-Px | Glutathione peroxidase |
| Lig | Lignina |
| MECC | Mudança de condição de escore corporal |
| MM | Matéria mineral |
| MO | Matéria orgânica |
| MPC | Mudança de peso corporal |
| MS | Matéria Seca |
| NDT | Nutrientes digestíveis Totais |
| P | Peso |
| PC | Peso Corporal |

| | |
|-------|-------------------|
| PL | Produção de leite |
| SeCis | Selenocisteína |
| SeMet | Selenometionina |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 3.1 Imunologia da glândula mamária | 20 |
| 3.2 Estresse oxidativo | 22 |
| 3.3 Mastite e contagem de células somáticas | 24 |
| 3.4 Período de transição | 27 |
| 3.5 Minerais..... | 28 |
| 3.6 Minerais orgânicos | 29 |
| 3.7 Zinco | 31 |
| 3.8 Cobre..... | 33 |
| 3.9 Selênio | 35 |
| 4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM FONTES ORGÂNICAS DE ZINCO, COBRE E SELÊNIO | 38 |
| 4.1 Introdução | 40 |
| 4.2 Material e Métodos..... | 41 |
| 4.2.1 <i>Delineamento Experimental</i> | 41 |
| 4.2.2 <i>Dietas Experimentais</i> | 42 |
| 4.2.3 <i>Coleta de amostras e análises laboratoriais</i> | 45 |
| 4.2.4 <i>Análises estatísticas</i> | 46 |
| 4.3 Resultados | 47 |
| 4.3.1 <i>Saúde da glândula mamária</i> | 47 |
| 4.3.2 <i>Concentração de GSH-Px, CuZnSOD e CP</i> | 49 |
| 4.4 Discussão..... | 50 |
| 4.4.1 <i>Saúde da glândula mamária</i> | 50 |
| 4.4.2 <i>GSH-Px, CuZnSOD e CP</i> | 52 |
| 4.5 Conclusão | 54 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5 | CONSUMO DE ALIMENTOS, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE DE VACAS HOLANDESAS ALIMENTADAS COM ZINCO. COBRE E SELÊNIO ORGÂNICOS | 55 |
| 5.1 | Introdução | 57 |
| 5.2 | Material e métodos..... | 58 |
| 5.2.1 | <i>Delineamento experimental e dietas experimentais</i> | 58 |
| 5.2.2 | <i>Consumo e análise de alimentos</i> | 58 |
| 5.2.3 | <i>Análises de Zn, Cu e Se no plasma</i> | 59 |
| 5.2.4 | <i>Produção e Composição de leite</i> | 60 |
| 5.2.5 | <i>Avaliação do escore de condição corporal e peso corporal</i> | 60 |
| 5.2.6 | <i>Análises estatísticas</i> | 61 |
| 5.3 | Resultados | 61 |
| 5.3.1 | <i>Consumo de alimentos</i> | 61 |
| 5.3.2 | <i>Concentração plasmática de Zn, Cu e Se</i> | 63 |
| 5.3.3 | <i>Produção e composição de leite</i> | 64 |
| 5.3.4 | <i>Peso e escore dos animais</i> | 65 |
| 5.4 | Discussão..... | 66 |
| 5.4.1 | <i>Consumo de alimentos</i> | 66 |
| 5.4.2 | <i>Concentração plasmática de Zn, Cu e Se</i> | 67 |
| 5.4.3 | <i>Produção e composição de leite</i> | 67 |
| 5.4.4 | <i>Peso e escore dos animais</i> | 68 |
| 5.5 | Conclusão | 72 |
| 6 | CONCLUSÃO GERAL | 73 |
| | REFERÊNCIAS | 74 |
| | ANEXOS | 84 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

O estudo de estratégias que aumentam os mecanismos de defesa da glândula mamária tem cada vez mais destacado os efeitos da nutrição sobre a resposta imune. Dentre os nutrientes mais estudados estão os minerais e vitaminas (SANTOS; FONSECA, 2006).

Cobre (Cu), zinco (Zn) e selênio (Se) são micro-minerais que atuam no sistema celular antioxidante, melhorando a resposta imunológica e contribuindo para o aumento da resistência às infecções mamárias. Estes nutrientes impedem a ação deletéria de radicais livres, sendo classificados como antioxidantes de prevenção.

O estresse oxidativo ocorre quando metabólitos reativos ao oxigênio são produzidos em excesso, devido ao processo inflamatório em resposta a invasão de patógenos. Esses metabólitos, tais como peróxidos e superóxidos, são produzidos pelas células imunes durante a fagocitose de microorganismos. Quando a capacidade antioxidante é limitada, a meia vida da célula imune é reduzida e a infecção pode estabilizar ou se tornar mais grave (WEISS; SOCHA, 2005).

O desbalanço no sistema antioxidante pode ocasionar danos ao tecido mamário. Quando a bactéria penetra no canal do teto, ocorre influxo de glóbulos brancos para destruir a infecção. Peróxidos são produzidos para auxiliar na destruição de patógenos, no entanto, se em concentração elevada, podem causar perdas na produção de leite, e., em casos mais severos, a perda permanente do quarto mamário (LAUZON et al., 2006).

O simples fato de o nutriente estar diretamente envolvido com o sistema imune não garante que a sua suplementação na dieta irá aumentar a imunidade e reduzir o número de casos de mastite. As vacas necessitam consumir quantidades adequadas de minerais e vitaminas para manter seu “status” antioxidante ótimo (WEISS; WYATT, 2002). Assim, torna-se de fundamental importância o estudo das fontes de micro-minerais complexados, os quais têm sido descritos por sua maior biodisponibilidade em relação às fontes iônicas.

A saúde da glândula mamária está diretamente relacionada com a quantidade e qualidade do leite produzido. Santos e Fonseca (2006) comentam que no Brasil, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, possam ocorrer perdas na produção de cerca de 15%. Esses prejuízos atingem diretamente o produtor, mas a indústria de laticínios também é afetada pela redução no rendimento da fabricação de queijos, diminuição da qualidade e da vida de prateleira dos derivados lácteos.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar o efeito suplementação de Zn, Cu e Se complexados para vacas leiteiras e os seus efeitos sobre a qualidade do leite e saúde da glândula mamária. Os objetivos específicos foram avaliar:

- a) Prevalência de mastite clínica e subclínica (CCS) nos 80 primeiros dias de lactação;
- b) Teores séricos de Zn, Cu e Se;
- c) Concentração enzimática de CP, GSH-Px e CuZnSOD.
- d) Consumo de alimentos, produção de leite e teores de micro-elementos na dieta;
- e) Escore de condição corporal e peso;
- f) Composição do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Imunologia da glândula mamária

A glândula mamária é um órgão protegido por mecanismos de defesa que podem ser separados em duas categorias distintas: imunidade inata e imunidade específica. A imunidade inata, mais conhecida como resposta inespecífica, é predominante durante os estágios iniciais da infecção, e é mediada por barreiras físicas na extremidade do teto, macrófagos, neutrófilos, células “natural killer”, e por alguns fatores solúveis (SORDILLO, 2005), como proteínas e peptídeos anti-microbianos (lisozimas, lactoferrinas) (PICCININI et al., 2007). Além dessa classificação, os componentes da resposta inata podem ainda ser subdivididos em imunidade celular e humoral (RAINARD; RIOLLET, 2006).

Quando o agente patógeno é capaz de invadir ou não é completamente eliminado pelo sistema de defesa imune inato, o sistema imune específico ou adquirido é acionado. São reconhecidos fatores antigênicos do patógeno e, quando em contato mais de uma vez com o mesmo antígeno, ocorre forte reação em função da memória imunológica (SORDILO; STREICHER, 2002). O reconhecimento dos fatores patogênicos é mediado por anticorpos, macrófagos e por várias populações de linfócitos (SORDILLO et al., 1997). Assim, com o mecanismo de memória, após a primeira exposição, a resposta vai se tornando mais rápida, longa e mais efetiva na destruição do patógeno (SORDILO; STREICHER, 2002).

O canal do teto é a primeira linha de defesa contra a mastite, por esta ser a rota pela qual os patógenos entram na glândula mamária. O canal encontra-se fechado entre as ordenhas e durante o período seco ocorre oclusão por queratina que é derivada do epitélio estratificado que reveste o canal (RAINARD; RIOLLET, 2006). Na queratina estão presentes ácidos graxos esterificados e não esterificados (como: mirístico, palmitoléico e linoléico) e proteínas catiônicas que tem a capacidade de se ligar eletrostaticamente aos agentes patógenos, alteram a parede celular, e os tornam

mais susceptíveis à pressão osmótica (SORDILO; STREICHER, 2002). Além da queratina, o teto possui musculoso esfíncter que mantém o canal fechado, entre as ordenhas, e impede a penetração das bactérias (SORDILLO, 2005).

A bactéria que ultrapassa a defesa anatômica do canal do teto tem que contornar também as atividades antimicrobianas da glândula mamária para estabelecer a doença. Citoquinas pró-inflamatórias induzem a migração de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos). O rápido influxo de neutrófilos para o sítio de infecção, a capacidade de fagocitar e eliminar a bactéria pode ser a chave para uma rápida recuperação da infecção (RABOT et al., 2007). Os neutrófilos fazem a ingestão de bactérias em fagossomos, os quais se fundem com lisossomos, estimulando a produção de agentes oxidativos em processo denominado explosão respiratória, no qual são gerados radicais de oxigênio que servem como precursores para vários oxidantes anti-microbianos (LIPPOLIS et al., 2006).

Enquanto os neutrófilos polimorfonucleares ativam seus fagócitos, ocorre contínua exposição a fatores inibitórios do leite, como glóbulos de gordura e caseína, o que altera a morfologia dos neutrófilos e reduz a fagocitose. Durante o processo de fagocitose, os neutrófilos polimorfonucleares liberam substâncias que destroem os patógenos, no entanto também causam injúrias na delicada estrutura da glândula mamária, o que resulta na redução do número de células secretórias. Para minimizar os danos ao tecido mamário, os neutrófilos polimorfonucleares são submetidos ao processo de morte celular programada chamado apoptose, no qual macrófagos os englobam e fagocitam (PAAPE et al., 2003).

A função dos macrófagos é fagocitar os microrganismos e destruí-los sob a ação de proteases e espécies reativas de oxigênio (ERO). Entretanto, o número de macrófagos mamários tende a ser menor devido ao baixo número de receptores, que diminui sua capacidade de fagocitar quando comparado aos neutrófilos (SORDILLO, 2005). Em adição a essa função, os macrófagos desempenham papel importante no processamento e apresentação de antígenos resultantes da ingestão de bactérias (SORDILLO et al., 1997).

Os mecanismos de defesa da glândula mamária devem interagir de forma coordenada visando obter a máxima eficiência na proteção contra patógenos e mínimos danos do tecido mamário.

3.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ERO excede os mecanismos de defesa anti-oxidantes do organismo animal (SPEARS; WEISS, 2008). As ERO são erroneamente denominadas de radicais livres que são átomos ou moléculas altamente reativos com número ímpar de elétrons na sua última camada de elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A terminologia ERO são átomos ou moléculas que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas (RIBEIRO et al., 2005). Segundo Nockels (1996), durante o metabolismo potentes oxidantes são produzidos, como os radicais livres, superóxido (O_2^-), radical peróxido (ROO^-), radical hidroxila (HO^-) e outros oxidantes não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o oxigênio (O_2).

O dano oxidativo é resultado do desbalanço e inclui modificação oxidativa de macromoléculas celulares, morte celular por apoptose e necrose, bem como dano estrutural no tecido (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007). Células imunes são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo por ter em suas membranas altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados que são muito susceptíveis a peroxidação, além disso, são grandes produtoras de ERO quando estimuladas (SPEARS; WEISS, 2008).

O desbalanço no sistema antioxidante pode causar danos a todos os tipos de biomoléculas (DNA, proteínas, lipídios, e carboidratos) e ocasionalmente induzir a injúrias tissulares. Em casos de mastite aguda por coliformes a quantidade de ERO liberada por neutrófilos polimorfonucleares, em adição ao processo inflamatório, pode ocasionar grandes danos no tecido da glândula mamária, perdas na produção de leite, e perda permanente do quarto mamário, em casos mais graves, (LAUZON et al., 2006).

Devido ao efeito tóxico das ERO, existe um sofisticado sistema antioxidante (WEISS, 2005a) (Tabela 1), dos quais alguns micro-minerais e vitaminas são componentes. O sistema possui antioxidantes lipo e hidrossolúveis, uma vez que as ERO estão presentes em diversos compartimentos celulares. Quando a capacidade antioxidante é limitada a vida útil das células imunológicas envolvidas no processo inflamatório é reduzida e a infecção pode se tornar mais grave (WEISS, 2005a).

Tabela 1- Enzimas do sistema antioxidantes encontradas em células de mamíferos, suas funções e os respectivos microminerais que as compõe

| Componente (localização na célula) | Nutriente envolvido | Função |
|---|--------------------------------|--|
| Superóxido Dismutase (citossol) | Cobre e zinco | Enzima que converte superóxido a peróxido de hidrogênio |
| Superóxido Dismutase (mitocôndria) | Manganês e zinco | Enzima que converte superóxido a peróxido de hidrogênio |
| Ceruloplasmina (fase aquosa) | Cobre | Proteína anti-oxidante que impede o cobre e o ferro de participar das reações oxidativas |
| Glutationa Peroxidase (citossol) | Selênio | Enzima que converte peróxido de hidrogênio em água |
| Catalase (citossol) | Ferro | Enzima (primeiramente no fígado) que converte peróxido de hidrogênio em água |
| Ácido Ascórbico (citossol) | Vitamina C | Reage com diversos tipos de ERO |
| α Tocoferol (membranas) | Vitamina E | Quebra as reações de peroxidação em cadeia de ácidos graxos |
| β Caroteno (membranas) | β Caroteno | Previne as reações de peroxidação em cadeia de ácidos graxos |

Fonte: Adaptado de (WEISS, 2005a)

O metabolismo oxidativo é um complexo sistema necessário para auxiliar células imunes no combate a patógenos, no entanto, quando ocorre desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, danos celulares e teciduais podem ocorrer. Portanto,

torna-se imprescindível a manutenção de adequada capacidade antioxidante durante os episódios de mastite.

3.3 Mastite e contagem de células somáticas

A mastite é a inflamação da glândula mamária, em resposta a uma invasão da glândula mamária por microorganismos patogênicos, seguida de uma série de reações que reduzem a capacidade de produção, altera a composição do leite, e aumenta a contagem de células somáticas (HARMON, 1994).

As infecções da glândula mamária podem apresentar-se nas formas clínica e sub-clínica, sendo esta última a mais prevalente e responsável por aproximadamente 70% das perdas, devido a redução da secreção de leite em até 45%(FONSECA; SANTOS, 2000). A mastite tem etiologia complexa e multivariada o que torna necessária a identificação dos microorganismos infectantes, tanto para o controle e prevenção, quanto para monitoramento de rebanhos (RIBEIRO et al., 2003).

Os agentes patógenos envolvidos com a mastite são classificados como contagiosos e ambientais. Essencialmente, como patógenos contagiosos são considerados os microorganismos adaptados a sobreviver no hospedeiro, em particular na glândula mamária (BRADLEY, 2002). Cabe ressaltar, que rebanhos que possuem um manejo de ordenha inadequado e alta prevalência de microorganismos contagiosos, apresentam alto índice de mastite subclínica. Os agentes da mastite contagiosa ainda podem ser divididas em dois grandes grupos: patógenos principais e patógenos secundários. No primeiro grupo os mais importantes são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, e entre os secundários, o *Corynebacterium bovis* (FONSECA; SANTOS, 2000).

Segundo Bradley (2002), os patógenos ambientais são melhor descritos como invasores oportunistas da glândula mamária, não adaptados a sobreviver no hospedeiro. Esses patógenos vivem preferencialmente no habitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas, e quando invadem a glândula

mamária, se multiplicam, produzem a resposta imune no hospedeiro e rapidamente são eliminados. Esse tipo de mastite caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, freqüentemente com manifestação aguda e maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato (FONSECA; SANTOS, 2000). Os principais microorganismos desse tipo de infecção são as bactérias gram-negativas - principalmente *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. e *Proteus* sp., e *Pseudomonaceae*, estreptococcus ambientais (principalmente *Streptococcus uberis* e menos freqüente *Streptococcus dysgalactiae*) e enterococos (*Enterococcus faecalis*) (GRUET et al., 2001).

Após invasão de microrganismos na glândula mamária, ocorre migração e aumento no número de leucócitos presentes no leite, cuja maioria são neutrófilos polimorfonucleares. Essas células migram da corrente circulatória para a glândula mamária e, no leite, são denominadas células somáticas. Portanto, o aumento das células somáticas no leite ocorre quando se estabelece a resposta imune na glândula mamária. Outros fatores como estágio de lactação, idade do animal e estação do ano podem influenciar na contagem de células somáticas (CCS), porém o principal fator é a ocorrência de infecção intramamária (BRITO et al., 1997).

A principal origem das células somáticas em animais sadios é a epitelial e representam 65 a 70% do total, já em animais com mastite crônica as células epiteliais representam menos de 50% das células somáticas, e em casos mais severos esses valores são ainda mais baixos (10 a 45%) (FONSECA; SANTOS, 2000). Para ser possível distinguir quartos mamários infectados de não infectados pela contagem de células somáticas, estabeleceu-se um limite de 200.000 a 250.000 cels/mL, acima do qual o quarto é considerado infectado. Nesses limites, o diagnóstico de mastite pela CCS apresenta uma sensibilidade de 75% e especificidade de 90%, aproximadamente (SCHUKKEN et al., 2003). Desse modo, o aumento na contagem de células somáticas, acompanhado da alteração da proporção entre os tipos celulares, se torna um importante indicador da saúde da glândula mamária (SCHUKKEN et al., 2003)

A contagem de células somáticas, além de ser indicador de mastite, vem sendo usada por muitos países como indicador da qualidade do leite. No Brasil, com a publicação da Instrução Normativa N°51/2002 (Tabela 2) estabeleceu-se novas

exigências para a produção de leite, sendo incluída pela primeira vez a CCS como um parâmetro de qualidade a ser controlado (FONSECA; SANTOS, 2000).

