

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ARLINDO SARAN NETTO

**Efeitos de fontes orgânica e inorgânica de enxofre na
dieta de bovinos**

Pirassununga

2006

ARLINDO SARAN NETTO

**Efeitos de fontes orgânica e inorgânica de enxofre na
dieta de bovinos**

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti

Pirassununga

2006

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Arlindo e Ida que sempre me apoiaram, incentivaram e deram todas as condições necessárias para que eu pudesse alcançar meus objetivos. A vocês meu sincero e eterno amor e respeito.

Aos meus irmãos Júnior, Carolina e Camila; que tornaram mais agradáveis cada dia da minha vida

*“Que nenhuma família comece em qualquer de repente.
Que nenhuma família termine por falta de amor”*

Pe. Zezinho em : Oração da Família

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti, pela orientação, amizade e empenho na realização deste e de outros trabalhos desenvolvidos durante a Graduação e Pós-graduação;

À Tortuga, pelos auxílios concedidos, fundamentais na realização deste projeto de pesquisa;

A minha namorada, Renata Jorge Anaruma, pela paciência, carinho, amor e compreensão durante estes anos, meus sinceros agradecimentos

Aos meus familiares: vó Alice e Mila; vô Gusto e Titi (*in memoriam*), tia Lena, Gina, Nina, Nelo, Nê, Tarciso e Manoel por todo apoio. E também ao primo Alberto por todo seu empenho e dedicação em seus estudos, sucesso;

Ao campus de Pirassununga, do qual tenho orgulho e me identifico, meus agradecimentos pela minha formação acadêmica e amizade com funcionários e professores

Aos Prof. Edison Schalch; João Alberto Negrão; César Gonçalves de Lima; Valdo Rodrigues Herling; Pedro Henrique Cerqueira; Catarina de Abdalla Gomide; Douglas Emydio Faria; Paulo Roberto Leme e Celso Carrer, pela amizade, confiança e conhecimentos transmitidos ao longo desses anos;

A todos os demais professores da FZEA, pelo empenho para o crescimento do campus, pela disponibilidade, dedicação e amizade;

A todos os funcionários da PCAPS e da FZEA pelo apoio, confiança, incentivo e disposição. Pelos momentos de lazer com os jogos de futebol e os incansáveis jogos de truco.

Agradeço ao Fernando Schalch, Cristina, Fernandinho, Taila e Duda pelo carinho e amizade. Pela maravilhosa família Schalch: Mocinha, Bela, Tonhão e demais.....

Agradeço em especial, aos funcionários da Fábrica de Ração, Matadouro, Elétrica, Hidráulica, Marcenaria, Serralheria, Pintura, Fistulados e Gado de corte, pelo auxílio na realização deste experimento e por tornarem grandes amigos.

Aos funcionários da Administração da PCAPS e da FZEA por todo apoio e atenção, em especial: Nilson Chagas, Sílvia Ketelutti e Fernando Araújo;

Aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação, em especial: Wagner Garrido dos Santos e Maria Conceição Roldão;

Aos técnicos de laboratório Cunha, Rose, Rosilda, Raphael, Camila, Marquinho e Guilherme pela ajuda nas análises laboratoriais e aos professores Catarina A. Gomide, Paulo Sobral e Albino Luchiari por terem cedido seus laboratórios para realização de minhas análises e/ou material para uso no experimento;

Aos amigos do grupo de pesquisa: Gustavo Ribeiro Del Claro, Fernanda Alves de Paiva e Márcia Saladini pela competência e inestimável ajuda no experimento.

Aos amigos da Pós-Graduação: Saulo, Soraia, Angélica, Juliana, Amauri, Ivan, Wilson, Rodrigo, Rodrigo Meirelles, Marco Aurélio, Lísia, Andrezza pelos ótimos anos de convivência;

Aos amigos da Graduação: Paulo, César, Carlos, Gustavo, Fernando, Sílvia Rossi, Nádia, Thiago Morimoto, Viviani, Luciana, Tiani.....

A todos os meus amigos da graduação e da pós-graduação, que durante esses anos estiveram comigo e que não foram mencionados, mas foram de igual importância para tornar os dias mais agradáveis em todas ocasiões aqui vividas.

Ao professor Margutti, por promover uma saudável integração entre professores, funcionários e alunos;

Aos amigos do time de futebol Verona que representa a FZEA no campeonato amador, pela dedicação, garra e principalmente pela amizade tornando os domingos mais agradáveis. Em especial ao prof. Ricardo, Silva, Zé Boteon, Niltinho e aos amigos Danilo(Morcego) e José Augusto (Salame);

Àqueles que deram sua importante contribuição para realização deste projeto todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

A Deus, por estar presente todos os dias e iluminar meus caminhos.

OTIMISMO PARA TODOS

Logo após a 2ª Guerra Mundial, um jovem piloto inglês experimentava o seu frágil avião monomotor numa arrojada aventura ao redor do mundo.

Pouco depois de levantar vôo de um dos pequenos e improvisados aeródromos da Índia, ouviu um estranho ruído que vinha de trás do seu assento.

Percebeu logo que havia um rato à bordo e que poderia, roendo a cobertura de lona, destruir o seu frágil avião.

Poderia voltar ao aeroporto para se livrar de seu incômodo, perigoso e inesperado passageiro. Lembrou-se, contudo, de que os ratos não resistem a grandes alturas. Voando cada vez mais alto, pouco a pouco cessaram os ruídos que quase colocaram em perigo a sua viagem.

Moral da estória:

Se o ameaçarem destruir por inveja, calúnia, maledicência..... voe mais alto...

Se o criticarem, voe mais alto.....

Se fizerem injustiças a você..... voe mais alto!!!