Tabela 2- Limites máximos de CCS para o leite cru resfriado no Brasil

| Contagem de células somáticas máxima admitida no leite cru refrigerado | | |
|--|--|--|
| A partir de 01/07/2005 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2007 nas regiões N e NE. | A partir de 01/07/2008 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2010 nas regiões N e NE. | A partir de 01/01/2011 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2012 nas regiões N e NE. |
| 1.000.000 células/ml | 750.000 células/ml | 400.000 células/ml |

Fonte: MAPA (IN 51/2002)

A CCS, além de indicar o estado sanitário da glândula mamária, é também um importante critério de qualidade do leite cru, uma vez que a alta CCS indica leite e produtos lácteos com qualidade reduzida e composição alterada.

A vida de prateleira do leite e derivados, alterações de composição e sensoriais, como rancidez, estão associados ao aumento na CCS. Isto ocorre devido a ação de lipases, provenientes dos neutrófilos e macrófagos, sobre os triglicerídios, mesmo após o processo de pasteurização (SANTOS et al., 2007). Na fabricação de queijos, além de comprometer a qualidade sensorial, a elevada CCS interfere no rendimento, consistência e perdas de gordura e caseína no soro (BARBANO et al., 2006).

Cabe ressaltar que a extensão dos danos ao tecido mamário ocasionados pela reação inflamatória, está diretamente relacionada com alterações na composição do leite (gordura, proteína, lactose, cloro, sódio, potássio) e com o aumento na CCS, no entanto, o primeiro impacto negativo do aumento da CCS para a cadeia produtiva do leite é sobre a produção, independente da alteração na composição (SANTOS; FONSECA, 2006). No Brasil, devido à alta prevalência de mastite, estima-se uma perda de 15% na produção de leite do país, o que representaria uma perda total de 3,3 bilhões de litros ao ano em relação à produção anual de 28,89 bilhões de litros (SANTOS; FONSECA, 2006).

3.4 Período de transição

O período de transição compreende as três semanas pré-parto e as três semanas pós parto. É um período crítico e de fundamental importância para a saúde da vaca, assim como para a produtividade durante a lactação. Durante este período, podem ocorrer algumas desordens metabólicas do metabolismo lipídico resultando em alterações fisiológicas na regulação e coordenação entre o tecido adiposo, fígado, intestinos e glândula mamária (DRACKLEY, 1999).

As alterações fisiológicas se iniciam nas últimas semanas de gestação, com declínio abrupto no consumo de MS e redução na síntese de ácido propiônico, diminuição de glicose e de níveis séricos de insulina. O aumento da demanda de energia pelo feto e pela glândula mamária faz com que ocorra mobilização de reservas corporais, assim, vacas com baixa ou alta condição de escore corporal pré-parto tornam-se mais susceptíveis aos distúrbios metabólicos. Neste contexto, práticas de alimentação e manejo utilizados nas últimas semanas de gestação, podem influenciar na incidência de doenças no início do período de lactação (DRACKLEY, 1999).

A formação do colostro, ao final da gestação, associada ao início da lactação, aumentam repentinamente as exigências nutricionais de cálcio (2 a 3 vezes), podendo resultar em hipocalcemia. (DRACKLEY, 1999) Associada a esses eventos, a redução nos níveis séricos de minerais e vitaminas (antioxidantes) e o balanço negativo de energia e proteína, fazem com que o sistema imunológico da vaca fique comprometido e mais susceptível a processos infecciosos (GOFF, 2006).

Além disso, a rápida diferenciação no parênquima secretório e intenso crescimento da glândula mamária se somam a estes fatores promovendo aumento nos requerimentos de oxigênio e, conseqüente aumento na produção de ERO. Portanto, o desbalanço entre o aumento de produção de ERO e a menor disponibilidade das defesas antioxidantes (minerais e vitaminas) podem resultar no aumento do estresse oxidativo durante o período de transição (SORDILLO, 2005).

O período de transição abrange o final do período seco, crítico na aquisição de novas infecções intramamárias, sendo que 60% de novas infecções e mais de 50% dos casos de mastite clínica causados por coliformes, ocorreram em quartos mamários previamente infectados durante o período seco (WILDE, 2006).

O estresse fisiológico associado à maior probabilidade de ocorrência de novas infecções faz do período de transição o maior desafio para a produtividade e saúde da glândula mamária da vaca leiteira.

3.5 Minerais

Os minerais são considerados nutrientes fundamentais por participarem de diversas funções do metabolismo animal, compondo estruturas de biomoléculas, interferindo no crescimento e na manutenção de tecidos, participando como cofatores enzimáticos, ativando ações hormonais, regulando a pressão osmótica e equilíbrio ácido-básico. Estes nutrientes representam apenas cerca de 5% do peso total do corpo, mesmo assim, tem grande influência na produção do animal, acarretando acréscimos ou decréscimos na produtividade do sistema (FILAPPI et al., 2005).

A concentração e as formas de armazenamento dos minerais nos tecidos e fluidos do organismo podem sofrer alterações com a ingestão de dietas deficientes, desbalanceadas ou com excesso de minerais. Em alguns casos as funções fisiológicas são alteradas acarretando lesões e desordens estruturais, as quais variam de acordo com o elemento mineral, grau de duração da deficiência, toxicidade da dieta e fatores intrínsecos dos animais, como idade, sexo e espécie (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

Os minerais podem ser classificados de várias formas que levam em consideração seus requerimentos e funções. Os que são necessários em grandes quantidades são denominados macrominerais, enquanto os que são exigidos em menores quantidades são os microminerais ou minerais traços. Os macrominerais são requeridos em quantidades maiores que 100 ppm (partes por milhão) e freqüentemente são mencionados como percentagem da dieta (ou g por kg), enquanto os microminerais

são requeridos em quantidades menores que 100 ppm e expressos em ppm ou, muitas vezes, em ppb (partes por bilhão) (MCDOWELL, 2003).

Os microminerais tradicionalmente tem sido suplementados nas dietas como sais inorgânicos. Mais recentemente, a partir do final da década de 1980, tem havido crescente interesse no uso de microminerais orgânicos nas dietas de ruminantes (SPEARS, 1996; PEIXOTO et al., 2005).

3.6 Minerais orgânicos

Minerais ligados a moléculas orgânicas como aminoácidos, carboidratos ou proteínas são denominados orgânicos (PEIXOTO et al., 2005). Os minerais orgânicos são também denominados quelatados (do grego *chele*, garra) ou complexados, no entanto, nem todo metal complexado pode ser definido como quelatado, pois para ser classificado como tal, o agente quelante deve conter, no mínimo, dois grupos funcionais (oxigênio, nitrogênio, amino, hidroxil), capazes de doar um par de elétrons e combinar-se, através de ligações covalentes combinadas, com um metal, e formar um anel heterocíclico com o metal (PEIXOTO et al., 2005).

Por definição, um quelato forma-se quando duas ou mais partes separadas e únicas de uma mesma molécula ligante formam ligações coordenadas covalentes e iônicas com o mesmo átomo de um metal (BARUSELLI, 2005). No quelato, dois e às vezes três, aminoácidos ligam-se a um mesmo átomo de metal, formando moléculas anelares bicíclicas (dipeptídeo) e tricíclicas (tripeptídeo), assim, o quelato compartilha as propriedades dos metais e aminoácidos. Um mineral corretamente quelado apresenta altos coeficientes de absorção e tende a ser absorvido no intestino de forma semelhante a um dipeptídeo ou tripeptídeo (BARUSELLI, 2005).

A “Association of American Feed Control Officials” (AAFCO, 2000) define minerais orgânicos como:

a) “Quelato metal-aminoácido é um produto resultante da reação de um sal metálico solúvel com aminoácidos na proporção molar, isto é, um mol do metal para um

a três moles (preferencialmente dois) de aminoácidos na forma de ligação covalente coordenada. O peso molecular médio dos aminoácidos hidrolisados pode ser, aproximadamente, de 150 dáltons e o peso molecular resultante do quelato não deve exceder a 800 dáltons.”

b) “Complexo aminoácido-metal é um produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com aminoácido(s).”

c) “Metal proteinado é o produto resultante da quelação de um sal solúvel com uma proteína parcialmente hidrolisada.”

d) “Complexo metal-polissacarídeo é o produto resultante da complexação de um sal solúvel com polissacarídeo.”

Dentro do último grupo está situado o carboaminofosfoquelato ou carboquelato. O carboquelato nada mais é que o fermentado resultante da lise enzimática de leveduras específicas, sendo as cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, as mais utilizadas neste processo (BARUSELLI, 2008).

Segundo Peixoto et al. (2005), os quelatos teriam grandes vantagens sobre a forma convencional de “mineralização” por serem de elevada absorção, mais biodisponíveis e menos tóxicas; adicionalmente, não haveria interação (antagonismos) entre elas e outros minerais ou nutrientes (gorduras e fibras da dieta).

A proposta de fornecer mineral ligado a moléculas orgânicas tem a premissa de reduzir a interação com outros minerais no rúmen, o que poderia resultar em complexos insolúveis com reduzida absorção intestinal (SPEARS, 1996).

O fato é que, segundo Spears (1996), no organismo animal a maioria dos microminerais têm funções inteiramente relacionadas com complexos orgânicos ou quelatos, e não como íons inorgânicos livres, assim, a utilização de minerais inorgânicos torna-se dependente da habilidade do animal em convertê-los em formas orgânicas biologicamente ativas. A biodisponibilidade dos elementos minerais (orgânicos e inorgânicos) é influenciada por uma série de fatores: tamanho de partícula, reatividade ou solubilidade, origem do precursor grau de calcinação e ligantes orgânicos (HOUSE, 1999).

Neste contexto, os efeitos da suplementação de minerais orgânicos na produção de ruminantes dependerá do tipo de fonte fornecida (complexos, proteínatos e amino ácidos quelados: AACs) e do processamento industrial utilizado.

3.7 Zinco

O zinco é um metal leve, de cor azulada, sendo um cátion bivalente, com o número atômico 30 (MCDOWELL, 2003). É o micro-mineral mais abundante no meio intracelular, está envolvido em funções catalíticas, estruturais, regulatórias (PECHOVA et al., 2006), e participa do metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos (NRC, 2001). No sistema antioxidante, o Zn está presente na superóxido dismutase (Cu-ZnSOD), enzima que atua na redução de ERO. Além disso, o Zn desempenha importante papel no sistema imune por ser componente essencial de mais de 300 enzimas, incluindo as envolvidas na síntese de DNA e RNA, e conseqüentemente na replicação e proliferação de celular das células imunes (SPEARS e WEISS, 2008).

A absorção do zinco pode variar de 15 a 60% (MCDOWELL, 2003), e os mecanismos envolvidos na absorção intestinal, estão presentes pelo menos 4 proteínas que transportam o zinco nos enterócitos. No rúmen, a absorção do Zn ainda não está bem esclarecida, uma vez que não se sabe quanto dessas proteínas transportadoras estão presentes no epitélio ruminal e omasal, além disso, os microorganismos ruminais podem reduzir o potencial de ionização ou dissociação do zinco ligado a compostos orgânicos (WRIGHT et al., 2008).

A enzima metalotioneína representa a maior reserva de zinco no organismo animal, e está presente em altas concentrações no fígado, rins, pâncreas e intestino. Apesar do Zn estar distribuído e estocado em diversos de tecidos, há considerável dificuldade em mobilizar rapidamente essas reservas em casos de deficiência. Outra enzima envolvida com Zn é Cu-Zn superóxido dismutase, que também é uma forma de estocagem desse mineral e está presente no fígado (MCDOWELL, 2003).

A excreção do zinco é realizada pelas fezes, secreções pancreáticas, biliares e muito pouco pela urina (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; MCDOWELL, 2003). A utilização da via de excreção urinária aumenta quando são fornecidas fontes quelatadas com EDTA. O total excretado é influenciado pelos requerimentos do animal e pela absorção (MCDOWELL, 2003).

A biodisponibilidade é definida como a parte do nutriente ingerido que possui potencial de suprir as demandas fisiológicas nos tecidos alvo (MOURÃO et al., 2005). Existe uma grande variedade de agentes quelantes utilizados nos processos de complexação ou quelação do zinco, os quais podem afetar a biodisponibilidade do zinco (SPEARS et al., 2004). Outra característica que afeta a biodisponibilidade do mineral orgânico e que deve ser levada em consideração, é o grau de ligação ou intensidade na qual o ligante permanece vinculado ao metal em condições de pH fisiológico (CAO et al., 2000).

O zinco é tradicionalmente suplementado com fontes inorgânicas, sendo mais comuns o óxido de zinco (ZnO) e o sulfato de zinco (ZnSO₄), podendo ser utilizados também o carbonato de zinco (ZnCO₃) e cloreto de zinco (ZnCl₂) (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; MCDOWELL, 2003). Como fontes de zinco orgânico podem ser mencionados:

- Complexados: zinco metionina, zinco polissacarídeos, zinco lisina (CAO et al., 2000);
- Quelatos: zinco aminoácido quelado, zinco proteinato (CAO et al., 2000);
- Leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com Zn (CUNHA FILHO et al., 2007).

As leveduras podem participar no processo industrial de complexação dos carboquelatos ou serem fornecidas vivas desidratadas para que retomem a atividade de crescimento e reprodução assim que entram em contato com um substrato adequado para o seu desenvolvimento (BARUSELLI, 2008). As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* podem crescer em meio com elevada concentração de zinco incorporando-o em suas células, transformando o zinco inorgânico (íon metálico) em orgânico (CUNHA FILHO et al., 2007).

Na defesa da glândula mamária contra infecções por patógenos, o zinco está ligado ao mecanismo de reconstrução da queratina presente no canal do teto entre as ordenhas (KINAL et al., 2007), além de seu envolvimento com o metabolismo oxidativo. Este micro-nutriente também é essencial para manter a integridade da pele, primeira linha de defesa da glândula mamária (SORDILLO et al., 1997).

Os benefícios da suplementação de zinco orgânico na redução da contagem de células somáticas foram descritos por Pechova et al. (2006). Outros autores (WHITAKER et al., 1997), não observaram diferença ($P > 0,05$) no número de casos clínicos e sub-clínicos de mastite, novas infecções, tipo de microorganismo isolado e CCS, ao suplementar vacas holandesas com diferentes fontes de zinco (proteinato X inorgânico).

O zinco é um nutriente essencial em diversos processos vitais. Seu mecanismo de absorção em ruminantes ainda não está bem esclarecido, depende da fonte fornecida e mecanismos antagonistas.

3.8 Cobre

O cobre possui número atômico 29, peso atômico 63,5 e está presente em diversas enzimas e proteínas. Suas funções fisiológicas estão ligadas a respiração celular, formação óssea, funções cardíacas, desenvolvimento do tecido conectivo, mielinização da medula espinhal, processos de queratinização e pigmentação. É um nutriente considerado tanto essencial quanto tóxico, e está presente como co-fator catalítico essencial em importantes metaloenzimas como a Cu-Zn superóxido dismutase, citocromo oxidase, lisil oxidase, dopamina- β -hidroxilase e tirosinase (MCDOWELL, 2003).

As intoxicações por cobre em ruminantes são mais frequentes em ovinos (DU et al., 1996). Quando ruminantes consomem Cu em excesso há acúmulo no fígado e, em situação de estresse, grandes quantidades são liberadas no sangue tornando evidentes os sinais de intoxicação (crises hemolíticas) (NRC, 2001). Já a deficiência, está associada ao tipo de manejo adotado, pois animais em pastejo são mais susceptíveis

pela baixa concentração de cobre e pela presença de antagonistas como o molibidênio (Mo) e o enxofre (S) e ferro (Fe) nas forrageiras (CHASE et al., 2000; MINATEL; CARFAGNINI, 2000; VÁSQUEZ et al., 2001).

Em ruminantes apenas 1 a 3% do Cu consumido é absorvido, sendo que essa absorção depende de alguns fatores como idade do animal, fonte fornecida e pela notável interação com outros nutrientes da dieta e agentes de transporte intestinal como a bile. A absorção pode ocorrer pelos mecanismos de transporte ativo e difusão, e após entrar na circulação, o Cu é depositado principalmente no fígado (MCDOWELL, 2003).

Aproximadamente 90% do Cu presente no plasma ocorre na forma de ceruloplasmina, uma metaloproteína sintetizada no fígado, com incorporação de seis átomos de cobre. Os mecanismos de ação da ceruloplasmina ainda não são bem esclarecidos, mas esta proteína carrega o Cu até os tecidos alvo e está envolvida com o metabolismo do ferro (MCDOWELL, 2003). Este micromineral é considerado um antioxidante, uma vez que participa no metabolismo do ferro que é grande produtor de radicais livres e da Cu-ZnSOD, enzima que converte superóxido (O_2^-) a peróxido (H_2O_2) (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

A excreção do Cu é feita pelas fezes, bile, urina, leite e transpiração (MCDOWELL, 2003), e a disponibilidade em ruminantes é baixa, por sofrer interações com antagonistas formando agentes insolúveis pouco utilizados (WARD; SPEARS, 1993). No rúmen, por exemplo, o enxofre (S) e o molibidênio (Mo) podem formar tetratiomolibdatos que reagem com o Cu tornando-se compostos indigestíveis e sem absorção (WARD; SPEARS, 1993). As vantagens fisiológicas da utilização do Cu orgânico podem estar ligadas a sua composição química que permite a rápida formação de compostos solúveis, quimicamente estáveis e que resistem a interação com antagonistas (YOST et al., 2002).

O Cu inorgânico se apresenta nas formas de sulfato de cobre ($CuSO_4$), carbonato de cobre ($CuCO_3$), cloreto de cobre ($CuCl_2$), óxido de cobre (CuO), nitrato de cobre ($Cu(NO_3)_2$) (MCDOWELL, 2003). As fontes orgânicas de Cu podem ser:

- cobre lisina (WARD; SPEARS, 1993; KEGLEY; SPEARS, 1994; CHASE et al., 2000);
- proteinato de cobre (DU et al., 1996; WARD et al., 1996);

Scaletti et al. (2003) observaram redução da CCS em estudo com suplementação de 20 ppm de sulfato de cobre, 60 dias pré-parto aos 42 dias de lactação, em estudo sobre a indução de mastite experimental por *Escherichia coli*.

O envolvimento do Cu com o sistema antioxidante, pelas enzimas ceruloplasmina e CuZnSOD, o torna importante na defesa da glândula mamária contra infecções, além disso, a utilização de fontes orgânicas desse mineral torna-se interessante principalmente devido à redução na interação com antagonistas.

3.9 Selênio

O selênio é o micromineral essencial ligado à fertilidade e à prevenção de várias doenças (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Este mineral é componente da enzima glutatona peroxidase que atua como antioxidante convertendo peróxido de hidrogênio a água, além de fazer parte da iodotironina 5 deiodinase, enzima que converte T4 em T3 (NRC, 2001). Assim, o Se está envolvido com três funções básicas no organismo que são a defesa antioxidante, metabolismo do hormônio da tireóide e controle das reações celulares (MCDOWELL, 2003).

Grande parte do Se no organismo está presente como selenocisteína (SeCis), cujas funções são ativar as selenoproteínas, ou como selenometionina (SeMet), incorporada em proteínas que formam uma reserva biológica de Se. Antes de ser transformado SeCis, o Se (orgânico ou inorgânico) deve ser submetido a transformações metabólicas convertendo-se a seleneto (H_2Se) para posteriormente ser inserido nas selenoproteínas. Para ser incorporado em SeMet e em proteínas, o Se não precisa sofrer essas transformações intermediárias (JUNIPER et al., 2006; SILVESTRE et al., 2007).

No rúmen, o selênio consumido poderá ser incorporado à proteína microbiana pelos microorganismos ruminais, sendo desse modo absorvido no intestino como SeMet, ou deixar o rúmen e passar para o intestino na sua forma original (WEISS,

2005b). Neste contexto, a composição da dieta (relação volumoso/ concentrado) é um dos fatores que podem interferir na composição do Se que chega no intestino (GIERUS, 2007).

Existem diferenças nas formas de absorção com fontes orgânicas e inorgânicas de Se. O transporte do selenito (SeO_3) pelas bordas em escova intestinais ocorre por simples difusão, enquanto que o selenato (SeO_4) precisa de cotransportadores (Na^+ e OH^-), cabe ressaltar que uma parte do selenato se transforma em selenito no rúmen, assim grande parte do selenato consumido será absorvido por transporte passivo (WEISS, 2005b). As fontes orgânicas, selenocisteína e selenometionina, são absorvidas por mecanismo de transporte ativo de aminoácidos de forma análoga ao transporte de sulfatos (MCDOWELL, 2003).

A excreção ocorre por via urinária ou fecal (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999; Mcdowell, 2003). A excreção de Se biliar corresponde a 28% do Se consumido, no entanto, uma parte desse Se é reabsorvido, sendo o Se remanescente responsável por grande perda fecal (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). A excreção do Se depende da quantidade consumida ou administrada, da forma de administração (injetável ou dietética) e da fonte administrada (MCDOWELL, 2003).

A fonte mais comum utilizada na suplementação de Se inorgânico é o selenito de sódio (Na_2SeO_3) (Gierus, 2007) e o selenato de sódio (Na_2SeO_4) (WEISS, 2005b). Para a suplementação de fontes orgânicas podemos mencionar:

- Selênio Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (ORTMAN; PEHRSON, 1999; WEISS; HOGAN, 2005; JUNIPER et al., 2006; MALBE et al., 2006);
- Selenometionina (AWADEH et al., 1998);
- Selenocistina (WEISS, 2005b).

A fonte Se levedura é proveniente da fermentação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* as quais foram fornecidos melaço de cana e sais de Se. Durante a fermentação o Se é incorporado às células da levedura formando alguns compostos dos quais a SeMet é o mais prevalente, por este motivo existem diferenças na composição das fontes de Se levedura comerciais. A SeCis é produzida em menor escala pela levedura, e apesar das diferenças na composição das fontes comerciais, todas devem apresentar mais do que 2% de Se residual inorgânico (WEISS, 2005b).

Weiss e Hogan (2005) não observaram diferença ($P>0,05$) na CCS ao suplementar vacas com Se levedura dos 60 dias pré parto aos 30 dias de lactação. Ortman e Pehrson (1999) encontraram aumento de Se no leite com suplementação de leveduras enriquecidas com Se em vacas leiteiras.

O Se tem grande importância no sistema antioxidante por se componente estrutural da GSH-Px. A utilização de fontes orgânicas deste mineral pode ser de grande interesse na proteção da glândula mamária devido aos diferentes mecanismos de absorção e provável maior biodisponibilidade.

4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM FONTES ORGÂNICAS DE ZINCO, COBRE E SELÊNIO

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do fornecimento de fontes orgânicas de zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio para vacas leiteiras sobre a contagem de células somáticas (CCS), incidência de mastite subclínica, número de casos clínicos de mastite e concentração das enzimas superóxido dismutase (CuZnSOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e ceruloplasmina (CP). Dezenove vacas leiteiras, com prenhez confirmada, foram selecionadas por peso, escore de condição corporal (ECC), número de lactações, e produção de leite da lactação anterior, e distribuídas ao acaso em dois grupos para receber as fontes de Zn, Cu e Se orgânica (n=9) ou inorgânica (n=10). As dietas foram formuladas para suprir os requerimentos nutricionais dos animais dos 60 dias antes da data prevista do parto aos 80 dias de lactação. Amostras de sangue foram coletadas aos -60, -21, 1, 21, 40 e 80 dias para análises da concentração de CuZnSOD, GSH-Px e CP. Amostras de leite foram coletadas semanalmente a partir da 3ª semana de lactação para determinação de CCS, e nos dias 1 e 7 de lactação, e quando diagnosticados casos clínicos para cultura microbiológica. A incidência (novos casos de mastite subclínica) e total de casos de mastite subclínica foi menor para o grupo de vacas alimentadas com fontes orgânicas de Zn, Cu e Se em comparação com os animais que receberam fontes inorgânicas. A CCS durante os primeiros 80 dias de lactação foi menor ($P = 0,056$) para o grupo alimentado com Zn, Cu e Se orgânicos. A CCS média para o grupo de vacas inorgânico foi 237,370 céls./ml, enquanto o grupo orgânico apresentou média de 55,579 céls./ml. Não foram observados efeitos do fornecimento de fontes orgânicas de Zn, Cu e Se nas concentrações de CuZnSOD, GSH-Px e CP.

Palavras-chave: Ceruloplasmina. Contagem de células somáticas. Glutathiona peroxidase. Superóxido dismutase.

Antioxidant enzymes and somatic cell count in dairy cows fed organic source of zinc, copper and selenium

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the effects of dietary organic sources of zinc (Zn), copper (Cu) and selenium (Se) for dairy cows on somatic cell count (SCC), incidence of subclinical mastitis, number of clinical mastitis cases and the concentration of superoxide dismutase (CuZnSOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and ceruloplasmin (CP). Nineteen Holstein cows, with confirmed pregnancy, were selected by body weight, body condition score (BCS), number of lactation, and milk yield in the previous lactation, and randomly distributed among two groups to receive organic (n=9) and inorganic (n=10) source of Zn, Cu and Se. The diets were formulated to meet the nutritional requirements of animals from 60 days before the expected date of calving up to 80 days of lactation. Blood samples were collected at -60, -21, 1, 21, 40 and 80 days em relation to the expected day of calving for analysis of concentration of CuZnSOD, GSH-Px and CP. Milk samples were collected weekly after 15 days of lactation for determination of SCC, and at day 1, 7, and when a clinical case was diagnosed for microbiological culture. The incidence (new cases of subclinical mastitis) and total cases of subclinical mastitis was lower for group of cows fed with organic sources of Zn, Cu and Se in comparison to animals receiving inorganic sources. SCC average during the first 80 days of lactation was lower ($P = 0,056$) for the group fed Zn, Cu and Se organic. The SCC average for inorganic group cows was 237,370 cells/ml, while for the organic group average of SCC was 55,579 cells/ml. No effects of supply of Zn, Cu and Se as organic source were observed on the concentrations of CuZnSOD , GSH-Px and CP .

Keywords: Ceruloplasmin. Glutathione peroxidase. Somatic cell count. Superoxide dismutase.

4.1 Introdução

A adequada nutrição de minerais e vitaminas podem ser utilizados como estratégia para otimizar os mecanismos de defesa da glândula mamária contra a invasão de patógenos causadores de mastite (WEISS; WYATT, 2002). A suplementação mineral está envolvida com a redução no estresse oxidativo causado pelo aumento nas exigências metabólicas durante o parto (SPEARS; WEISS, 2008). O fornecimento de Zn, Cu e Se tem sido associado à redução na CCS e ao aumento na capacidade antioxidante da CuZnSOD, CP e GSH-Px, (WEISS; WYATT, 2002; WEISS, 2005).

As respostas à mastite resultam no influxo de células somáticas para o processo de fagocitose e neutralização de partículas imunogênicas, ocasionando aumento na produção de radicais livres que lesionam o tecido epitelial mamário, podendo resultar na redução de produção de leite (LIPPOLIS et al., 2006).

O Zn está envolvido em funções catalíticas, estruturais, atividades regulatórias, e tem funções em mais de 300 enzimas dos sistemas biológicos (SPEARS; WEISS, 2008). No sistema antioxidante, o Zn tem importante função como componente da Cu-ZnSOD, enzima que atua na redução de espécies de oxigênio reativas (ERO), sendo relacionado como elemento essencial no processo de defesa imune (PECHOVA et al., 2006).

O Cu atua como componente essencial da enzima CuZnSOD, que compõe um leque fisiológico de importantes metaloenzimas do sistema antioxidante (MCDOWELL, 2003). A CP é outra enzima envolvida com a proteção celular contra os efeitos potencialmente prejudiciais das ERO com a qual o Cu está envolvido (WEISS; WYATT, 2002).

O Se desempenha funções essenciais como micro-nutriente presente em todos os tecidos do corpo (SMITH et al., 1997). No sistema antioxidante, o Se é componente essencial da GSH-Px, enzima que degrada ERO. A GSH-Px atua na prevenção da peroxidação lipídica protegendo as membranas celulares contra danos oxidativos (SPEARS; WEISS, 2008).

Fontes orgânicas de minerais (complexados, aminoácidos quelatados e proteinatos) têm sido descritas como mais biodisponíveis quando comparados com fontes minerais inorgânicas, entretanto, poucos estudos foram avaliaram o efeito de fontes orgânicas de micromineirais sobre a saúde da glândula mamária e produção de leite, têm sido publicados (ASHMEAD; SAMFORD, 2004).

Siciliano-Jones et al. (2008) suplementaram vacas leiteiras a partir de três semanas pré-parto até 35 dias de lactação com fontes orgânicas de Zn, Mn, Cu e Co e relataram aumento na produção de leite, proteína e sólidos totais, mas não observaram alteração na composição e CCS. Griffiths et al. (2007), em estudo com suplementação de Zn, Mn e Cu como aminoácidos complexados para vacas em pastejo, observaram aumento na produção de leite, mas não identificaram diferenças sobre a CCS e composição. Contrariamente, Kinal et al. (2007) observaram redução na CCS com suplementação de Zn, Mn e Cu orgânicos para vacas durante 305 dias de lactação.

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do fornecimento de fontes orgânicas de Zn, Cu e Se para vacas leiteiras sobre a CCS, incidência de mastite sub-clínica, número de casos de mastite clínica, e concentrações de CuZnSOD, GSH-Px e CP nos eritrócitos.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido na Universidade de São Paulo, Laboratório de Pesquisas em Bovinos de Leite, de setembro de 2007 a agosto de 2008. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Bioética da Escola de Medicina Veterinária. Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso com dois tratamentos e medidas repetidas no tempo durante o período experimental. Dezenove vacas leiteiras, clinicamente saudáveis, seis primíparas, peso corporal médio 614,34 (\pm

68,07) kg, e treze multíparas, peso médio 647,85 (\pm 60,05) kg, com prenhez confirmada (7 meses de gestação), foram selecionadas para este estudo. Os animais foram pareados de acordo com o número de partições, peso corporal, escore de condição corporal e produção de leite da lactação anterior para as multíparas. As vacas foram alojadas em baias individuais e selecionadas ao acaso para compor um dos dois grupos que receberam fontes orgânicas e inorgânicas de Zn, Cu e Se, 60 dias antes da data prevista do parto (-60 d) aos 80 dias de lactação.

4.2.2 Dietas Experimentais

Todos os animais dos dois grupos receberam uma única dieta basal, formulada segundo recomendações do NRC (2001) (Tabela 3), para atender as exigências dos animais segundo sua fase de gestação e lactação: a) vacas secas: -60 aos -29 dias antes da data prevista de parto; b) vacas secas pré-parto: -28 dias antes da data prevista de parto até o dia do parto; c) lactação: 1 aos 80 dias de lactação.

Tabela 3- Proporção de ingredientes e composição das dietas, de acordo com o período de gestação e lactação das vacas leiteiras

| Ingredientes (%MS) | Vacas secas (-60 a -29 dias) | Vacas secas pré-parto (-28 a 0 dias) | Lactação (1 a 80 dias) |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Silagem de milho | 79,94 | 74,28 | 47,06 |
| Milho moído | 11,05 | 14,22 | 28,78 |
| Farelo de soja | 7,04 | 9,88 | 21,29 |
| Uréia | 0,98 | 0,79 | 0,48 |
| Bicarbonato de sódio | ----- | ----- | 0,72 |
| Macro-minerais | 0,82 | 0,63 | 1,50 |
| Micro-minerais | 0,16 | 0,20 | 0,18 |
| Nutrientes (%MS) | | | |
| PB | 13,9 | 14,8 | 18,1 |
| EE | 2,7 | 2,7 | 2,8 |
| FDN | 41,7 | 39,5 | 30,7 |
| FDA | 20,8 | 19,7 | 15,0 |
| CNF | 36,9 | 38,6 | 43,0 |
| EL (Mcal/Kg de MS) | 1,01 | 1,03 | 1,80 |
| Macro-minerais (g/dia) | | | |
| Ca | 48,00 | 44,30 | 96,50 |
| P | 40,50 | 42,40 | 69,80 |
| Mg | 30,50 | 30,80 | 47,00 |
| Cl | 35,20 | 32,10 | 61,60 |
| K | 135,80 | 142,40 | 193,90 |
| Na | 13,50 | 11,40 | 48,80 |
| S | 21,40 | 21,80 | 34,50 |
| Micro-minerais (mg/dia) | | | |
| Zn | 572,67 | 660,36 | 902,41 |
| Cu | 210,63 | 252,12 | 326,56 |
| Se | 3,81 | 4,79 | 5,86 |
| Mn | 534,17 | 590,44 | 718,70 |
| I | 4,80 | 6,00 | 7,20 |
| Co | 2,30 | 2,59 | 2,77 |
| Fe | 1226,46 | 1289,69 | 1777,19 |
| Vitaminas (IU/Kg MS) | | | |
| Vitamina A | 66,90 | 83,70 | 100,40 |
| Vitamina D | 18,20 | 22,80 | 27,40 |
| Vitamina E | 972,00 | 1215,00 | 1458,00 |

PB – proteína bruta; EE – extrato etéreo; FDN – Fibra em detergente neutro, FDA – Fibra em detergente ácido; CNF – Carboidratos não fibrosos; EL – energia líquida ; Ca – cálcio; P – fósforo; Mg – magnésio; Cl – cloro; K – potássio; Na – sódio; S – enxofre; Zn – zinco; Cu – cobre; Se – selênio; Mn – manganês; I – iodo; Co – cobalto; Fe - ferro

Os tratamentos consistiram no fornecimento de uma mistura de micro-minerais com fontes orgânicas de Zn, Cu e Se (carboaminofosfoquelatos, TORTUGA, Companhia Zootécnica Agrária, São Paulo, SP, Brasil), e fontes inorgânicas de Zn, Cu e Se (sulfatos). Para os dois tratamentos, a mistura mineral também foi constituída por fontes inorgânicas de manganês (Mn), iodo (I), cobalto (Co), e vitaminas A, D e E (Tabela 4). As quantidades de micro-minerais (mg/dia) e vitaminas (UI) fornecidas aos dois grupos foram idênticas. As misturas micro-minerais com diferentes fontes de Zn, Cu e Se foram previamente pesadas e embaladas em sacos de papel, administrados diretamente no esôfago duas vezes ao dia. As vacas foram alimentadas “*ad libitum*” duas vezes ao dia, com os demais ingredientes na forma de ração total (TMR). O consumo individual de matéria seca foi calculado individual e diariamente mantendo-se as sobras entre 5 a 10% do total fornecido. Após o início da lactação, os animais foram ordenhados duas vezes ao dia e a produção diária de leite registrada diariamente.

Tabela 4- Composição da mistura de micro-minerais e vitaminas contendo fontes orgânicas e inorgânicas de Zn, Cu e Se

| Micromineral | Vacas secas (-60 a -29 dias) | Vacas secas pré-parto (-28 a 0 dias) | Lactação (1 à 80 dias) |
|----------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Zn (mg/kg) | 252,00 | 315,00 | 378,00 |
| Cu (mg/kg) | 144,00 | 180,00 | 216,00 |
| Se (mg/kg) | 3,60 | 4,50 | 5,40 |
| Mn (mg/kg) | 196,00 | 240,00 | 288,00 |
| I (mg/kg) | 4,80 | 6,00 | 7,20 |
| Co (mg/kg) | 1,32 | 1,65 | 1,98 |
| Vitamin A (UI) | 66,92 | 83,65 | 100,38 |
| Vitamin D (UI) | 18,24 | 22,80 | 27,36 |
| Vitamin E (UI) | 972,00 | 1215,00 | 1458,00 |

Zn – zinco; Cu – cobre; Se – selênio; Mn – manganês; I – iodo; Co – cobalto

4.2.3 Coleta de amostras e análises laboratoriais

Foram realizadas coletas de sangue aos -60, -21, 1, 21, 40 e 80 dias em relação a data esperada do parto para realização das análises de CuZnSOD, GSH-Px e CP.