Lembre-se sempre que eles não resistem
às grandes alturas

Autor Desconhecido

RESUMO

SARAN NETTO, A. **Efeitos de fontes orgânica e inorgânica de enxofre na dieta de bovinos.** 2006, 72 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2006

O experimento foi conduzido na FZEA/USP, com objetivo de comparar a utilização de fontes orgânicas de enxofre com a flor de enxofre na dieta de bovinos, com base no ganho de peso, conversão alimentar, concentração de enxofre e cobre no sangue, fígado e rim, e características da carcaça (experimento I), além de parâmetros ruminais (experimento II). No experimento I, 32 novilhos Nelore foram confinados e receberam ração total pelo sistema “calan gate”, sendo divididos nos tratamentos: controle; flor de enxofre; metionina e carboquelatado. A cada 28 dias foram pesados, e foram colhidas amostras de sangue para posterior análise. Após 84 dias, foram abatidos e foram colhidas amostras de fígado e rim. No experimento II, oito novilhos foram canulados e divididos nos mesmos tratamentos já descritos. Durante cinco dias foi amostrado líquido ruminal para contagem de protozoários e análise de pH. Também foram incubados saquinhos de náilon para determinação da degradabilidade da matéria seca, proteína bruta e fibras em detergente neutro e ácido das dietas. Os tratamentos não influenciaram o ganho de peso e a conversão alimentar no período total de confinamento, porém, o carboquelatado proporcionou ganho de peso 11% maior que a flor de enxofre nos primeiros 28 dias de confinamento. Não foram encontradas diferenças entre as fontes para concentração de enxofre e cobre no sangue, porém, no fígado, as fontes orgânicas proporcionaram as menores concentrações de enxofre e a metionina, as menores concentrações de cobre. Não houve efeito das fontes estudadas na concentração de enxofre e cobre no rim, no rendimento de carcaça e na maciez da carne, bem como na degradabilidade e no pH ruminal. Entretanto, o carboquelatado aumentou a quantidade total de protozoários ciliados, sendo uma alternativa interessante para suplementação de bovinos no início do período de confinamento.

Palavras – chave: confinamento, conversão alimentar, degradabilidade ruminal, ganho de peso, minerais, nutrição.

ABSTRACT

SARAN NETTO, A. **Effect of organic and inorganic sulphur sources in bovines' diet**. 2006. 72p. PhD.Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

This research was carried out at FZEA/USP to compare the utilization of organic sulphur sources to elemental sulphur in bovines' diet, through analyses of weight gain, feed conversion, liver and kidney sulphur and copper concentrations and carcass characteristics (experiment I), and ruminal parameters (experiment II). During experiment I, 32 Nellore steers were confined and were fed a total ration through "calan gate" system. They were divided into the treatments: control; elemental sulphur; methionine and carboquelated. Each 28 days, they were weighted and blood samples were taken to posterior analysis. After 84 days, they were slaughtered and samples of liver and kidney were taken. During experiment II, eight steers were cannulated and divided into the same described treatments. During five days, ruminal liquid was sampled to protozoa count and pH determination. Also, nylon bags were incubated to determinate the degradability of dietary dry matter, crude protein and acid and neutral detergent fiber. Treatments did not affect weight gain and feed conversion during whole feedlot period, however, carboquelated provided weight gain 11% higher than the elemental sulphur during the first 28 days of feedlot. There were no differences of sulphur sources on sulphur and copper blood concentrations, however, in the liver, the organic sources provided lower sulphur concentrations and methionine provided lower copper concentration. The studied sources did not affect kidney sulphur and copper concentration, carcass yield, shear force, ruminal degradability and pH. However, carboquelated increased total amount of ciliate protozoa, and it is an interesting alternative to supplement bovines during the beginning of a feedlot period.

Key-words: feedlot, feed conversion, minerals, nutrition, ruminal degradability, weight gain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Animais no confinamento em sistema de alimentação individual por sistema de portão tipo “calan”.	28
Figura 2. Animais canulados recebendo alimentação individual para ensaio de degradabilidade ruminal.	30
Figura 3. Saquinho de náilon utilizado para ensaio de degradabilidade.	32
Figura 4. Saquinhos de náilon com peso, após incubação no rúmen.	32
Figura 5. Colheita de líquido ruminal com bomba de vácuo.	34
Figura 6. Desempenho de bovino Nelore em confinamento, submetidos a tratamentos com diferentes fontes de enxofre.	37
Figura 7. Desempenho médio de bovinos Nelore em confinamento, submetidos a tratamentos com diferentes fontes de enxofre.	38
Figura 8. Conversão alimentar (kg MS/kg ganho de peso) em períodos de 28 dias, de bovinos Nelore em confinamento, suplementados com diferentes fontes de enxofre.	39
Figura 9. Conversão alimentar média (kg MS/kg ganho de peso) de bovinos Nelore em confinamento, suplementados com diferentes fontes de enxofre.	40
Figura 10. Concentração de enxofre em $\mu\text{g/mL}$ no soro sanguíneo de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	41
Figura 11. Concentração de cobre em (mg/kg) no soro sanguíneo de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	43
Figura 12. Concentração de enxofre (%) no fígado de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	45
Figura 13. Concentração de cobre (mg/kg) no fígado de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	46
Figura 14. Concentração de enxofre (%) no rim de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	47

Figura 15. Concentração de cobre (mg/kg) no rim de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.....	48
Figura 16. Concentração de uréia no soro sanguíneo (mg/dl) de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.....	49
Figura 17. Rendimento de carcaça de bovinos nelore abatidos após 84 dias de período experimental.	51
Figura 18. Força de cisalhamento no músculo <i>Longissimus dorsi</i> , de bovinos Nelore em confinamento alimentados com diferentes fontes de enxofre.	51
Figura 19. Degradabilidade da Matéria Seca nos diferentes tempos em bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.....	53
Figura 20. Degradabilidade da proteína bruta em função do tempo de incubação no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	54
Figura 21. Degradabilidade da fibra em detergente ácido em função do tempo de incubação no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	55
Figura 22. Degradabilidade da fibra em detergente neutro em função do tempo de incubação no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	55
Figura 23. Valor médio de pH no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual da ração experimental.	35
Tabela 2 – Resultado da análise bromatológica das rações fornecidas aos animais nos diferentes tratamentos.....	36
Tabela 3. Quantidade de protozoários ciliados por mL de líquido ruminal, em função da suplementação com diferentes fontes de enxofre para bovinos em regime de confinamento.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Enxofre e sua importância	13
2.2 Requerimento de enxofre na dieta	14
2.3 Disponibilidade do enxofre nas diferentes fontes.....	15
2.4 Deficiência de enxofre	16
2.5 Relação do enxofre com outros elementos.....	16
2.6 Toxicidade do enxofre	17
2.7 Cobre e sua importância.....	18
2.8 Metabolismo do cobre	20
2.9 Interação do cobre com molibdênio e enxofre	21
2.10 Funções fisiológicas do cobre	22
2.11 Necessidade de cobre	23
2.12 Deficiência de cobre	23
2.13 Toxicidade do cobre	24
2.14 Minerais quelatados.....	25
2.14.1 Biodisponibilidade dos quelatados.....	26
2.14.2 Absorção dos quelatados	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Experimento 1: Confinamento	28
3.1.1 Local e período	28
3.1.2 Animais	28
3.1.3 Instalações.....	28
3.1.4 Procedimento experimental	29
3.2 Experimento 2: Animais Canulados	29
3.2.1 Local e período	29
3.2.2 Animais e instalações	29
3.2.3 Procedimento experimental	29
3.2.4. Degradabilidade Ruminal.....	31
3.2.5 Amostragem de líquido ruminal	33
3.2.6 Fermentação Ruminal.....	33
3.2.6.1 pH Ruminal	33
3.2.6.2 Protozoários Ciliados.....	33
3.3 Tratamentos.....	34
3.4 Análises	35
3.5 Delineamento experimental e análise estatística	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Desempenho e Conversão Alimentar.....	37
4.2 Parâmetros sanguíneos para cobre e enxofre	41
4.3 Concentração de cobre e enxofre no fígado	45
4.4 Concentração de cobre e enxofre no rim	47
4.5 Concentração de uréia no soro sanguíneo	49
4.6 Resultados de carcaça e maciez da carne.....	51
4.7 Degradabilidade ruminal.....	53
4.8 Protozoários Ciliados e pH Ruminal.....	57
5 CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

Grande parcela do potencial de produção de alimentos para o mundo se deve a produção animal, maximizada pelo desenvolvimento de novas tecnologias que tornam esta exploração viável e competitiva. A nutrição surge como um desafio para o aumento da produtividade nos rebanhos explorados economicamente. A degradação do solo e o manejo incorreto da produção de forragens são os principais fatores que contribuem para uma nutrição deficiente, com grande prejuízo para agroindústria.

Dentre os avanços científicos e tecnológicos já estabelecidos, encontra-se o fundamental papel dos minerais na alimentação animal, uma vez que a ocorrência de várias patologias provenientes da desnutrição têm sua origem nas deficiências minerais. Além disso, muitas fontes minerais convencionalmente utilizadas na suplementação animal têm baixa absorção pelo organismo e boa parte torna-se indisponível quando misturada à ração ou durante o processo de digestão, levando a uma deficiência mineral.

Os elementos minerais têm sido fornecidos para os animais na forma de sais inorgânicos, porém, nos últimos anos, tem se considerado o uso de quelatos ou fontes orgânicas para suplementação mineral de ruminantes. Este interesse tem aumentado devido aos resultados de pesquisas que mostraram efeitos positivos na absorção, no ganho de peso, reprodução e na própria saúde de animais suplementados com minerais orgânicos, além do menor impacto ambiental causado pela eliminação dos resíduos minerais presentes nos dejetos.

A maioria dos trabalhos sugeriram mais pesquisas para melhor definir as condições e fontes capazes de melhorar a performance e a saúde animal, definir o nível ótimo de minerais orgânicos na dieta e determinar seu modo de ação quando utilizado em suplementos minerais para ruminantes.

Baseado nestas informações e na situação da pecuária nacional, estabeleceu-se o objetivo do trabalho comparar a fonte inorgânica mais utilizada para suplementar enxofre (flor de enxofre), com fontes orgânicas (aminoácido sulfurado-metionina e carbo-quelatado), verificando se há efeito na interação com o cobre, utilizando parâmetros sanguíneos, análise de fígado e rins, além do desempenho, conversão alimentar e parâmetros ruminais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enxofre e sua importância

De acordo com Andriguetto (1981), o organismo animal contém cerca de 0,2% de enxofre, encontrando-se este metalóide tanto na forma mineral como na de compostos orgânicos. Os compostos orgânicos compreendem principalmente os aminoácidos sulfurados: cisteína e metionina; vitaminas: tiamina e biotina; e hormônios como insulina e ocitocina.

Diversos estudos mostraram que o enxofre inorgânico, administrado por via oral, pode ser utilizado pelos ruminantes para a síntese de metionina e cisteína. A incorporação do enxofre nas proteínas pelos ruminantes, foi demonstrada através do elemento marcado, onde o S^{35} (enxofre radioativo) foi transferido para os aminoácidos do leite, lã, sangue e tecidos. O enxofre mineral pode ser utilizado pelos mamíferos e pelas aves, em graus variáveis, apresentando efeito promotor de crescimento. Este efeito do sulfato indica que o organismo não pode obter sulfatos dos aminoácidos sulfurados com a velocidade necessária, para um máximo rendimento.