Para determinação da GSH-Px e CuZnSOD, o sangue foi coletado em tubos com vácuo e heparina através da punção da veia coccígea. As amostras foram imediatamente transportadas ao laboratório onde foram centrifugadas por 15 min a 3000 rpm em centrífuga (Sorvall® Legend Mach 1.6 R, USA) refrigerada (4°C). O plasma e as células brancas sanguíneas foram removidos, e em seguida foram realizadas três sucessivas lavagens nos eritrócitos com solução salina tamponada. Após este procedimento, as células vermelhas do sangue foram armazenadas por até 30 dias em micro-tubos âmbar à -80°C até o momento do seu processamento.

Na determinação da GSH-Px foi utilizada a metodologia proposta por Paglia e Valentine (1967), realizada com *kits* comerciais (Ransel, Laboratorios Randox, UK). Da mesma forma, a CuZnSOD foi determinada com *kits* comerciais (Ransod, Laboratorios Randox, UK) pela inibição da produção de *formazan* na reação colorimétrica (SUTTLE; MCMURRAY, 1983). Os resultados foram expressos em unidades por grama de hemoglobina tanto para CuZnSOD quanto para GSH-Px, e para tanto foi necessária à determinação da hemoglobina por espectrofotometria, utilizando-se o *kit* comercial para hemoglobina (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brasil), pelo método da cianometahemoglobina.

Para as análises de CP, o sangue foi coletado em tubos com vácuo sem anticoagulante, centrifugado a 3000 rpm por 10 min, o soro foi separado e armazenado a -20°C até o momento da realização das análises. A CP foi determinada por espectrofotometria com posterior leitura em absorbância de 540 nm, seguindo metodologia descrita por Schoslnsky et al. (1974).

Amostras de leite para determinação da CCS, foram coletadas 15 dias após o início da lactação, durante a ordenha da manhã e armazenadas em frascos plásticos contendo o conservante bronopol (Broad Spectrum Microtabs II, D & F Control Systems Inc., Chaska, MN, USA). A CCS foi determinada pelo método de contagem celular

fluoro-opto-eletrônico (Somacount 300, Bentley, Instrument Inc., Chaska, MN, USA), e os resultados foram convertidos em escala logarítmica (Log CCS) para as análises estatísticas.

Casos clínicos de mastite foram definidos pela presença de anormalidades no leite sugestivos de inflamação da glândula mamária, como flocos, coágulos, ou outro aspecto incomum. A detecção de mastite clínica foi realizada durante todas as ordenhas.

A vaca foi considerada com mastite subclínica quando sinais clínicos não estavam presentes e a CCS foi >200.000 células/ml, com ou sem isolamento do patógeno. O número de vacas infectadas foi então somado para obter o número de casos de mastite subclínica por vaca durante o período experimental. Uma variável denominada casos de mastite subclínica foi criada para descrever a saúde do úbere das vacas por semana durante o período experimental. Novos casos de infecção foram definidos pela alteração na CCS de <200.000 para de $> 200\ 000$ células/ml. Para ser considerada nova infecção, foi necessário no mínimo um teste com mastite subclínica negativo na semana anterior.

Para a cultura microbiológica, foram coletadas amostras de leite nos dias 1 e 7 após o parto, quando foi diagnosticado caso clínico e, quando um quarto mamário apresentou CMT (California Mastitis Test) positivo, realizado uma vez por semana durante a ordenha da manhã. As amostras para cultura microbiológica foram coletadas assepticamente e o exame bacteriológico realizado conforme recomendado pelo National Mastitis Council (NMC, 1999). Culturas com mais de uma espécie de bactéria isolada foram excluídas da análise dos dados.

4.2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas para CCS e concentrações de CuZnSOD, GSH-Px, e CP foram realizadas considerando os efeitos principais do tratamento, tempo e interação entre tratamento e tempo, em delineamento inteiramente casualizado e medidas repetidas no tempo, pelo PROC MIXED do software SAS (1999). Neste

modelo foi considerado o critério de informação AIC (Akaike's Information Criterion) para encontrar a estrutura de covariância, e a correlação autorregressiva de primeira ordem foi a de melhor ajuste para todos os modelos. Foi utilizada transformação logarítmica (\log_{10}) na CCS, CuZnSOD e GSH-Px para normalizar a distribuição dos dados.

Para analisar a associação entre o número de casos de mastite subclínica e novos casos de mastite subclínica por tratamento, foi utilizado o procedimento GENMODE do software SAS versão 8.0. Em razão da baixa ocorrência de casos clínicos, não possível realizar a análise estatística desta variável.

4.3 Resultados

4.3.1 Saúde da glândula mamária

A incidência (novos casos de mastite subclínica) ($P=0.033$) e o total de casos de mastite subclínica ($P=0.038$) foi menor para o grupo de vacas alimentadas com fontes orgânicas de Zn, Cu e Se (Tabela 5) em comparação animais recebendo dieta com fontes inorgânicas.

Tabela 5- Número de total de casos de mastite subclínica, ocorrência de novos casos de infecção de mastite subclínica, e número total de casos de mastite clínica durante o período experimental

| Parâmetros de saúde da glândula mamária | Fontes de Zn, Cu e Se | | P ¹ |
|---|-----------------------|------------|----------------|
| | Orgânica | Inorgânica | |
| Novos casos de infecção de mastite subclínica | 1 | 8 | 0,014 |
| Número de vacas com CCS > 200,000 cells/ml | 1 | 13 | 0,001 |
| Casos clínicos | 2 | 4 | - |
| Total de vacas testadas | 9 | 10 | - |

¹Análise estatística realizada pelo teste do qui-quadrado

Para o grupo de vacas alimentadas com fontes orgânicas de Zn, Cu e Se o *Staphylococcus aureus* foi o agente causador de uma infecção intramamária, enquanto para o grupo inorgânico o agente predominante foi *Staphylococcus coagulase negativo* (Tabela 6).

Tabela 6- Patógenos causadores de mastite isolados da glândula mamária de vacas com mastite clínica ou subclínica durante o período experimental

| Patógeno | Orgânico (n) | Inorgânico (n) |
|--|--------------|----------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 |
| <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> | 0 | 4 |
| <i>Enterobacter</i> sp, | 0 | 1 |
| Levedura | 0 | 1 |
| Total | 1 | 7 |

A CCS média durante os 80 primeiros dias de lactação foi menor ($P=0.056$) para o grupo de vacas que recebeu Zn, Cu e Se como fonte orgânica (Tabela 7). A média de

CCS para vacas do grupo inorgânico foi de 237.370 céls./ml, enquanto o grupo orgânico apresentou média CCS de 55.579 céls./ml.

Tabela 7- Efeitos das fontes orgânicas e inorgânicas de Se, Zn and Cu sobre as concentrações da superoxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), CCS e ceruloplasmina em vacas leiteiras

| Variável | Fontes de Zn, Cu e Se | | | P^2 | | |
|-------------------|-----------------------|------------|------------------|-------------------|-------|---------------------------|
| | Orgânico | Inorgânico | EPM ¹ | Trat ³ | Tempo | Trat X Tempo ⁴ |
| GSH-Px (U/g Hb) | 450,39 | 485,54 | 18,29 | 0,276 | 0,065 | 0,964 |
| Cu-ZnSOD (U/g Hb) | 3147,38 | 3324,54 | 103,25 | 0,475 | 0,05 | 0,968 |
| CP (U/ml) | 0,014 | 0,012 | 0,0007 | 0,194 | 0,678 | 0,212 |
| CCS (1000/ml) | 55.579 | 237.370 | 41,36 | 0,056 | 0,632 | 0,647 |

¹Erro padrão da média; ²probabilidade; ³tratamento, ⁴interação entre tratamento e tempo

4.3.2 Concentração de GSH-Px, CuZnSOD e CP

Não foram observados efeitos do fornecimento de fonte orgânica de Zn, Cu e Se sobre as concentrações de CuZnSOD ($P=0,475$), GSH-Px ($P=0,276$) e CP ($P=0,194$) (Tabela 7). Da mesma forma, não foi verificado efeito da interação entre tempo e tratamento sobre CuZnSOD ($P=0,968$), GSH-Px ($P=0,964$) e CP ($P=0,212$), e efeito de tempo sobre GSH-Px ($P=0,065$) e CP ($P=0,678$). Foi observado efeito do tempo sobre a concentração de CuZnSOD ($P=0,05$).

4.4 Discussão

4.4.1 Saúde da glândula mamária

No presente estudo, tanto o número total de casos de mastite subclínica quanto a ocorrência de novas infecções subclínicas foi menor para os animais alimentados com fontes orgânicas de Zn, Cu e Se em comparação com o grupo de vacas alimentadas com fontes inorgânicas daqueles micro-minerais. Tais resultados indicam que houve aumento da capacidade de resposta imune e melhora da saúde da glândula mamária, quando as vacas foram alimentadas com fonte orgânica de Zn, Cu e Se. Poucos foram os trabalhos que avaliaram efeito do fornecimento de diferentes fontes de micro-minerais sobre o número de casos clínicos, subclínicos, graus de infecção e agentes causadores de mastite. Whitaker et al. (1997) ao suplementarem Zn orgânico (proteinato) para vacas holandesas, 3 semanas pré-parto aos 100 dias de lactação, não observaram diferença significativa ($P > 0.05$) no número de casos clínicos e sub-clínicos de mastite, novas infecções, tipo de microorganismo isolado e CCS.

A mastite é uma doença que acarreta grandes perdas na produção de leite (SCHUKKEN et al., 2003). O período de transição, 21 dias pré-parto aos 21 dias de lactação, abrangido neste estudo, é crítico para ocorrência de novos casos de mastite, sendo um dos principais grupos de agentes causadores o *Staphylococcus* coagulase-negativo (PYORALA, 2008). No presente estudo houve predominância de *Staphylococcus* coagulase-negativo como agente causador de mastite para o grupo inorgânico, e apenas um caso de mastite teve como causa *Staphylococcus aureus* para o grupo orgânico.

A CCS é utilizada de forma indireta para monitorar a saúde da glândula mamária e a qualidade do leite. Quando a CCS individual está acima de 200.000 céls./ml de leite, considera-se que a vaca apresenta mastite subclínica (PYORALA, 2003; SCHUKKEN et al., 2003). No presente estudo, além do menor número de casos de mastite, verificou-se redução na CCS ($P = 0.056$) para o grupo de vacas que receberam fonte orgânica de Zn,

Cu e Se, quando comparada com o grupo que recebeu a fonte inorgânica. A média da CCS do grupo de vacas do tratamento inorgânico (237.370 céls./ml) foi 4,2 vezes maior que a média do grupo tratamento orgânico (55.579 céls./ml).

Estudos sobre o efeito da suplementação de fontes orgânicas de micro-minerais sobre a CCS, produção e composição do leite têm apresentado resultados variáveis. Griffiths et al. (2007) não observaram efeito do fornecimento de fonte orgânica de Zn, Mn e Cu sobre a CCS de vacas manejadas em pastejo dos 35 dias pré parto aos 230 dias pós-parto. Ballantine et al. (2002) utilizando fonte orgânica de Zn, Mn, Cu para vacas de alta produção dos 21 dias antes do parto aos 250 dias de lactação, também não observaram redução da CCS, entretanto, foi identificado efeito significativo sobre a produção, proteína e gordura do leite. Siciliano-Jones et al. (2008) não encontraram diferença na CCS, produção e composição do leite de vacas primíparas entre 21 dias pré-parto e 35 dias de lactação, com o fornecimento de fontes orgânicas de Zn, Mn, Cu e Co. De maneira similar, diversos autores também não relataram efeito da suplementação de diferentes fontes orgânicas de micro-minerais para vacas leiteiras sobre a contagem de células somáticas (CAMPBELL et al., 1999; UCHIDA et al., 2001; NOCEK et al., 2006)

Os efeitos da suplementação de micro-minerais sobre a CCS foram demonstrados por Kinal et al. (2007), que ao suplementarem vacas, desde 6 semanas pré-parto até 305 dias de lactação com Zn, Cu e Mn na forma orgânica (bioplexos), observaram redução de 22 e 34% na CCS, para o grupo suplementado com 50 e 100% desses micro-minerais na forma orgânica, respectivamente. Estes resultados foram similares aos encontrados no presente estudo, uma vez que o grupo de vacas alimentadas com 100% de Zn, Cu e Se na forma orgânica apresentou CCS 76,7% inferior ao grupo que recebeu fonte inorgânica. Cunha Filho et al. (2007) verificaram redução na CCS com a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de Zn orgânico, contudo não foram utilizadas outras fontes de zinco para suplementar o grupo controle, o que sugere que a baixa contagem de CCS possa ter sido causada pelo maior aporte de zinco para o grupo tratamento. Da mesma forma, Pechova et al. (2006) observaram redução na CCS dos animais suplementados com Zn orgânico, mas não verificaram alteração na CCS das vacas sem suplementação. Outros autores (KINAL et

al., 2005) também reportam a redução na CCS com a utilização de diferentes fontes de microminerais.

4.4.2 GSH-Px, CuZnSOD e CP

O fornecimento de Zn, Cu e Se orgânicos para vacas holandesas não alterou as concentrações de CuZnSOD (P=0,475), GSH-Px (P=0,276) e CP (P=0,194). No combate à formação das ERO, a primeira enzima envolvida é a CuZnSOD, que converte o ânion superóxido em peróxidos. A GSH-Px remove os peróxidos produzidos pela CuZnSOD convertendo-os em água (VAZQUEZ-ANON et al., 2008). Outra enzima presente no combate as ERO é a CP, que atua como inibidor sérico da peroxidação lipídica (CASTILLO et al., 2001).

Alguns estudos relatam resultados não significativos da utilização de fontes orgânicas de microminerais sobre a concentração plasmática de GSH-Px. Gunter et al. (2003) ao suplementarem vacas de corte com fontes de Se orgânico e inorgânico, observaram aumento no Se plasmático, mas não observaram aumento na GSH-Px. Knowles et al. (1999), entretanto, observaram aumento das concentrações séricas de glutathione total EM vacas leiteiras suplementadas com Se quando comparadas aos animais sem suplementação, mas não verificaram efeito da fonte de Se sobre as glutathionas e a CCS. Hamed et al. (2008) observaram aumento nas concentrações de CuZnSOD e GSHPx e correlacionaram estes parâmetros com o aumento na CCS, porém estas enzimas foram analisadas diretamente no leite, diferentemente do presente estudo, cuja análises de CuZnSOD e GSH-Px foi realizada nos eritrócitos. Apesar da semelhança com os resultados do presente estudo, torna-se difícil à comparação das concentrações de GSH-Px relatadas na literatura consultada, devido às diferenças raciais, produtivas, de manejo e experimentais.

Malbe et al. (2006) observaram aumento da atividade de GSH-Px no leite de animais com mastite por *Staphylococcus aureus* suplementados com Se orgânico em relação às vacas que não receberam suplementação do micro-mineral. Os autores verificaram possível envolvimento do Se com a inibição do crescimento deste patógeno

no leite dos animais com mastite estafilocócica, sugerindo que a maior proteção das vacas contra infecções causadas por *S. aureus* possa estar relacionada com o aumento sérico da GSH-Px.

De forma semelhante ao presente estudo, Du et al. (1996) observaram efeito da fonte mineral na concentração plasmática de CP em vacas leiteiras com suplementação de Cu orgânico (proteinato) e inorgânico (sulfato) durante 60 dias.

Durante o período de transição, o estresse fisiológico sofrido pelo animal, associado à rápida diferenciação no parênquima secretório, intenso crescimento da glândula mamária, início da síntese e secreção de leite são responsáveis pelo aumento nos requerimentos de oxigênio e, resultando em maior produção de ERO (SORDILLO, 2005). Outros fatores podem estar envolvidos com o estresse metabólico, como a época do ano, temperatura e escore de condição corporal (BERNABUCCI et al., 2002; 2005; COLITTI; STEFANON, 2006). No presente estudo, o efeito significativo de tempo sobre CuZnSOD ($P=0,05$), pode ter ocorrido pelo maior aporte de micro-minerais consumido pelos animais após o início do tratamento, associado à função desintoxicante da CuZnSOD durante o período de transição.

Além da redução na formação de ERO, devido ao aumento no aporte de enzimas antioxidantes, outros mecanismos podem estar envolvidos com a redução da CCS. Kinal et al. (2007) relacionaram a redução da CCS à rápida formação de queratina no canal do teto proporcionada pelo fornecimento de Zn orgânico.

De acordo com as condições do presente estudo, o fornecimento de micro-minerais orgânicos (Zn, Cu e Se) não teve influência sobre sistema enzimático antioxidante, avaliado pelas enzimas CuZnSOD, GSHPx e CP, mas foi eficiente em reduzir o número de casos de mastite subclínica, incidência de mastite subclínica e CCS. A fonte de micro-minerais orgânica pode ter relação com outros mecanismos de defesa da glândula mamária, além do mecanismo antioxidante.

4.5 Conclusão

Com base nos resultados do presente estudo é possível concluir que o fornecimento de fonte de Zn, Cu e Se na forma orgânica foi associado à redução na CCS e no número de casos de mastite subclínica, mas não alterou na concentração sérica da superóxido dismutase, glutatona peroxidase e ceruloplasmina.

5 CONSUMO DE ALIMENTOS, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEITE DE VACAS HOLANDESAS ALIMENTADAS COM ZINCO, COBRE E SELÊNIO ORGÂNICOS

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do fornecimento de fontes orgânicas de zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio (Se) para vacas leiteiras sobre o consumo de alimentos, concentração plasmática de Zn, Cu e Se, produção e composição de leite, e variações de peso e escore de condição corporal. Dezenove vacas holandesas, com prenhez confirmada, foram selecionadas com base no peso, escore de condição corporal (ECC), número de lactações, e produção de leite da lactação anterior, e distribuídas ao acaso em dois grupos para receber fontes orgânica (n=9) de Zn, Cu e Se ou inorgânica (n=10). As dietas foram formuladas para atender os requerimentos nutricionais dos animais dos 60 dias antes da data prevista do parto aos 80 dias de lactação. Amostras dos alimentos fornecidos e das sobras foram coletadas para posterior análises de composição. Avaliações do ECC e do peso corporal (PC) foram realizadas ao início, no dia do parto, ao fim do experimento, e uma vez por semana durante todo o período experimental. Amostras de sangue foram coletas aos 60 dias antes da data prevista de parto, e no 1º, 40º e 80º dias de lactação para análises de Zn, Cu e Se plasmático. A produção de leite foi registrada diariamente e para as análises de composição, o leite foi coletado uma vez por semana, após 15 dias do início de lactação. Não houve diferença entre o consumo de nutrientes, a concentração plasmática de Zn, Cu e Se, a produção e composição de leite, o ECC, mudança de ECC e PC dos dois grupos, no entanto, foi observado efeito da fonte sobre a mudança de PC.

Palavras-chave: Cobre. Fontes. Selênio. Zinco

FEED INTAKE, MILK YIELD AND COMPOSITION OF HOLSTEIN COWS FED WITH ZINC, COPPER AND SELENIUM ORGANIC

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the effects of organic sources of zinc (Zn), copper (Cu) and selenium (Se) fed to dairy cows on feed intake, Zn, Cu and Se plasma concentration, milk production and composition, and changes in body weight and body condition score. Nineteen Holstein cows, with confirmed pregnancy, were selected by body weight (BW), body condition score (BCS), number of lactation, and milk yield in previous lactation, and randomly distributed among two groups to receive organic (n=9) or inorganic (n=10) sources of Zn, Cu and Se. The diets were formulated to meet the nutritional requirements of animals from 60 days before the expected date of calving up to 80 days of lactation. Feed samples and leftovers were collected for composition analysis. Body condition score (BCS) and body weight (BW) evaluations were performed at the beginning and at end of the experiment, at calving day, and once a week throughout the experimental period. Blood samples were collected at 60 days before the expected date of calving, and at 1, 40 and 80 days of lactation for plasma concentrations analysis of Zn, Cu and Se. Milk yield was recorded daily, and milk samples were collected once a week, 15 days after the beginning of lactation, for composition analysis. No difference on nutrients intake, plasma concentration of Zn, Cu and Se, milk yield and composition, BCS, changes on BCS and BW were observed in both groups, however, a significant effect of source on BW changes was observed.

Keywords: Copper. Selenium. Sources. Zinc

5.1 Introdução

Os micro-minerais zinco (Zn), cobre (Cu) e selênio (Se) participam de inúmeras reações celulares relacionadas à síntese protéica, ao metabolismo de vitaminas, e ao sistema imune (SICILIANO-JONES et al., 2008). A suplementação destes micro-minerais pode afetar o desempenho e a saúde de vacas em vários aspectos como os reprodutivos, a função imune do animal e a lactação (GRIFFITHS et al., 2007). Desta forma, a adequada nutrição de minerais e vitaminas pode ser utilizada para otimizar a saúde e a produção de vacas leiteiras (ASHMEAD; SAMFORD, 2004).

O Zn desempenha importante papel na síntese de DNA e RNA, aumentando a replicação e proliferação de celular (SPEARS; WEISS, 2008), e funções catalíticas, estruturais e regulatórias (PECHOVA et al., 2006). O Cu tem funções fisiológicas ligadas à respiração celular, à formação óssea, as funções cardíacas, ao desenvolvimento do tecido conectivo, à mielinização da medula espinhal e aos processos de queratinização e pigmentação (MCDOWELL, 2003). O Se está envolvido principalmente com a defesa antioxidante do organismo e o metabolismo do hormônio da tireóide (MCDOWELL, 2003).

Tradicionalmente, os minerais são fornecidos como sais inorgânicos na alimentação animal (UCHIDA et al., 2001). Atualmente, tem havido crescente interesse no fornecimento de fontes orgânicas de minerais, que tem como premissa reduzir a interação entre elementos minerais no rúmen, o que evita a formação de complexos insolúveis e a redução da absorção intestinal (SPEARS, 1996).

Vacas leiteiras necessitam consumir quantidades de minerais e vitaminas biologicamente ativas para manter seu “status” antioxidante ótimo (WEISS, 2005). Assim, a utilização de minerais orgânicos (complexados, aminoácidos quelatados e proteinatos) descritos como mais biodisponíveis (SPEARS, 1996; SPEARS, 2003) quando comparados com fontes inorgânicas, pode ser uma importante ferramenta na maximização da produção de leite.

Ballantine et al. (2002) em estudo com suplementação de Zn, manganês (Mn), Cu e cobalto (Co) orgânicos 21 dias antes do parto a 250 dias de lactação observaram

aumento na produção de leite e de leite corrigido para 3,5% de gordura. Uchida et al., (2001) utilizando suplementação de Zn, Mn e Cu orgânicos (aminoácidos complexados), não observaram efeito sobre a produção e composição de leite e escore de condição corporal do animal.

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do fornecimento de fontes orgânicas de Zn, Cu e Se para vacas leiteiras sobre o consumo de alimentos, concentração plasmática de Zn, Cu e Se, produção e composição de leite, e variações de peso e escore dos animais.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Delineamento experimental e dietas experimentais

A descrição detalhada do delineamento experimental e das dietas utilizadas encontra-se descritas no item 4.2.1 e 4.2.2 desta dissertação. A composição bromatológica das dietas e dos concentrados estão apresentados nos anexos A e B.

5.2.2 Consumo e análise de alimentos

A silagem de milho, os concentrados e as sobras foram pesados diariamente para estimativa do consumo individual. A quantidade fornecida desses alimentos foi calculada de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras entre 5 a 10%. Amostras dos alimentos fornecidos e das sobras foram coletadas e armazenadas (-20°C) até o momento da realização das análises.

Os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e lignina foram analisados de acordo com as metodologias descritas

por Silva e Queiroz (2002). O teor de proteína bruta obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25 (SILVA; QUEIROZ, 2002).

As análises para determinação dos teores de fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido (FDA) foram realizadas conforme a metodologia descrita por Van Soest e Mason, (1991), utilizando-se α -amilase e sem adição de sulfito de sódio na determinação de FDN (A.O.A.C., 1990).

Os carboidratos totais (CT) foram estimados conforme metodologia de Snifen et al. (1992), onde: $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$. Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram calculados segundo metodologia de Hall (2000), onde: $CNF = [(\%PB - \%PB_{uréia} + \%uréia) + \%EE + \%MM + \%FDN]$ e os nutrientes digestíveis totais (NDT) estimados conforme metodologia descrita pelo NRC (2001), onde: $NDT = PB\% + (2.25 \times EE\%) + FDN\% + CNF\% - 7$.

O cálcio (Ca) e o potássio (K) foram determinados por espectrometria de absorção atômica, e o fósforo (P) por colorimetria segundo metodologias descritas no Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES, 2005). Os microminerais Zn e Cu foram analisados por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) conforme metodologia descrita pela A.O.A.C. (1994).

5.2.3 Análises de Zn, Cu e Se no plasma

Foram realizadas coletas de sangue aos 60 dias antes da data prevista de parto, e aos 1, 40 e 80 dias de lactação para as análises de Zn, Cu e Se. As amostras foram coletadas em tubos com vácuo e heparina através da punção da veia coccígea, centrifugadas em 15000 rpm por 15 min, e o plasma foi separado e armazenado à -20°C até o momento das análises.

A determinação da concentração de selênio no plasma foi realizada após a digestão úmida com ácido perclórico 70% e posterior leitura fluorimétrica, seguindo-se a sensibilização por diamino-naftaleno (OLSON et al., 1975). As análises para determinação da concentração plasmática de Zn e Cu foram realizadas segundo metodologia descrita por Fick et al. (1979).

5.2.4 Produção e Composição de leite

Após o início da lactação, os animais foram ordenhados duas vezes ao dia e a produção registrada diariamente. A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC) foi calculada segundo fórmula descrita por (SKLAN et al., 1994).

Para as análises de composição, o leite foi coletado uma vez por semana, após 15 dias do início de lactação, durante o período da manhã, em tubos plásticos com bronopol (Broad Spectrum Microtabs II, D & F Control Systems Inc., Chaska, MN, USA), como conservante. Os teores de gordura, lactose, proteína, extrato seco desengordurado (ESD) e sólidos totais (ST), foram determinados por absorção infravermelha (Bentley 2000, Bentley, Instrument Inc., Chaska, MN, USA).

5.2.5 Avaliação do escore de condição corporal e peso corporal

As avaliações do escore de condição corporal (ECC) e do peso corporal (PC) foram realizadas ao início, no dia do parto, ao fim do experimento, e uma vez por semana durante todo o período experimental.

O PC foi obtido logo após a ordenha da manhã, utilizando-se a fita de pesagem para bovinos leiteiros, pela avaliação do perímetro torácico do animal. A mensuração do ECC foi realizada segundo metodologia proposta por Wildman et al. (1982), desenvolvida por Edmonson et al. (1989), que se baseia em avaliações visuais e táteis das reservas corporais em pontos específicos do corpo da vaca, adotando-se uma escala de 1 a 5, com subunidades de 0,25 pontos, independente do peso corporal ou do tamanho (altura, perímetro torácico, comprimento) (WILDMAN et al., 1982; EDMONSON et al., 1989).

5.2.6 Análises estatísticas

Todas as variáveis de consumo, produção de leite, composição de leite, concentração plasmática de Zn, Cu e Se, ECC, PC, mudança de escore corporal (MECC) e mudança de peso (MP), nos períodos pré-parto e lactação, foram analisadas considerando-se os efeitos de tratamento, tempo, e interação entre tempo e tratamento com medidas repetidas no tempo, pelo PROC MIXED do software SAS (SAS, 1999), considerando-se o critério de informação AIC (Akaike's Information Criterion). Os dados de ECC, PC, MECC e MP das primeiras 24 horas pós-parto foram submetidos a análise de variância e ao teste de médias (Tukey) do software SAS (SAS, 1999), considerando o nível de significância de 5%. Para avaliação da mudança de peso corporal, antes e após do parto, foi considerado o efeito do peso no início do experimento como covariável.

5.3 Resultados

5.3.1 Consumo de alimentos

Não foram observados efeitos do fornecimento de Zn, Cu e Se orgânicos e das interações entre tempo e tratamento sobre os consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro, carboidratos não fibrosos, carboidratos totais, extrato etéreo, nutrientes digestíveis totais, energia líquida, cálcio, fósforo, potássio, Zn, Cu e Se nos períodos pré-parto (Tabelas 11 e 12; Anexos C e D) e pós-parto (Tabelas 13 e 14; Anexos E e F). Foi observado efeito linear de tempo sobre todas as variáveis de consumo.

Tabela 11- Efeito de fonte de Zn, Cu e Se, tempo e interação entre tempo e fonte sobre o consumo de matéria seca (CMS kg/d), consumo de matéria seca em porcentagem do peso vivo (CMS%PV), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CFN), carboidratos totais (CT), extrato etéreo (EE), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida (EL), no período pré-parto

| | Probabilidade | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| | CMS (kg/d) | CMS (%PV) | MO (kg/d) | PB (kg/d) | FDN (kg/d) | CFN (kg/d) | CT (kg/d) | EE (kg/d) | MM (kg/d) | NDT (kg/d) | EL (Mcal/d) |
| Fonte ¹ | 0,718 | 0,382 | 0,702 | 0,915 | 0,835 | 0,539 | 0,689 | 0,514 | 0,965 | 0,708 | 0,707 |
| Tempo | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 |
| Fonte x Tempo ² | 0,453 | 0,648 | 0,477 | 0,514 | 0,486 | 0,159 | 0,384 | 0,951 | 0,086 | 0,428 | 0,424 |

¹ Tipo de fonte mineral (orgânica ou inorgânica); ² Interação entre tempo e fonte

Tabela 12- Efeito de fonte de Zn, Cu e Se, tempo e interação entre tempo e fonte sobre o consumo de Ca, P, K, Zn, Cu, no período pré-parto

| | Probabilidades | | | | |
|----------------------------|----------------|------------|------------|--------------|--------------|
| | Ca (g/d) | P (g/d) | K (g/d) | Zn (mg/d) | Cu (mg/d) |
| Fonte ¹ | 0,762 | 0,905 | 0,726 | 0,562 | 0,936 |
| Tempo | <,001 | 0,003 | <,001 | 0,001 | <,001 |
| Fonte x Tempo ² | 0,254 | 0,917 | 0,323 | 0,864 | 0,924 |

¹ Tipo de fonte mineral (orgânica ou inorgânica); ² Interação entre tempo e fonte

Tabela 13- Efeito de fonte, tempo e interação entre tempo e fonte sobre o consumo de matéria seca (CMS kg/d), consumo de matéria seca em porcentagem do peso vivo (CMS%PV), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CNF), carboidratos totais (CT), extrato etéreo (EE), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida (EL), no período pós-parto

| | Probabilidades | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-------------|
| | CMS (kg/d) | CMS (%PV) | MO (kg/d) | PB (kg/d) | FDN (kg/d) | CNF (kg/d) | CT (kg/d) | EE (kg/d) | MM (kg/d) | NDT (kg/d) | EL (Mcal/d) |
| Fonte ¹ | 0,656 | 0,245 | 0,658 | 0,757 | 0,709 | 0,584 | 0,637 | 0,817 | 0,639 | 0,646 | 0,646 |
| Tempo | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 |
| Fonte x Tempo ² | 0,678 | 0,654 | 0,680 | 0,586 | 0,908 | 0,354 | 0,678 | 0,815 | 0,738 | 0,646 | 0,642 |

¹ Tipo de fonte mineral (orgânica ou inorgânica); ² Interação entre tempo e fonte

Tabela 14- Efeito de fonte, tempo e interação entre tempo e fonte sobre o consumo de Ca, P, K, Zn e Cu no período pós-parto, em função das fontes orgânicas (O) e inorgânicas (I) de Zn, Cu e Se fornecidas, no período pós-parto

| Variáveis | Probabilidades | | | | |
|----------------------------|----------------|---------|---------|-----------|-----------|
| | Ca (g/d) | P (g/d) | K (g/d) | Zn (mg/d) | Cu (mg/d) |
| Fonte ¹ | 0,645 | 0,736 | 0,749 | 0,558 | 0,641 |
| Tempo | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 | <,001 |
| Fonte x Tempo ² | 0,434 | 0,701 | 0,601 | 0,674 | 0,979 |

¹ Tipo de fonte mineral (orgânica ou inorgânica); ² Interação entre tempo e fonte

5.3.2 Concentração plasmática de Zn, Cu e Se

As concentrações plasmáticas de Zn, Cu e Se não foram alteradas pelo fornecimento de Zn, Cu e Se orgânicos quando comparadas com o fornecimento de fontes inorgânicas (Tabela 15). Foram observados efeitos de tempo sobre a concentração de Zn (P=0,002), e Se (P=0,002) plasmáticos. Não foram observadas interações entre tempo e tratamento.

Tabela 15- Efeitos do fornecimento de fontes orgânicas e inorgânicas de Zn, Cu e Se sobre a concentração plasmática desses minerais em vacas leiteiras

| Variável | Fonte | Dias em relação ao parto | | | | | | Probabilidades | | |
|------------|----------------|--------------------------|------|------|------|-------|------------------|----------------|-------|----------------------------|
| | | -60 | 1 | 40 | 80 | Média | EPM ² | Fonte | Tempo | Fonte X Tempo ⁴ |
| Zn(µg/ml) | O ¹ | 0,86 | 0,48 | 0,69 | 0,65 | 0,67 | 0,039 | 0,799 | 0,002 | 0,604 |
| | I ² | 0,79 | 0,59 | 0,72 | 0,65 | 0,69 | 0,037 | | | |
| Cu(µg/ml) | O ² | 0,75 | 0,77 | 0,74 | 0,75 | 0,75 | 0,017 | 0,705 | 0,083 | 0,493 |
| | I ² | 0,76 | 0,84 | 0,75 | 0,74 | 0,77 | 0,018 | | | |
| Se (µg/ml) | O ² | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,002 | 0,095 | 0,002 | 0,221 |
| | I ² | 0,06 | 0,07 | 0,08 | 0,07 | 0,07 | 0,002 | | | |

¹Orgânica; ² inorgânica; ³ erro padrão médio; ⁴ interação entre tempo e fonte

5.3.3 Produção e composição de leite

Não foram observados efeitos do fornecimento de Zn, Cu e Se orgânicos sobre a produção e composição de leite (Tabela 16). Da mesma forma, também não foram observados efeitos das interações entre tempo e tratamento, e os efeitos de tempo foram observados apenas para a produção de leite ($P < 0,001$) e proteína ($< 0,001$).