Trabalhos como de Spears, Burns e Hatch (1985) e Buttrey et al. (1986) mostraram que a fertilização do solo com sulfato de amônia melhorou a digestibilidade da fibra em detergente ácido e da fibra em detergente neutro das forragens cultivadas nestes solos, quando fornecidas aos ruminantes. Os microrganismos do rúmen podem incorporar enxofre inorgânico em compostos orgânicos, esta incorporação do sulfato inorgânico produzindo aminoácidos sulfurados é uma importante função destes microrganismos (BURK e HILL, 1994).

O enxofre entra na rota metabólica como sulfato ou sulfeto. As formas de enxofre podem ser oxidadas para sulfatos ou reduzidas para sulfeto; antes elas são utilizadas pelos ruminantes, processo esse conhecido por ciclo do enxofre, onde animais e plantas fazem uso deste ciclo (NRC, 1980; O' DELL e SUNDE, 1997).

Block et al. (1951) citado por McDowell (1992) introduziram S^{35} diretamente no rúmen de cabras e ovelhas e encontraram 80% deste enxofre na proteína do leite. Pope et al. (1979) concluíram que o sulfato, proteínas contendo enxofre e os aminoácidos livres contendo enxofre são reduzidos para sulfeto pelos microrganismos do rúmen, e este é incorporado nos aminoácidos microbianos. O

líquido ruminal de bovinos foi incubado *in vitro* com sulfato e substratos representando dietas com concentrado ou forragem, e foi verificado que a síntese de cisteína foi duas vezes mais rápida que a formação de metionina, e a incorporação do enxofre em aminoácidos também foi mais rápida quando o substrato era concentrado (McDOWELL, 1992).

Em estudo com digestão de celulose *in vitro*, Spears, Bush e Ely (1977), encontraram que em bovinos alimentados com dietas que continham baixos níveis de enxofre, a digestão da celulose foi inferior a 1,6%, enquanto que nos animais alimentados com a quantidade adequada, a digestibilidade foi de 33,5%. Ress e Minson (1978) estudaram a movimentação do sulfato no plasma e no líquido ruminal de bovinos e ovinos alimentados com gramínea (capim timóteo) ou feno de alfafa. Na dieta com feno de alfafa, 98mg do S (enxofre) foi reciclado diariamente via saliva para o rúmen dos ovinos, comparado com 3,9mg de S pela dieta com gramínea (capim timóteo). Nos bovinos alimentados com feno de alfafa foram reciclados 533mg de S comparadas com 234mg de S reciclado quando alimentados com a gramínea (capim timóteo). Concluíram que o sulfato reciclado para o rúmen é um fator limitante para a síntese de proteína pelos ruminantes alimentados com dietas de forragem de baixa qualidade. Lesperance, Bohman e Oldfield (1985) relataram que a alfafa em dietas de bovinos melhorou o balanço de S.

Buttrey et al. (1986) verificaram que a fertilização do milho com 67 kg/ha de enxofre resultou no aumento da digestibilidade da parede celular, e aumentou a absorção aparente de nitrogênio na silagem quando fornecida para novilhos. Morris (1984) verificou ganho significativo no peso de novilhos, quando houve um acréscimo de enxofre na dieta de 0,05 para 0,13%.

2.2 Requerimento de enxofre na dieta

A determinação do requerimento dietético de enxofre para ruminantes envolveu a suplementação da dieta com metionina, cisteína, sais sulfatados, ou enxofre elemental em estudos feitos com radioisótopos. Nos primeiros estudos feitos por Loosli e Harris (1945), citados por McDowell (1992) foi verificado aumento na taxa de crescimento de cordeiros alimentados com uma dieta contendo 6,55% de proteína bruta, quando esta dieta recebeu suplementação de uréia com sulfato ou uréia com metionina, passando para 10,28% de proteína bruta. A retenção de

nitrogênio e a produção de lã foram aumentadas em ovelhas suplementadas com metionina e cisteína (HIDROGLOU et al. 1977).

Hume e Bird (1970) demonstraram que o sulfato de sódio, sulfato de cálcio, DL-metionina e hidroximetionina foram equivalentes em melhorar a digestão da celulose *in vitro*, e concluíram que o nível ótimo de enxofre foi de 0,16 a 0,24% para ruminantes. Grieve, Merrill e Coppock (1973), verificaram que quando o S da dieta oriundo da fonte sulfato de cálcio excedia 0,3%, as vacas em lactação reduziam a ingestão de alimentos, e Hidroglou et al. (1977) relataram que a adição de 0,5% de sulfato de cálcio prejudicava o ganho de peso dos cordeiros. O requerimento de enxofre para ruminantes em regime de pastejo está entre 0,10 e 0,32% (McDOWELL, 1992).

2.3 Disponibilidade do enxofre nas diferentes fontes

A disponibilidade biológica do enxofre em L-metionina encontrada por Thompson et al. (1994) e em DL-metionina por Spears, Burns e Hatch (1985) foi maior que as outras formas de enxofre estudadas. McDowell (1992) relatou que Na₂SO₄ (Sulfato de Sódio), CaSO₄ (Sulfato de Cálcio), e uma mistura de K₂SO₄ (Sulfato de Potássio) e MgSO₄ (Sulfato de Magnésio) foram semelhantes para suplementar S para vacas em lactação, sendo recomendado um nível de 0,17 a 0,20% de S. Foram necessários aproximadamente três vezes mais S na forma elemental do que como metionina para cordeiros (JOHNSON; GOODRICH; MEISKE, 1971).

A disponibilidade de enxofre para os microrganismos do rúmen em ovelhas foi determinada usando o enxofre radiativo (S³⁵) que era incorporado pelas bactérias (BIRD e MOIR, 1972). Bull e Vandersall (1973) verificaram aumento de 68% para 81% na absorção aparente de enxofre utilizando DL-metionina quando comparado com enxofre elemental. Ammerman, Baker e Lewis (1995) identificaram S³⁵ nos aminoácidos da lã, leite, plasma sanguíneo e tecidos, após alimentar os animais com S³⁵ oriundo de sulfato.