Tabela 16- Efeitos do fornecimento de fontes orgânicas e inorgânicas de Zn, Cu e Se sobre a produção de leite (PL), leite corrigido para 3,5% de gordura, gordura, proteína, lactose, estrato seco total (EST) e estrato seco desengordurado (ESD) de vacas leiteiras

| Variável | Fontes de Zn, Cu e Se | | | P ² | | |
|-------------------|-----------------------|------------|------------------|-------------------|-------|---------------------------|
| | Orgânica | Inorgânica | EPM ¹ | Trat ³ | Tempo | Trat X Tempo ⁴ |
| PL (kg/dia) | 27,52 | 26,94 | 0,441 | 0,828 | <,001 | 0,727 |
| Leite 3,5%gordura | 26,17 | 25,37 | 0,443 | 0,909 | 0,092 | 0,196 |
| Gordura (%) | 3,01 | 3,02 | 0,041 | 0,846 | 0,965 | 0,649 |
| Gordura (kg/dia) | 0,85 | 0,82 | 0,016 | 0,838 | 0,135 | 0,300 |
| Proteína (%) | 2,91 | 2,99 | 0,020 | 0,4226 | 0,007 | 0,920 |
| Proteína (kg/dia) | 0,83 | 0,83 | 0,017 | 0,978 | 0,915 | 0,617 |
| Lactose (%) | 4,59 | 4,63 | 0,021 | 0,678 | 0,169 | 0,540 |
| Lactose (kg/dia) | 1,32 | 1,28 | 0,026 | 0,913 | 0,148 | 0,646 |
| EST(%) | 11,45 | 11,57 | 0,060 | 0,563 | 0,920 | 0,251 |
| ESD(%) | 8,44 | 8,57 | 0,040 | 0,580 | 0,232 | 0,930 |

¹Erro padrão médio; ²probabilidade; ³tratamento; ⁴interação entre tempo e tratamento

5.3.4 Peso e escore dos animais

Para as variáveis PC, MPC, ECC e MECC pré-parto, nas primeiras 24 horas do parto, e pós-parto foram observados efeitos do fornecimento de Zn, Cu e Se orgânicos apenas sobre a MPC pré-parto (P=0,024). Foram observados efeitos de tempo sobre MECC no pré-parto, MPC e ECC MECC na lactação. Interações entre tempo e o tratamento ocorreram no pré-parto das variáveis ECC e MECC (Tabela 17).

Tabela 17- Efeitos do fornecimento de fontes orgânicas e inorgânicas de Zn, Cu e Se sobre o peso corporal (PC), mudança de peso corporal (MPC), escore de condição corporal (ECC) e mudança de escore de condição corporal (MECC)

| Var ¹ | Probabilidades | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------|-------|-------------------|-----------|-------|-------------------|-----------|-------|-------------------|-----------|-------|-------------------|
| | PC | | | MPC | | | ECC | | | MECC | | |
| | Pré-parto | Parto | Lact ² | Pré-parto | Parto | Lact ² | Pré-parto | Parto | Lact ² | Pré-parto | Parto | Lact ² |
| Fonte | 0,197 | 0,575 | 0,341 | 0,024 | 0,199 | 0,804 | 0,226 | 0,238 | 0,271 | 0,110 | 0,059 | 0,760 |
| Tempo | 0,871 | ----- | 0,191 | 0,266 | ----- | 0,079 | 0,467 | ----- | 0,037 | 0,059 | ----- | 0,035 |
| Fonte x Tempo ³ | 0,382 | ----- | 0,935 | 0,788 | ----- | 0,936 | 0,037 | ----- | 0,557 | 0,015 | ----- | 0,524 |

¹Variáveis; ²lactação; ³interação entre tempo e tratamento

5.4 Discussão

5.4.1 Consumo de alimentos

O consumo de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra em detergente neutro, carboidratos não fibrosos, carboidratos totais, extrato etéreo, nutrientes digestíveis totais, energia líquida, cálcio, fósforo, potássio, Zn, Cu e Se, no presente estudo, não diferiu entre o grupo de animais alimentados tanto com fontes orgânicas ou inorgânicas de Zn, Cu e Se. No presente estudo, tais resultados eram esperados uma vez que se objetivou avaliar o efeito das fontes de Zn, Cu e Se orgânica (carboquelatos) e inorgânica (sulfatos) em condições de consumo total de nutrientes semelhantes.

Foi observado efeito de tempo ($P < 0,001$) para todos os nutrientes, com marcante redução, principalmente 3 semanas antes do parto. Segundo Hayirli et al. (2002) o animal tem redução de 20 a 40% no consumo de nutrientes 3 semanas pré-parto, período que coincide com o aumento nas demandas de nutrientes para o feto e para o início da síntese de leite. O consumo voluntário de alimentos aumenta rapidamente

após o parto, em função do incremento na demanda por nutrientes direcionados para a lactação (Forbes, 1995).

As médias do consumo de Cu nos períodos pré-parto (Cu= 256,52 mg/dia) e lactação (Cu= 394,30 mg/dia), foram semelhantes às do pré-parto (Cu= 252,12 mg/dia) e lactação (Cu= 326,56 mg/dia) preconizados nas dietas calculadas pelo NRC (2001). O consumo médio de Zn nos períodos pré-parto e lactação (512,60 mg/dia e 762,10 mg/dia, respectivamente) foi 22,4% e 15% abaixo do calculado no NRC (2001) nos mesmos períodos (pré-parto= 660,36 mg/dia e lactação 902,41 mg/dia).

5.4.2 Concentração plasmática de Zn, Cu e Se

O tipo de fonte de Zn, Cu e Se não exerceu efeito sobre a concentração plasmática destes minerais no presente estudo. Contrariamente a estes dados, alguns autores (WEISS e HOGAN, 2005; SILVESTRE et al., 2007) observaram incremento no Se sérico de vacas holandesas alimentadas com Se orgânico. Outros autores (WARD et al., 1996; SPEARS et al., 2004; KINAL, KORNIWICZ, SŁUPCZYŃSKA et al., 2007) descreveram aumento na concentração de Zn plasmática ao suplementar de Zn orgânico para bovinos.

Os dados do presente estudo são similares aos descritos por Goff e Stabel (1990) que demonstraram acentuado declínio de Zn plasmático no período periparturiente. Weiss e Hogan (2005) não relatam efeito de tempo na concentração plasmática de Se de vacas no período de transição.

5.4.3 Produção e composição de leite

A produção de leite, leite corrigida para 3,5% de gordura, gordura (kg/dia), proteína (kg/dia), lactose (kg/dia) e a composição (percentagem de gordura, lactose e

proteína) não foram influenciadas pelo fornecimento de fontes de Zn, Cu e Se orgânicas quando comparadas com fontes inorgânicas, neste experimento.

Os resultados da suplementação de minerais orgânicos sobre a produção e composição de leite descritos na literatura são bastante variáveis. Alguns autores (BALLANTINE et al., 2002; GRIFFITHS et al., 2007; KINAL, KORNIEWICZ, JAMROZ et al., 2007; SICILIANO-JONES et al., 2008) relatam os efeitos da suplementação com micro-minerais orgânicos sobre a produção de leite e componentes do leite sem alteração na composição. Outros autores (NOCEK et al., 2006) observaram efeito do fornecimento de fontes de minerais orgânicos sobre a produção e composição do leite.

5.4.4 *Peso e escore dos animais*

Não foram observados efeitos das fontes de minerais orgânicos sobre o PC, MPC, ECC e MECC na lactação e no dia do parto, e PC, ECC, e MECC. Foi verificada diferença ($P=0,024$) do tipo de fonte de Zn, Cu e Se sobre a MPC no pré-parto. O grupo de animais alimentado com fontes orgânicas de Zn, Cu e Se apresentou MPC negativa, ou seja, perdeu em média 11,3 kg de peso vivo, enquanto que o grupo de vacas alimentadas com Zn, Cu e Se inorgânicos apresentou acréscimo de 12,0 kg de peso, no início do pré-parto (Figuras 1, 2, 3 e 4).

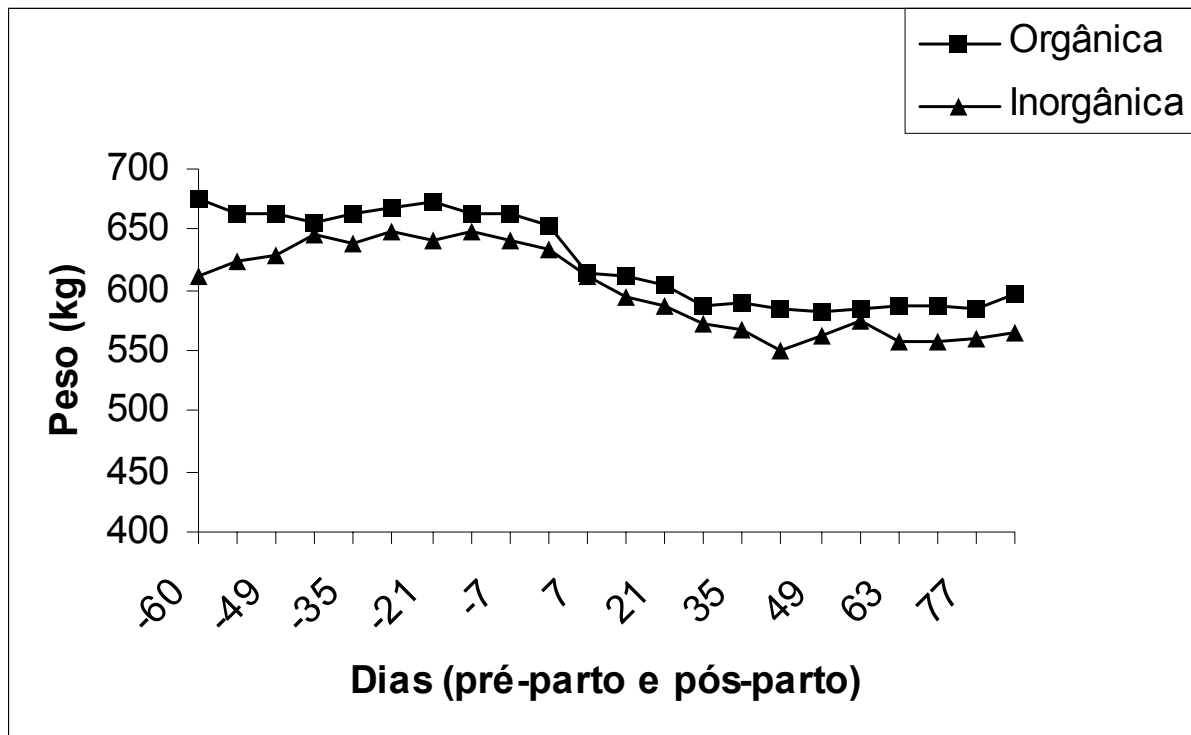


Figura 1- Peso corporal nos períodos pré-parto e lactação, em função da fonte mineral fornecida (orgânica ou inorgânica), O dia 1 se refere ao dia do parto (primeiras 24 horas)

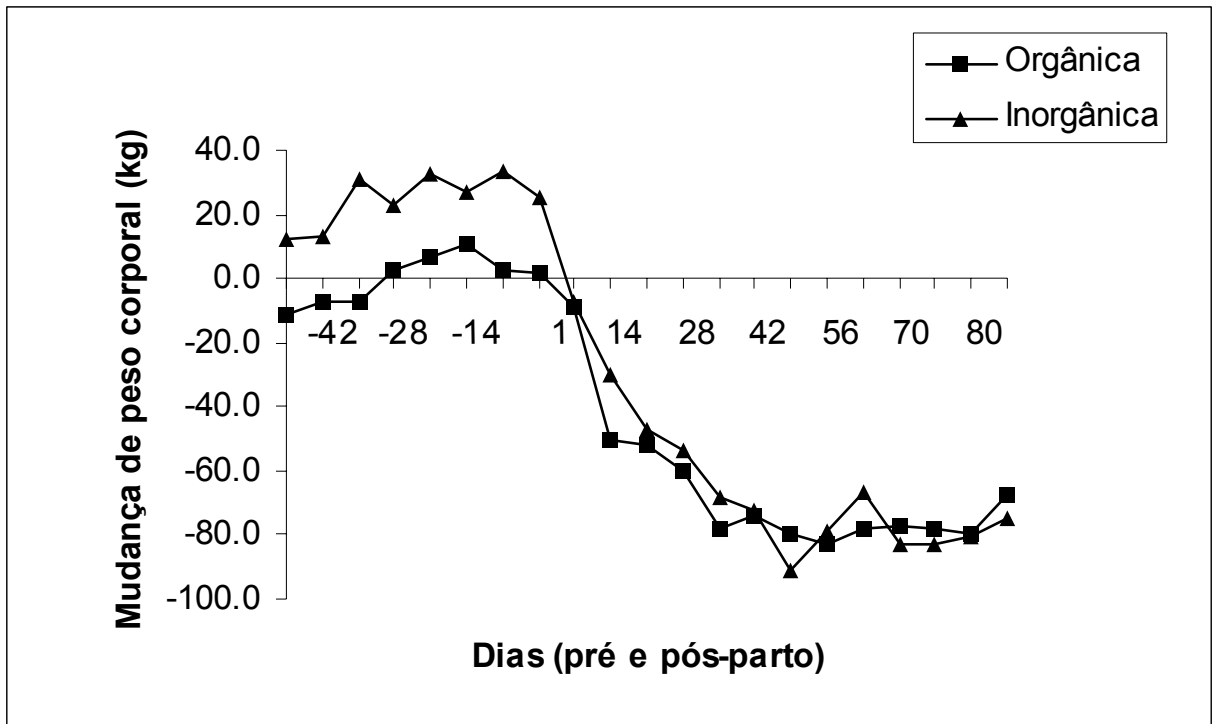


Figura 2- Mudança de peso corporal nos períodos pré-parto e lactação, em função da fonte mineral fornecida (orgânica ou inorgânica), O dia 1 se refere ao dia do parto (primeiras 24 horas)

Os resultados do presente estudo são similares aos descritos por Uchida et al. (2001) que observaram ausência de efeito da suplementação de minerais orgânicos sobre o ECC. O PC de vacas no período de transição também não sofreu efeitos do fornecimento de minerais orgânicos em estudos realizados por Whitaker et al. (1997).

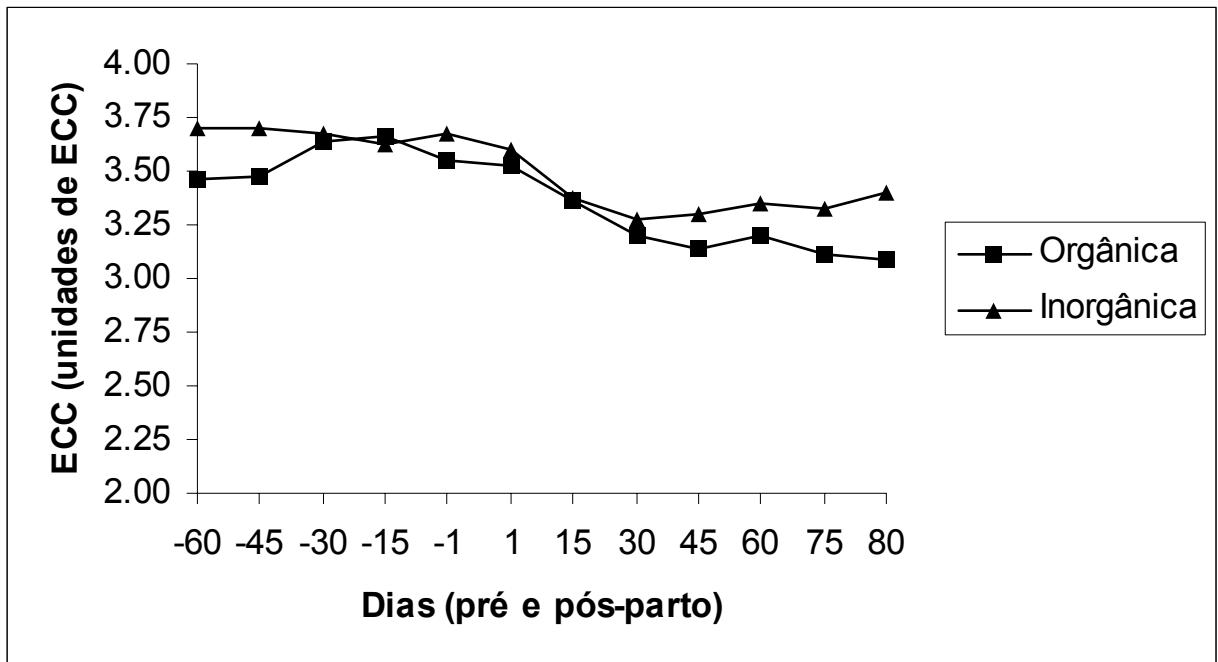


Figura 3- Escore de condição corporal nos períodos pré-parto e lactação, em função da fonte mineral fornecida (orgânica ou inorgânica), O dia 1 se refere ao dia do parto (primeiras 24 horas)

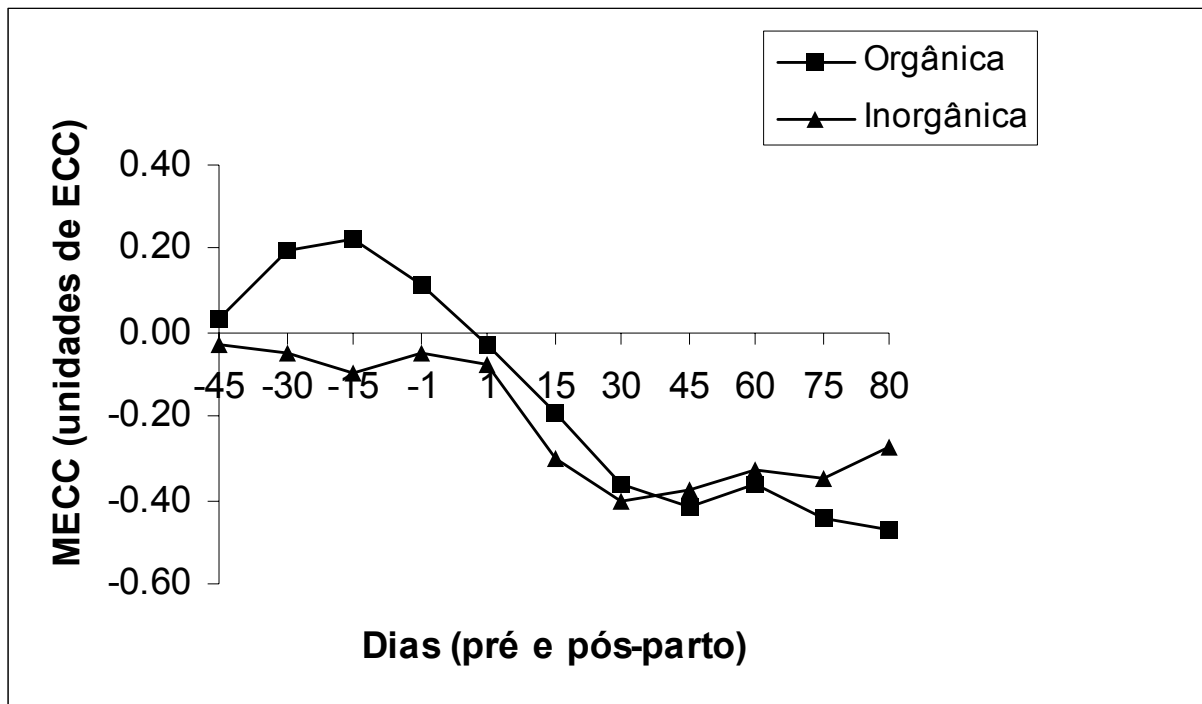


Figura 4- Mudança de escore corporal nos períodos pré-parto e lactação, em função da fonte mineral fornecida (orgânica ou inorgânica), O dia 1 se refere ao dia do parto (primeiras 24 horas)

5.5 Conclusão

Com base nos resultados do presente estudo é possível concluir que o fornecimento de carboaminofosfoquelatos de Zn, Cu e Se não alterou o consumo de MS e nutrientes, a produção e a composição de leite, a concentração plasmática desses minerais, ECC, MECC e o PC, mas influenciou negativamente a MPC pré-parto.