Dietas com proteína de alta qualidade podem ter seus valores reduzidos pelos microrganismos do rúmen, entretanto, proteínas de baixa qualidade provenientes de gramíneas ou de fontes de nitrogênio não protéico como a uréia, com adequada

quantidade de enxofre, podem ter seu valor melhorado através dos microrganismos do rúmen (ANDERSON; WARNICK; DALAIC 1975).

Lovett et al. (1986) verificaram que a adição de sulfato de sódio e metionina ou sulfato de sódio e colina, à dieta de suínos contendo milho e soja, resultou em melhor ganho de peso e conversão alimentar. Ammerman, Baker e Lewis (1995) relataram que o ganho de peso diário de suínos dos 30 aos 90 dias foi aumentado quando receberam dietas contendo 0,57 e 0,47% de metionina e cisteína, respectivamente.

Ammerman, Baker e Lewis (1995) citaram o enxofre como um dos elementos críticos para ruminantes, e que mais estudos comparando fontes inorgânicas com formas orgânicas incluindo isômeros de metionina precisam ser realizados, inclusive levando em consideração parâmetros ruminais.

2.4 Deficiência de enxofre

Os sinais de deficiência de enxofre incluem perda de apetite, redução no ganho de peso, redução no crescimento da lã em ovelhas, lacrimação, fraqueza e morte (McDOWELL, 1992). Uma dieta deficiente em enxofre também pode reduzir a ingestão de matéria seca, a digestibilidade, e a produção de leite de vacas em lactação (BOUCHARD e CONRAD, 1973). Bovinos alimentados com uma dieta purificada, deficiente em enxofre, tiveram elevados níveis de serina, alanina, cisteína e outros aminoácidos menos a glicina e a tirosina no plasma sanguíneo (HARMS e BURESH, 1987). Foi verificado um nível normal de sulfato no soro de ovelhas alimentadas com uma dieta basal contendo 0,09% de S, mostrando que talvez o sulfato possa ser de origem endógena e, portanto, o seu uso como um indicador do nível de enxofre na dieta pode ser questionável. A avaliação de enxofre na dieta, acompanhada da análise de desempenho dos animais, são os melhores indicadores para verificar deficiência de enxofre na dieta de ruminantes (McDOWELL, 1992).

2.5 Relação do enxofre com outros elementos

Uma interrelação entre enxofre (S), cobre (Cu) e molibdênio (Mo) foi primeiramente relatada por Dick e Bull (1945) citados por McDowell (1992), mostrando que dietas com alto molibdênio diminuem o acúmulo de cobre no fígado,

assim como os sulfatos inorgânicos têm efeito antagonista aos elementos cobre e molibdênio. Spears, Bush e Ely (1977) também mostraram que o sulfato influencia a excreção de molibdênio pela urina e o nível deste no sangue.

McFarlane, Judson e Turnbull (1991) estudaram o efeito da adição de 0,4% de sulfato inorgânico na dieta, ou uma combinação de 50ppm de Mo com 0,4% de sulfato, avaliando a resposta no plasma de cordeiros recebendo uma injeção intravenosa com cobre radioativo (Cu^{64}). Quando ambos, Mo e Cu, estavam presentes na dieta, houve uma redução no acúmulo de cobre no fígado. As ingestões em excesso de S, Cu, Mo e Se podem alterar o requerimento para cada um dos outros elementos (McDOWELL, 1992).

Estudos verificando o efeito da deficiência de selênio na formação de metionina e cisteína em aves mostraram que a eficiência da transulfuração pode ser prejudicada pelo baixo nível de selênio na dieta (HALPIN e BAKER, 1984).

A adição de sulfeto de ferro (500ppm) em dietas contendo alto cobre (200 ppm) fez reduzir o acúmulo de cobre no fígado de leitões, de 278 para 21ppm (LIMA, STAHLY e COMWELL, 1981).

2.6 Toxicidade do enxofre

Toxicidade de enxofre em ruminantes é mais provável de ocorrer quando os animais estão recebendo dietas suplementares com alto nível de enxofre, como sulfato de amônio para fornecer nitrogênio não protéico, ou sulfato de cálcio para fornecer cálcio. É conhecido que o sulfeto de hidrogênio formado a partir do sulfato pelos microrganismos gastrointestinais pode causar envenenamento em ruminantes e monogástricos. O sulfeto reduz a motilidade do rúmen e causa alterações nervosas e dificuldades respiratórias (McDOWELL, 1992).

Bouchard e Conrad (1974) administraram 15g de S como sulfito de sódio por vaca/dia, e gradativamente aumentaram a dosagem para 50g/vaca/dia, sendo verificada uma completa anorexia e queda na gordura do leite de 3,7 para 3,4%. De acordo com o NRC (1980), não está estabelecido claramente o limite de enxofre na dieta para ruminantes, entretanto, 0,4% de S parece ser o limite máximo tolerável para cordeiros, quando a fonte for o sulfato de sódio.

2.7 Cobre e sua importância

A presença do cobre nos tecidos animais e a sua importância na nutrição animal foi verificada por, McHarque (1926), citado por Andriquetto (1981), quando demonstrou que o cobre era essencial para os ratos. Em 1928, Hart e colaboradores citados por Andriquetto (1981), demonstraram que o cobre e o ferro eram necessários para a síntese de hemoglobina em ratos. A maior concentração de cobre no organismo animal verifica-se no fígado, entretanto, a concentração nos tecidos varia com a espécie, idade, e estado nutricional do animal. Geralmente, a concentração de cobre no fígado, na maioria das espécies, diminui à medida que o animal vai envelhecendo. Por outro lado, os bovinos e os ovinos constituem uma exceção, nos ovinos esta concentração aumenta com o desenvolvimento do animal; nos bovinos, a variação na concentração de cobre no fígado, conforme a idade, é muito pequena, podendo esporadicamente, o ruminante jovem apresentar teores mais elevados que o adulto.