6 CONCLUSÃO GERAL

O fornecimento de Zn, Cu e Se carboaminofosfoquelatos promoveu redução tanto na contagem de células somáticas quanto na incidência de mastite subclínica, em condições experimentais, nas quais o consumo destes minerais e de nutrientes foram controlados individualmente. Essa redução não está ligada a aumentos no aporte plasmático de Zn, Cu e Se e ao mecanismo de defesa antioxidante imunológico do organismo animal. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos que envolvem a redução da incidência de mastite subclínica em vacas alimentadas com fonte carboaminofosfoquelada de Zn, Cu e Se.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL AND AGRICULTURAL CHEMISTRY. **Official Methods of Analysis**. 5th ed. Washington, D.C. EUA: Association of Analytical Chemistry, 1990.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL AND AGRICULTURAL CHEMISTRY. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington, VA.: Association of Analytical Chemistry, 1994

AAFCO. Official publication. ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. Atlanta, GA,: AAFCO, 2000.

ASHMEAD, H. D.; SAMFORD, R. A. Effects of metal amino acid chelates or inorganic minerals on three successive lactations in dairy cows. **International Journal Applied Reserch Veterinary Medicine**, v. 2, n. 3, p. 181-188, 2004.

AWADEH, F. T., KINCAID, R. L.; JOHNSON, K. A. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1204-1215, 1998.

BALLANTINE, H. T.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J.; JOHNSON, A. B.; FIELDING, A. S.; SHEARER, J. K.; AVAN AMSTEL, S. R. Effects of feeding complexed zinc, manganese, copper, and cobalt to late gestation and lactating dairy cows on claw integrity, reproduction, and lactation performance. **The Professional Animal Scientist**, v. 18, p. 211-218, 2002.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. E15-E19, 2006.

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.

BARUSELLI, M. S. Suplementos e co-produtos na nutrição de gado de corte. In: SIMBOI- SIMPÓSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE., 1., 2005, Brasília. [**Anais...**] 2005. p. 7-21.

BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2017-2026, 2005.

BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2173-2179, 2002.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A. V. P. Sensibilidade e especificidade do califórnia mastitis teste como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 5, 1997.

CAMPBELL, M. H.; MILLER, J. K.; SCHIRCK, F. N. Effect of Additional Cobalt, Copper, Manganese, and Zinc on Reproduction and Milk Yield of Lactating Dairy Cows Receiving Bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1019-1025, 1999.

CAO, J.; HENRY, P. R.; GUO, R.; HOLWERDA, R. A.; TOTH, J. P.; LITTELL, R. C.; MILES, R. D.; AMMERMAN, C. B. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 8, p. 2039-2054, 2000.

CASTILLO, C.; BENEDITO, J. L.; LOPEZ-ALONSO, M.; MIRANDA, M.; HERNANDEZ, J. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 33, n. 1, p. 5-20, 2001.

CHASE, C. R.; BEEDE, D. K.; VAN HORN, H. H.; SHEARER, J. K.; WILCOX, C. J.; DONOVAN, G. A. Responses of Lactating Dairy Cows to Copper Source, Supplementation Rate, and Dietary Antagonist (Iron). **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1845-1852, 2000.

COLITTI, M.; STEFANON, B. Effect of natural antioxidants on superoxide dismutase and glutathione peroxidase mRNA expression in leukocytes from periparturient dairy cows. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 1, p. 19-27, 2006.

CUNHA FILHO, L. F. C.; CHIACCHIO, S. B.; GONSALVES, R. C.; PARDO, P. E.; GASTE, L.; OKANO, W.; CROCCI, A. J. Avaliação da produção de leite e contagem de células somáticas em bovinos leiteiros suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de zinco orgânico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 685-694, 2007.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, 1999.

DU, Z.; 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. 1873-1880, 1996.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 8, 1997.

FICK, K. R.; MCDOWELL, L. R.; MILES, P. H.; WILKINSON, N. S.; FUNK, D. J.; CONRAD, J. H. **Methods of mineral analysis for plant and animals tissues**. Gainesville: Dept. Anim. Sci., Univ. of Florida, 1979.

FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. Suplementação mineral para bovinos de corte sob pastejo - revisão. **Veterinária Notícias**, v. 11, n. 2, p. 91-98, 2005.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175 p.

FORBES, J. M. (Ed.). **Voluntary food intake and diet selection in farm animals**. 2. ed. Wallingford: Cab International, 1995, p.532.

GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1212-1220, 2007.

GOFF, J. P. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1292-1301, 2006.

GOFF, J. P.; STABEL, J. R. Decreased plasma retinol, alpha-tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 11, 1990, p. 3195-3199, 1990.

GOFF, J. P.; STABEL, J. R. Decreased Plasma Retinol, alpha-Tocopherol, and Zinc Concentration During the Periparturient Period: Effect of Milk Fever. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 11, p. 3195-3199, 1990.

GRIFFITHS, L. M.; LOEFFLER, S. H.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J.; JOHNSON, A. B. Effects of supplementing complexed zinc, manganese, copper and cobalt on lactation and reproductive performance of intensively grazed lactating dairy cattle on the South Island of New Zealand. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 1-2, p. 69-83, 2007.

GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X.; KALTSATOS, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.

GUNTER, S. A.; BECK, P. A.; PHILLIPS, J. M. Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 4, p. 856-864, 2003.

HALL, M. B. **Calculation of non-structural carbohydrate content of feeds that contain non-protein nitrogen**. Gainesville: University of Florida, 2000. p. A-25 (Bulletin 339, April-2000).

HAMED, H.; EL FEKI, A.; GARGOURI, A. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 2, p. 144-151, 2008.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

HAYIRLI, A.; GRUMMER, R. R.; NORDHEIM, E. V.; CRUMP, P. M. Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in holsteins, **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 3430-3443, 2002.

HOUSE, W. A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. **Field Crops Research**, v. 60, p. 115-141, 1999.

JUNIPER, D. T.; PHIPPS, R. H.; JONES, A. K.; BERTIN, G. Selenium supplementation of lactating dairy cows: effect on selenium concentration in blood, milk, urine, and feces. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3544-3551, 2006.

KEGLEY, E. B.; SPEARS, J. W. Bioavailability of feed-grade copper sources (oxide, sulfate, or lysine) in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2728-2734, 1994.

KINAL, S.; BODARSKI, R.; KORNIWICZ, A.; NICPON, J.; SLUPCZYNSKA, M. Application of organic forms of zinc, copper and manganese in the first three months of dairy cow lactation and their effect on the yield, composition and quality of milk. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 49, n. 4, p. 423-426, 2005.

- KINAL, S.; KORNIEWICZ, A.; SŁUPCZYŃSKA, M.; BODARSKI, R.; KORNIEWICZ, D.; ČERMÁK, B. Effect of the application of bioplexes of zinc, copper and manganese on milk quality and composition of milk and colostrum and some indices of the blood metabolic profile of cows. **Czech Journal of Animal Science**, v. 52, n. 12, p. 423–429, 2007.
- KINAL, S.; KORNIEWICZ, D.; JAMROZ, D.; KORNIEWICZ, A.; SLUPCZYNSKA, M.; BODARSKI, M.; ZIEMINSKI, R.; OSIEGLOWSKI, S.; DYMARSKI, I. The effectiveness of zinc, copper and manganese applied in organic forms in diets of high milk yielding cows. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 5, n. 2, p. 189-193, 2007.
- KNOWLES, S. O.; GRACE, N. D.; WURMS, K.; LEE, J. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk, and casein selenium concentrations in grazing cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 429-437, 1999.
- LAUZON, K.; ZHAO, X.; LACASSE, P. Deferoxamine reduces tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3846-3857, 2006.
- LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1-2, p. 248-255, 2006.
- LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. **Veterinary Journal**, v. 173, n. 3, p. 502-511, 2007.
- MALBE, M.; ATTILA, M.; ATROSHI, F. Possible involvement of selenium in Staphylococcus aureus inhibition in cow's whey. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 3-4, p. 159-164, 2006.
- MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO . **Instrução normativa** nº51 de 18 de setembro de 2002. Disponível em: <<http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 07 mar. 2009.
- MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. 2. ed. Netherlands: Elsevier Science, 2003. 644 p.
- MINATEL, L.; CARFAGNINI, J. C. Copper deficiency and immune response in ruminants. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1519-1529, 2000.
- MOURÃO, D. M.; SALES, N. S.; COELHO, S. B.; PINHEIRO-SANTANA, H. M. Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 4, p.529-539, 2005.

NMC. **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Madison: National Mastitis Council, 1999. 222 p.

NOCEK, J. E.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J. The Effect of Trace Mineral Fortification Level and Source on Performance of Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 7, p. 2679-2693, 2006.

NOCKELS, C. F. Antioxidants improve cattle stress immunity following. **Animal Feed Science and Technology**, v. 62, p. 10, 1996.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001, 381 p.

OLSON, O. E.; PALMER, I. S.; CARY, E. E. Modification of the official fluorimetric method for selenium in plants. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.**, v. 58, n. 1, p. 117-121, 1975.

ORTMAN, K.; PEHRSON, B. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 3365-3370, 1999.

PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v. 34, p. 31, 2003.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal and Laboratory Clinical Medicine**, v. 70, p. 158-169, 1967.

PECHOVA, A.; PAVLATA, L.; LOKAJOVA, E. Zinc supplementation and somatic cell count in milk of dairy cows. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, n. 3, p. 355-361, 2006.

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.

PICCININI, R.; BINDA, E.; BELOTTI, M.; DAPRA, V.; ZECCONI, A. Evaluation of milk components during whole lactation in healthy quarters. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 2, p. 226-232, 2007.

PYORALA, S. Mastitis in post-partum dairy cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 16., 2008, Budapest. 2008. p. 252-259.

RABOT, A.; WELLNITZ, O.; MEYER, H. H. D.; BRUCKMAIER, R. M. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 1, p. 93-99, 2007.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, p. 369-400, 2006.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 287-294, 2003.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Bioscience**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006. 314 p.

SANTOS, M. V.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, Y. V. R.; BOTARO, B. G. Efeito da remoção de células somáticas pela microfiltração sobre a lipólise do leite. **Brazilian Journal veterinary Research animal Scienci**, v. 44, n. 5, p. 315-321, 2007.

SAS. **SAS user's guide: statistics**. Version 8. Cary: SAS Institute, 1999. 965 p.

SCALETTI, R. W.; TRAMMELL, D. S.; SMITH, B. A.; HARMON, R. J. Role of dietary copper in enhancing resistance to escherichia coli mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1240-1249, 2003.

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.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.

SICILIANO-JONES, J. L.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J.; DEFRAIN, J. M. Effect of trace mineral source on lactation performance, claw Integrity, and fertility of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 1985-1995, 2008.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. (Ed.). **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: UFV Impr. Univ., 2002. 235 p.

SILVESTRE, S. T.; RUTIGLIANO, H. M.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R. Effect of selenium source on production, reproduction, and immunity of lactating dairy cows. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 18., 2007, Gainesville, FL. **Annual...** 2007. 13 p.

SINDIRAÇÕES. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. Sindicato Nacional da Industria de Alimentação Animal. São Paulo, SP, 2005. 204 p.

SKLAN, D.; KAIM, M.; MOALLEM, U. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1652-1660, 1994.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; WEISS, W. P. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 6, p. 1659-1665, 1997.

SNIFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. S. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock Production Science**, v. 98, n. 1-2, p. 89-99, 2005.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

SORDILO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 12, 2002.

SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, n. 1-2, p. 151-163, 1996.

SPEARS, J. W. Trace mineral bioavailability in ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1506S-1509S, 2003.

SPEARS, J. W.; SCHLEGEL, P.; SEAL, M. C.; LLOYD, K. E. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions. **Livestock Production Science**, v. 90, n. 2-3, p. 211-217, 2004.

SPEARS, J. W.; WEISS, W. P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 70-76, 2008.

SUTTLE, N. F.; MCMURRAY, C. H. Use of erythrocyte copper:zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. **Research in Veterinary Science**, v. 35, n. 1, p. 47, 1983

UCHIDA, K.; MANDBEVU, P.; BALLARD, C. S.; SNIFFEN, C. J.; CARTER, M. P. Effect of feeding a combination of zinc, manganese and copper amino acid complexes, and cobalt glucoheptonate on performance of early lactation high producing dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 93, n. 3-4, p. 193-203, 2001.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. (Ed.). **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. Wallingford Oxon: CABI Publishing, 1999. 624 p.

VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n.1, p.45-53, 1991.

VÁSQUEZ, E. F. A.; HERRERA, A. P. N. H.; SANTIAGO, G. S. Interação cobre, molibidênio e enxofre em ruminantes. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1101-1106, 2001.

VAZQUEZ-ANON, M.; NOCEK, J.; BOWMAN, G.; HAMPTON, T.; ATWELL, C.; VAZQUEZ, P.; JENKINS, T. Effects of Feeding a Dietary Antioxidant in Diets with Oxidized Fat on Lactation Performance and Antioxidant Status of the Cow. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 3165-3172, 2008.

WARD, J. D.; SPEARS, J. W. Comparison of Copper Lysine and Copper Sulfate as Copper Sources for Ruminants Using In Vitro Methods. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n.10, p. 2994-2998, 1993.

WARD, J. D.; SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B. Bioavailability of Copper Proteinates and Copper Carbonate Relative to Copper Sulfate in Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 127-132, 1996.

WEISS, W. P. Antioxidant nutrients, cow health, and milk quality. In: PENN STATE DAIRY CATTLE NUTRITION WORKSHOP, 2005, Grantville, PA, 2005a. p. 11-18

WEISS, W. P. Selenium sources for dairy cattle. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2005, Fort Wayne, Indiana. 2005b, p. 61-71.

WEISS, W. P.; HOGAN, J. S. Effect of Selenium Source on Selenium Status, Neutrophil Function, and Response to Intramammary Endotoxin Challenge of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4366-4374, 2005.

WEISS, W. P.; SOCHA, M. T. Dietary Manganese for Dry and Lactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2517-2523, 2005.

WEISS, W. P.; WYATT, D. J. Effects of feeding diets based on silage from corn hybrids that differed in concentration and in vitro digestibility of neutral detergent fiber to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3462-3469, 2002.

WHITAKER, D. A.; EAYRES, H. F.; AITCHISON, K.; KELLY, J. M. No effect of a dietary zinc proteinate on clinical mastitis, infection rate, recovery rate and somatic cell count in dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 153, n. 2, p.197-203, 1997.

WILDE, D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3-4, p. 240-249, 2006.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. A dairy cow body condition system and its relationship to selected production characteristics. **Journal dairy of science**, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WRIGHT, C. L.; SPEARS, J. W.; WEBB JR., K. E. Uptake of zinc from zinc sulfate and zinc proteinate by ovine ruminal and omasal epithelia. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 6, p. 1357-1363, 2008.

YOST, G. P.; ARTHINGTON, J. D.; MCDOWELL, L. R.; MARTIN, F. G.; WILKINSON, N. S.; SWENSON, C. K. Effect of Copper Source and Level on the Rate and Extent of Copper Repletion in Holstein Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3297-3303, 2002.

ANEXOS

Anexo A - Proporção dos ingredientes nos concentrados, expressos com base na matéria seca (%MS), e composição bromatológica durante os períodos pré-parto e lactação

| Ingrediente(%MS) | Vacas secas | Vacas secas pré-parto | Lactação |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|
| Milho moído | 56,80 | 55,00 | 54,41 |
| Farelo de soja | 35,20 | 38,50 | 40,15 |
| Uréia | 4,39 | 3,10 | 0,90 |
| Bicarbonato de sódio | ----- | ----- | 1,36 |
| Macro-minerais | 3,66 | 2,46 | 2,82 |
| Micro-minerais | 0,73 | 0,92 | 0,33 |
| Composição dos concentrados | | | |
| MS (%) | 89,09 | 89,57 | 89,62 |
| MO (%MS) | 94,24 | 94,96 | 94,62 |
| PB (%MS) | 25,25 | 26,42 | 26,59 |
| FDN (% MS) | 13,44 | 15,04 | 15,13 |
| FDA (% MS) | 5,73 | 6,14 | 6,06 |
| LIG(% MS) | 1,78 | 1,84 | 1,61 |
| MM(% MS) | 5,76 | 5,04 | 5,38 |
| EE (% MS) | 4,34 | 4,68 | 4,03 |
| CT (% MS) | 64,65 | 63,86 | 64,00 |
| CNF (% MS) | 51,31 | 48,82 | 48,87 |
| NDT (% MS) | 85,11 | 85,41 | 84,42 |
| EL Mcal/kg (MS) | 1,97 | 1,97 | 1,95 |
| Ca (%MS) | 0,85 | 0,77 | 0,85 |
| P (%MS) | 0,52 | 0,51 | 0,49 |
| K (%MS) | 0,92 | 0,99 | 0,97 |
| Zn (mg/kg MS) | 33,17 | 31,67 | 28,85 |
| Cu (mg/kg MS) | 16,63 | 17,44 | 14,34 |

MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; FDN – Fibra em detergente neutro, FDA – Fibra em detergente ácido; LG – lignina; MM – matéria mineral; EE – extrato etéreo; CT – carboidratos totais; CNF – Carboidratos não fibrosos; NDT – Nutrientes digestíveis totais; EL – energia líquida ; Ca – cálcio; P – fósforo; K – potássio; Zn – zinco; Cu – cobre.

Anexo B - Proporção dos ingredientes na dieta total, expressos com base na matéria seca (%MS), e composição bromatológica das dietas durante os períodos pré-parto e lactação

| Ingrediente(%MS) | Vacas secas | Vacas secas pré-parto | Lactação |
|----------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|
| Silagem de milho | 79,94 | 74,28 | 47,06 |
| Milho moído | 11,05 | 14,22 | 28,78 |
| Farelo de soja | 7,04 | 9,88 | 21,29 |
| Uréia | 0,98 | 0,79 | 0,48 |
| Bicarbonato de sódio | ----- | ----- | 0,72 |
| Macro-minerais | 0,82 | 0,63 | 1,50 |
| Micro-minerais | 0,16 | 0,20 | 0,18 |
| Composição da dieta total | | | |
| MS (%) | 41,71 | 44,73 | 61,19 |
| MO (%MS) | 94,99 | 94,94 | 94,89 |
| PB (%MS) | 11,54 | 12,80 | 17,88 |
| FDN (% MS) | 46,00 | 44,33 | 33,63 |
| FDA (% MS) | 28,94 | 27,41 | 19,57 |
| LIG(% MS) | 4,91 | 4,70 | 3,53 |
| MM(% MS) | 4,99 | 4,87 | 5,11 |
| EE (% MS) | 3,95 | 4,06 | 3,95 |
| CT (% MS) | 79,44 | 78,43 | 72,98 |
| CNF (% MS) | 33,23 | 33,90 | 39,39 |
| NDT (% MS) | 69,88 | 71,08 | 75,81 |
| EL Mcal/kg (MS) | 1,57 | 1,61 | 1,72 |
| Ca (%MS) | 0,40 | 0,43 | 0,59 |
| P (%MS) | 0,24 | 0,26 | 0,34 |
| K (%MS) | 0,95 | 0,84 | 0,96 |
| Zn (mg/kg MS) | 22,18 | 22,60 | 24,42 |
| Cu (mg/kg MS) | 9,61 | 10,40 | 11,29 |

MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; FDN – Fibra em detergente neutro, FDA – Fibra em detergente ácido; LG – lignina; MM – matéria mineral; EE – extrato etéreo; CT – carboidratos totais; CNF – Carboidratos não fibrosos; NDT – Nutrientes digestíveis totais; EL – energia líquida ; Ca – cálcio; P – fósforo; K – potássio; Zn – zinco; Cu – cobre; Se – selênio.

Anexo C- Médias para o consumo de matéria seca (CMS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CFN), carboidratos totais (CT), extrato etéreo (EE), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida (EL), no período pré-parto, em função das fontes orgânicas (O) e inorgânicas (I) de Zn, Cu e Se fornecidas.

| Var ¹ | Fonte ² | Semanas em relação ao parto | | | | | | | | Médias | EPM ³ |
|------------------|--------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|------------------|
| | | -8 | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | | |
| CMS (kg/d) | O | 10,70 | 10,39 | 10,57 | 10,56 | 10,31 | 10,22 | 9,26 | 7,83 | 9,97 | 0,215 |
| | I | 10,62 | 10,66 | 10,67 | 10,74 | 10,60 | 10,05 | 9,79 | 8,86 | 10,24 | 0,251 |
| CMS (%PV) | O | 1,63 | 1,60 | 1,60 | 1,59 | 1,54 | 1,55 | 1,38 | 1,18 | 1,51 | 0,032 |
| | I | 1,74 | 1,73 | 1,69 | 1,69 | 1,66 | 1,59 | 1,53 | 1,37 | 1,63 | 0,045 |
| MO (kg/d) | O | 10,17 | 9,87 | 10,04 | 10,04 | 9,82 | 9,74 | 8,85 | 7,50 | 9,50 | 0,204 |
| | I | 10,13 | 10,17 | 10,19 | 10,24 | 10,13 | 9,59 | 9,33 | 8,44 | 9,77 | 0,239 |
| PB (kg/d) | O | 1,47 | 1,46 | 1,46 | 1,47 | 1,48 | 1,44 | 1,33 | 1,15 | 1,41 | 0,033 |
| | I | 1,45 | 1,44 | 1,46 | 1,48 | 1,45 | 1,40 | 1,36 | 1,27 | 1,41 | 0,034 |
| FDN (kg/d) | O | 4,91 | 4,77 | 4,72 | 4,57 | 4,5 | 4,50 | 4,03 | 3,40 | 4,45 | 0,100 |
| | I | 4,75 | 4,79 | 4,79 | 4,60 | 4,6 | 4,37 | 4,30 | 3,78 | 4,52 | 0,113 |
| CNF (kg/d) | O | 3,27 | 3,38 | 3,43 | 3,35 | 3,38 | 3,09 | 2,61 | 3,23 | 3,23 | 0,073 |
| | I | 3,49 | 3,47 | 3,50 | 3,63 | 3,40 | 3,26 | 3,01 | 3,40 | 3,40 | 0,072 |
| CT (kg/d) | O | 8,25 | 7,98 | 8,15 | 8,15 | 7,92 | 7,89 | 7,12 | 6,00 | 7,68 | 0,166 |
| | I | 8,21 | 8,26 | 8,26 | 8,30 | 8,24 | 7,77 | 7,56 | 6,80 | 7,92 | 0,200 |
| EE (kg/d) | O | 0,45 | 0,43 | 0,43 | 0,42 | 0,42 | 0,42 | 0,40 | 0,35 | 0,41 | 0,011 |
| | I | 0,47 | 0,47 | 0,47 | 0,46 | 0,45 | 0,42 | 0,40 | 0,37 | 0,44 | 0,012 |
| MM (kg/d) | O | 0,53 | 0,52 | 0,52 | 0,52 | 0,49 | 0,47 | 0,41 | 0,34 | 0,47 | 0,013 |
| | I | 0,49 | 0,49 | 0,49 | 0,50 | 0,47 | 0,46 | 0,46 | 0,43 | 0,47 | 0,012 |
| NDT (kg/d) | O | 7,55 | 7,35 | 7,49 | 7,51 | 7,4 | 7,34 | 6,69 | 5,67 | 7,12 | 0,151 |
| | I | 7,56 | 7,59 | 7,60 | 7,66 | 7,58 | 7,19 | 6,98 | 6,37 | 7,31 | 0,175 |
| EL (Mcal/d) | O | 17,22 | 16,77 | 17,08 | 17,13 | 16,88 | 16,75 | 15,27 | 12,95 | 16,24 | 0,399 |
| | I | 17,26 | 17,32 | 17,34 | 17,48 | 17,30 | 16,41 | 15,93 | 14,55 | 16,69 | 0,344 |

¹Variáveis; ²fonte (O:orgânica, I: inorgânica); ³erro padrão da média; .

Anexo D- Médias para o consumo de cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), zinco (Zn) e cobre (Cu), no período pré-parto, em função das fontes orgânicas (O) e inorgânicas (I) de Zn, Cu e Se fornecidas

| Var ¹ | Fonte ² | Semanas pré-parto | | | | | | | | Médias | EPM ³ |
|------------------|--------------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|
| | | -8 | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 | | |
| Ca (g/d) | O | 42,52 | 42,58 | 43,41 | 43,68 | 43,02 | 41,03 | 37,07 | 31,42 | 40,57 | 0,937 |
| | I | 40,03 | 40,25 | 40,45 | 41,75 | 40,06 | 39,35 | 38,12 | 35,94 | 39,49 | 0,967 |
| P (g/d) | O | 26,68 | 26,32 | 27,01 | 27,56 | 27,84 | 27,08 | 25,50 | 22,08 | 26,25 | 0,659 |
| | I | 26,18 | 26,28 | 26,44 | 27,42 | 27,63 | 26,93 | 26,13 | 24,40 | 26,43 | 0,666 |
| K (g/d) | O | 106,00 | 106,13 | 106,48 | 107,85 | 104,20 | 98,47 | 84,40 | 68,83 | 97,68 | 3,240 |
| | I | 100,01 | 99,84 | 100,25 | 101,31 | 94,15 | 91,07 | 87,99 | 79,15 | 94,15 | 2,775 |
| Zn (mg/d) | O | 478,23 | 466,13 | 465,03 | 474,17 | 501,06 | 529,94 | 516,13 | 487,48 | 489,93 | 7,124 |
| | I | 487,23 | 489,47 | 496,53 | 502,06 | 518,63 | 527,79 | 520,31 | 499,45 | 505,41 | 8,675 |
| Cu (mg/d) | O | 237,58 | 238,38 | 243,74 | 255,51 | 270,98 | 279,22 | 271,38 | 257,07 | 257,00 | 3,069 |
| | I | 237,67 | 239,87 | 243,36 | 249,28 | 265,59 | 275,26 | 271,03 | 264,51 | 256,05 | 3,463 |

¹Variáveis; ²fonte (O:orgânica, I: inorgânica); ³erro padrão da média; .

Anexo E- Médias para o consumo de matéria seca (CMS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CFN), carboidratos totais (CT), extrato etéreo (EE), nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida (EL), no período pós-parto, em função das fontes orgânicas (O) e inorgânicas (I) de Zn, Cu e Se fornecidas.

| Var ¹ | Fon ² | Semanas pós-parto | | | | | | | | | | | | Méd ² | EPM ³ |
|------------------|------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| MS kg/d | O | 10,91 | 11,89 | 12,90 | 13,43 | 14,52 | 15,62 | 16,55 | 17,27 | 18,27 | 17,91 | 18,09 | 18,70 | 15,50 | 0,416 |
| | I | 10,52 | 12,24 | 13,40 | 14,24 | 14,53 | 16,87 | 17,96 | 18,13 | 18,41 | 18,16 | 19,09 | 20,25 | 16,12 | 0,422 |
| CMS %PV | O | 1,67 | 1,88 | 2,10 | 2,24 | 2,44 | 2,63 | 2,82 | 2,95 | 3,10 | 3,08 | 3,10 | 3,22 | 2,60 | 0,067 |
| | I ⁵ | 1,67 | 2,02 | 2,26 | 2,46 | 2,54 | 2,97 | 3,17 | 3,21 | 3,21 | 3,26 | 3,41 | 3,58 | 2,81 | 0,069 |
| MO kg/d | O | 10,38 | 11,29 | 12,27 | 12,77 | 13,80 | 14,85 | 15,73 | 16,41 | 17,37 | 17,02 | 17,20 | 17,79 | 14,74 | 0,395 |
| | I | 10,00 | 11,64 | 12,74 | 13,54 | 13,83 | 16,04 | 17,09 | 17,25 | 17,48 | 17,25 | 18,12 | 19,21 | 15,32 | 0,399 |
| PB kg/d | O | 1,91 | 1,98 | 2,11 | 2,25 | 2,43 | 2,65 | 2,83 | 2,98 | 3,10 | 3,01 | 2,98 | 3,02 | 2,60 | 0,064 |
| | I | 1,84 | 2,08 | 2,25 | 2,36 | 2,44 | 2,76 | 2,96 | 2,99 | 2,98 | 3,02 | 3,15 | 3,31 | 2,67 | 0,069 |
| FDN kg/d | O | 3,61 | 3,97 | 4,39 | 4,42 | 4,81 | 5,26 | 5,65 | 5,89 | 6,22 | 5,90 | 5,98 | 6,28 | 5,20 | 0,151 |
| | I | 3,46 | 4,10 | 4,54 | 4,76 | 4,93 | 5,70 | 6,06 | 6,05 | 6,06 | 5,96 | 6,31 | 6,77 | 5,38 | 0,151 |
| CNF kg/d | O | 4,39 | 4,83 | 5,22 | 5,54 | 5,99 | 6,33 | 6,61 | 6,87 | 7,34 | 7,42 | 7,51 | 7,73 | 6,31 | 0,176 |
| | I | 4,23 | 4,94 | 5,38 | 5,82 | 5,88 | 6,92 | 7,38 | 7,53 | 7,77 | 7,58 | 7,94 | 8,38 | 6,63 | 0,174 |
| CT kg/d | O | 8,00 | 8,80 | 9,61 | 9,96 | 10,80 | 11,60 | 12,26 | 12,76 | 13,56 | 13,31 | 13,50 | 14,01 | 11,51 | 0,321 |
| | I | 7,69 | 9,04 | 9,92 | 10,58 | 10,81 | 12,62 | 13,43 | 13,58 | 13,82 | 13,54 | 14,25 | 15,15 | 12,01 | 0,320 |
| EE kg/d | O | 0,47 | 0,52 | 0,55 | 0,56 | 0,57 | 0,61 | 0,64 | 0,67 | 0,71 | 0,70 | 0,72 | 0,75 | 0,62 | 0,014 |
| | I | 0,47 | 0,52 | 0,57 | 0,60 | 0,58 | 0,66 | 0,70 | 0,68 | 0,69 | 0,68 | 0,72 | 0,75 | 0,63 | 0,014 |
| MM kg/d | O | 0,53 | 0,59 | 0,63 | 0,66 | 0,72 | 0,77 | 0,82 | 0,86 | 0,90 | 0,89 | 0,88 | 0,91 | 0,76 | 0,022 |
| | I | 0,51 | 0,60 | 0,66 | 0,70 | 0,71 | 0,83 | 0,88 | 0,88 | 0,93 | 0,92 | 0,97 | 1,04 | 0,80 | 0,024 |
| NDT kg/d | O | 8,36 | 9,08 | 9,81 | 10,28 | 11,01 | 11,85 | 12,54 | 13,10 | 13,87 | 13,69 | 13,82 | 14,25 | 11,80 | 0,309 |
| | I | 8,14 | 9,40 | 10,25 | 10,90 | 11,08 | 12,82 | 13,65 | 13,76 | 13,95 | 13,77 | 14,45 | 15,28 | 12,26 | 0,310 |
| EL Mca/d | O | 19,18 | 20,81 | 22,48 | 23,57 | 25,24 | 27,16 | 28,73 | 30,02 | 31,80 | 31,39 | 31,69 | 32,65 | 27,06 | 0,706 |
| | I | 18,68 | 21,56 | 23,50 | 24,99 | 25,40 | 29,38 | 31,28 | 31,53 | 31,95 | 31,55 | 33,10 | 35,01 | 28,10 | 0,710 |

¹Variáveis; ²fonte (O:orgânica, I: inorgânica); ³erro padrão da média;

Anexo F- Médias para o consumo de cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), zinco (Zn) e cobre (Cu), no período pós-parto, em função das fontes orgânicas (O) e inorgânicas (I) de Zn, Cu e Se fornecidas.

| Var ¹ | Fonte ² | Semanas pós-parto | | | | | | | | | | | | Médias | EPM ³ |
|------------------|--------------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| Ca (g/d) | O | 62,71 | 67,47 | 70,77 | 76,13 | 81,85 | 88,85 | 92,96 | 97,07 | 103,58 | 101,97 | 102,25 | 104,15 | 87,48 | 2,497 |
| | I | 60,46 | 70,91 | 76,54 | 80,88 | 81,40 | 94,53 | 100,93 | 102,35 | 102,95 | 103,80 | 109,05 | 115,39 | 91,40 | 2,626 |
| P (g/d) | O | 37,30 | 40,86 | 43,05 | 46,31 | 47,59 | 50,67 | 54,22 | 56,89 | 61,97 | 61,95 | 63,32 | 64,99 | 52,43 | 1,303 |
| | I | 37,85 | 42,75 | 46,28 | 48,36 | 47,48 | 55,08 | 58,58 | 58,50 | 60,23 | 60,26 | 63,54 | 67,46 | 53,75 | 1,318 |
| K (g/d) | O | 100,14 | 107,62 | 114,63 | 119,42 | 130,96 | 143,52 | 154,65 | 162,17 | 171,85 | 160,84 | 163,10 | 168,35 | 141,44 | 3,596 |
| | I | 99,20 | 114,58 | 125,10 | 130,38 | 131,06 | 151,87 | 162,94 | 166,02 | 160,83 | 159,39 | 167,83 | 176,04 | 145,18 | 3,831 |
| Zn (mg/d) | O | 648,40 | 661,94 | 683,74 | 694,43 | 729,34 | 758,48 | 780,31 | 796,27 | 813,53 | 805,65 | 819,73 | 826,81 | 751,56 | 11,31 |
| | I | 614,07 | 668,47 | 669,49 | 728,17 | 743,22 | 797,11 | 825,75 | 828,67 | 831,17 | 831,20 | 847,91 | 865,84 | 772,65 | 10,83 |
| Cu (mg/d) | O | 344,00 | 350,20 | 359,80 | 364,47 | 382,10 | 400,97 | 414,83 | 424,67 | 418,12 | 406,07 | 410,75 | 411,16 | 390,59 | 5,30 |
| | I | 333,46 | 357,41 | 371,72 | 385,23 | 392,02 | 414,08 | 428,87 | 430,61 | 416,25 | 412,73 | 417,81 | 417,81 | 398,01 | 5,17 |

¹Variáveis; ²fonte (O:orgânica, I: inorgânica); ³erro padrão da média