O cobre é um elemento tanto essencial quanto tóxico ao organismo animal. A toxicidade é variável entre os ruminantes, sendo o ovino a mais sensível das espécies (SOLI, 1980). Riet-Correa et al. (1993) relataram a ocorrência de mortes súbitas e, adicionalmente, a ocorrência da hipomielinogênese congênita em bovinos. Todos os casos de morte súbita e de ataxia neonatal, assim como a resposta positiva à suplementação com cobre, foram observadas experimentalmente.

Diversos casos de intoxicação espontânea por cobre têm sido diagnosticados no Brasil (RIET-CORREA et al., 1989; PILLATI; LOMBARDO DE BARROS; GIUDICE, 1990; RIBEIRO; NETO; RODRIGUES, 1995). Os ovinos intoxicados por cobre podem apresentar dois quadros clínicos distintos, o primeiro caracteriza-se pela intoxicação aguda, na qual o animal apresenta uma severa gastroenterite logo após a uma alta ingestão de cobre. O segundo, denominado de intoxicação crônica, é o mais comum e caracteriza-se pelo acúmulo de cobre principalmente no fígado, sem manifestações de sinais clínicos; posteriormente, sob algum fator desconhecido, o cobre é liberado causando uma hemólise maciça, e que provocará icterícia e hemoglobinúria.

Ledoux, Henry e Ammerman (1996) suplementando cordeiros por 30 dias com alto nível de cobre (superior a 25 ppm) não verificaram alterações na ingestão de matéria seca, níveis de hemoglobina e hematócrito, porém a concentração de

cobre no fígado foi elevada, diferindo significativamente ($P < 0,001$) do grupo controle que recebia 9 ppm de cobre.

A concentração de cobre no fígado de ruminantes está correlacionada com a biodisponibilidade de cobre na dieta (McDOWELL, 1992). Em ovelhas, o fígado contém aproximadamente metade do total de cobre da carcaça (LANGLANDS et al., 1984). A biodisponibilidade de cobre na dieta e a concentração de cobre no fígado são afetadas pelas necessidades fisiológicas; vacas em gestação alimentadas com 5 ppm de cobre, tiveram um declínio constante do nível de cobre no fígado durante um período de oito semanas antes do parto, entretanto, a suplementação com 10 ppm de cobre preveniu o declínio do nível de cobre no fígado (XIN et al., 1993).

De acordo com MILLS (1987) quando a ingestão de cobre pelo animal for inferior à sua necessidade fisiológica, a concentração de cobre e a atividade de ceruloplasmina no plasma não são reduzidas, até que o fígado tenha uma reserva de 40 mg/kg. Engel et al. (1964) encontraram uma correlação significativa ($r = 0,57$; $P < 0,01$) entre concentração de cobre no fígado e no plasma quando houve menos que 33 mg de cobre/kg de fígado. Claypool et al. (1975) disseram que valores de cobre no plasma de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ou menores são indicativos de baixas reservas de cobre no fígado.

A ingestão de zinco, ferro, molibdênio e enxofre afetam a utilização do cobre (McDOWELL, 1992). Alta ingestão de zinco reduziu a concentração de cobre no plasma e fígado de bovinos e ovinos (KELLOGG; RAKES; GIIEDT, 1989). Dietas com molibdênio podem inibir a utilização do cobre; no rúmen o molibdênio combina com enxofre reduzido para formar tetratiomolibdato, que se une ao cobre dificultando sua absorção. Outras combinações como o tiomolibdato e o molibdato, que são absorvidos e, posteriormente, quando unidos ao cobre endógeno, tornam-se indisponíveis para o processo metabólico (MASON, 1982).

No plasma, o molibdênio que está ligado à proteína remove cobre do fígado aumentando a perda pela urina, embora forme algum complexo cobre–molibdênio que se acumula nos rins (KINCAID e WHITE, 1988).

Em bezerros, o baixo nível de cobre tem sido associado com o desenvolvimento de úlceras abomasais; os animais com úlcera abomasal tinham de 45 a 48 μg de Cu/ g no fígado, comparado com os animais controle com 245 μg de Cu/g de fígado (LILLEY et al., 1985). As investigações sugerem que o efeito pode

ser devido à baixa imunidade em bezerros Cu-deficientes ou pela fraqueza estrutural do abomaso em bezerros Cu-deficientes.

Os problemas reprodutivos relacionados à deficiência de cobre se manifestam em inibição da concepção, mesmo que o cio seja normal. Esta falha reprodutiva é causada por morte embrionária precoce e reabsorção do embrião, e também há aumento da retenção de placenta. Bezerros de vacas deficientes apresentam anormalidades do sistema nervoso central e a incapacidade de mamar normalmente (LEE, 1991).

2.8 Metabolismo do cobre

Em muitas espécies animais o cobre é pouco absorvido, sendo sua absorção influenciada pela sua forma química (Underwood, 1977). Geralmente não mais que 5-10% do cobre na dieta são absorvidos por animais adultos, enquanto animais jovens podem absorver de 15-30%. Em ruminantes apenas 1-3% do cobre é absorvido. Os pré-ruminantes absorvem o cobre com eficiência semelhante aos monogástricos (McDOWELL, 1992).

Suttle (1974) trabalhando com cordeiros em fase de aleitamento verificou uma absorção de 47%, enquanto que após o desmame a absorção foi de 10%. Dependendo da espécie estudada, o cobre pode ser absorvido em todos os segmentos do trato gastrointestinal, embora alguns locais do intestino delgado tenham um maior papel na absorção do cobre, uma absorção considerável tem sido demonstrada no estômago de humanos e no intestino grosso de ovelhas (O'DELL e SUNDE, 1997).

Existem evidências que a absorção intestinal do cobre é regulada pela necessidade do organismo, e que a metalotionina na célula epitelial do intestino tem um papel chave nesta regulação. A absorção de cobre é alta após um período de deficiência até que o nível adequado seja atingido (McDOWELL, 1992).

Animais de idades similares, do mesmo sexo, estado fisiológico, e num mesmo ambiente podem apresentar diferenças na eficiência de utilização do cobre (McDOWELL, 1992). Estudos em várias espécies também têm mostrado que a absorção intestinal do cobre pode ser influenciada pela forma química, e por interação com outros minerais da dieta como: cálcio, ferro, zinco, cádmio e molibdênio, que reduzem a absorção.

O cobre parece ser absorvido por dois mecanismos, um saturado e outro insaturado, sugerindo transporte ativo para uma forma e difusão simples para outra (KEGLEY e SPEARS, 1993). O cobre absorvido vai para o soro, sendo transportado até o fígado, principal órgão de estocagem. Aproximadamente 90% do cobre presente no plasma de mamíferos está na forma de Cu metaloproteína, ceruloplasmina, que é o carreador específico que exporta cobre do fígado para os órgãos alvos. O fígado é o órgão central do metabolismo do cobre, e a concentração neste órgão reflete o nível de cobre que está sendo ingerido pelo organismo (McDOWELL, 1992). Em todos os estudos foi verificado que alta proporção do cobre ingerido aparece nas fezes, portanto não é absorvido, mas também ocorrem excreções via bile, urina e leite, e pequenas quantidades são excretadas na respiração (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

2.9 Interação do cobre com molibdênio e enxofre

A interação entre os minerais: Cu (Cobre), Mo (Molibdênio) e S (Enxofre) é complexa, mas pode ser resumida:

- Molibdênio, e especialmente o molibdênio na presença do enxofre, reduz o depósito de cobre nos órgãos e a síntese de ceruloplasmina; como resultado, diminui a excreção de cobre com a bile, mas aumenta excreção pela urina;
- O aumento de cobre na dieta reduz a deposição de molibdênio no fígado;
- Quando o nível de enxofre é elevado, ocorre aumento da excreção de molibdênio pela urina, enquanto a deposição no tecido decresce (McDOWELL, 1992).

Algumas das interações Cu/Mo/S ocorrem no trato digestivo. Dick, Dewey e Gawthorne (1975) verificaram que a redução de sulfato para sulfeto no rúmen provoca uma reação do sulfeto com Mo formando tiomolibdato (MoS_4^{2-}), que posteriormente irá formar tiomolibdato de cobre (CuMoS_4), tornando o cobre altamente insolúvel e não utilizável. O enxofre na ausência de molibdênio, também pode causar deficiência de cobre, pela formação de um composto insolúvel, sulfeto de cobre no intestino. A formação do sulfeto de cobre e do tiomolibdato de cobre reduzem muito a absorção do cobre por deixá-lo indisponível (NRC, 1984).

Os animais ruminantes são mais susceptíveis à interação Cu/Mo/S que os não-ruminantes, porque o primeiro efeito ocorre no rúmen através do sulfeto gerado

pelas bactérias e, conseqüentemente, a formação do composto indisponível tiomolibdato de cobre. A formação de tiomolibdato também afeta o metabolismo de enxofre por afetar sua absorção, o tiomolibdato reage com outras partículas e proteínas para formar complexos que se ligam fortemente, reduzindo sua solubilidade e conseqüentemente a absorção (AOYAGI e BAKER, 1994).

2.10 Funções fisiológicas do cobre

O cobre é necessário para a respiração celular, formação de ossos, desenvolvimento de tecido conectivo, queratinização e pigmentação de tecidos. O cobre também é um componente essencial de importantes metaloenzimas, incluindo a citocromo oxidase, superóxido dismutase e tirosinase. O cobre tem um importante papel na absorção e mobilização do ferro; baixos níveis de ferro são encontrados no soro na deficiência de cobre. A ceruloplasmina que é sintetizada no fígado e contém cobre, é necessária para oxidação do ferro, permitindo-o ligar com a proteína transportadora de ferro (transferrina). A anemia pode ser desenvolvida na deficiência de cobre ou ferro, sendo que na deficiência de cobre ocorre um atraso na maturação e menor tempo de vida das células vermelhas do sangue (O'DELL e SUNDE, 1997).

A deficiência de cobre afeta a enzima citocromo oxidase, importante na oxidação terminal da cadeia respiratória, porque catalisa e reduz O_2 para água, uma etapa essencial na respiração celular. A deficiência também prejudica a formação de colágeno e elastina, pois a enzima lisil-oxidase depende do cobre para dar às proteínas estruturais rigidez e elasticidade (McDOWELL, 1992).

Com relação à pigmentação, ela é principalmente observada na deficiência de cobre, nos pêlos e lã de mamíferos, sendo geralmente atribuída à deficiência de tirosinase, responsável pela quebra e conversão de tirosina para melanina. O cobre também é necessário para queratinização dos pêlos e da lã, pois é requerido para formação e incorporação dos grupos dissulfeto na síntese de queratina (McDOWELL, 1992).

Podem ocorrer falhas na reprodução de mamíferos alimentados com dietas deficientes em cobre, sendo que em ratos foi observada morte fetal (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Embriões de galinhas alimentadas com dieta deficiente em cobre apresentaram anemia e retardo no crescimento (McDOWELL, 1992).

A deficiência de cobre afeta o metabolismo de lipídeos, sendo que a deficiência deste resulta em um elevado nível de triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol no soro de ratos. Alterações no sistema circulatório de ratos alimentados com dietas deficientes em cobre apresentaram alterações no metabolismo de lipídeos e ácidos graxos de cadeia longa (McDOWELL, 1992).

2.11 Necessidade de cobre

Alguns fatores na dieta podem influenciar a necessidade de cobre incluindo: ferro, molibdênio, enxofre, zinco, chumbo, cádmio e fontes de proteínas. Em geral as recomendações não devem ser feitas para animais em regime de pastejo sem antes ter referências da forragem quanto à concentração de Cu, Mo e S. Para carneiros em pastagem deficiente em cobre recomenda-se 8 a 10 mg/kg (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Quando as condições da dieta são ótimas para utilização do cobre, 4 a 5ppm de cobre para aves e suínos e 8 a 10 mg/kg de Cu para ruminantes parecem ser adequados (NRC, 1985).

Alguns estudos mostraram em ovinos que a necessidade de cobre e a tolerância ao excesso pode ser afetada pela genética, o mesmo foi verificado em bovinos por Gooneratne e Christensen (1989) relatando que a deficiência de cobre em bovinos da raça Simental no Canadá era mais freqüente do que nas outras raças. As necessidades de Cu podem aumentar em função da formação de hemoglobina, crescimento, pigmentação dos pêlos e lactação.

2.12 Deficiência de cobre

A manifestação da deficiência de cobre inclui: anemia, diarréia, falhas reprodutivas, perda de pigmentação, falhas na queratinização, prejuízo no apetite e no crescimento. Em suínos com deficiência de cobre, foi verificado um aumento de 200% no tamanho do coração e rupturas de alguns vasos sanguíneos, provavelmente devido a problemas com a elastina (McDOWELL, 1992). Em aves, o principal sintoma é a anemia, mas freqüentemente ocorrem hemorragias internas, resultado de problemas na formação da elastina, e a dilatação do coração é uma patologia comum na deficiência de cobre (O'DELL et al., 1978).

Em ruminantes, a deficiência pode ser devido à ausência de cobre ou induzida por altos níveis de outros minerais como Mo e S. Um sinal comum em

cordeiros e cabritos jovens é a paralisia e incoordenação das pernas por afetar a mielina do sistema nervoso central (NRC, 1985). A perda de pigmentação da lã é sinal comum em carneiros, aparecendo bandas pigmentadas e despigmentadas em alternância (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). A deficiência sub-clínica tem grande efeito na economia, por prejudicar a produção de leite, crescimento e reprodução, sem apresentar evidências que se trata de deficiência de cobre.

2.13 Toxicidade do cobre

Variações consideráveis têm sido relatadas quanto à tolerância à toxicidade do cobre (NRC, 1980), sendo que existem algumas variações entre raças de animais; por exemplo, ovinos da raça Merino são mais tolerantes ao cobre que outras raças de ovinos (McDOWELL,1992). Os ruminantes são mais sensíveis que os não-ruminantes, bovinos e ovinos toleram níveis de 25ppm e 10ppm, respectivamente, enquanto suínos e aves podem receber rotineiramente de 100 a 250 ppm de Cu na forma de CuSO_4 (Sulfato de Cobre). Caso o molibdênio esteja na ração em nível abaixo de 1ppm, nível de 8-11ppm de cobre já pode causar intoxicação. Intoxicação por cobre pode levar o animal à anemia, prejudicar o crescimento e ocasionar problemas reprodutivos, em estágios mais avançados vômitos, salivação, convulsão, paralisia, podendo levar a morte (NRC, 1980).

A intoxicação aguda é geralmente observada após administração acidental de quantidades excessivas de Cu solúvel em sais, que pode estar presente em anti-helmínticos, misturas minerais, dietas formuladas erroneamente (NRC, 1980). A toxicidade é mais comum em ruminantes, raramente ocorre em monogástricos e humanos, porém, em suínos recebendo dietas com nível superior a 250 ppm de cobre, outros nutrientes podem ser afetados, podendo ocorrer a destruição de tocoferóis dos alimentos (DOVE e EWAN, 1990). A intoxicação crônica por cobre ocorre geralmente em animais em regime de pastejo, com alta ingestão de cobre e baixa ingestão de molibdênio e enxofre (NRC, 1985). Aumentando-se o molibdênio na dieta pode-se evitar a intoxicação por cobre, porém em novilhos recebendo 13,3 ppm de Mo houve redução na quantidade de proteína absorvida pelo intestino (BOILA e GOLFMAN, 1991).

Algumas pesquisas também mostraram que o baixo nível de Mo pode causar redução no crescimento e infertilidade de novilhas, independente da alteração no

metabolismo do cobre (PHILLIPPO; HUMPHRIES; ATKINSOM, 1987; SPEARS e KEGLEY, 1991).

2.14 Minerais quelatados

Estudos com minerais orgânicos ou quelatados têm sido desenvolvidos com a finalidade de garantir a absorção do mineral no trato intestinal, sem entrar no processo de competição iônica.

São denominados quelatos, compostos formados por íons metálicos seqüestrados por aminoácidos, peptídeos ou complexos polissacarídeos que proporcionam a esses íons alta disponibilidade biológica, alta estabilidade e solubilidade. Para a formação dos quelatos pode-se lançar mão de numerosas moléculas como ligantes que têm função específica no metabolismo. Elas são de baixo peso molecular e a capacidade oxidativa ou "ligante" depende do tamanho da molécula e da presença de radicais carboxílicos.

As principais moléculas são os ácidos aminados, ascórbico, cítrico, glucônico e etilenodiaminotetracético (EDTA). Normalmente, um cátion polivalente (mineral) pode fazer a ligação com uma, duas ou várias dessas moléculas, para formar um "composto mineral organicamente ligado" ou quelato, podendo assim ser vendido como fonte de mineral.

A Association of American Feed Control Officials AAFCO (1997) define esses produtos minerais orgânicos da seguinte forma:

- Quelato metal-aminoácido: 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.

- Complexo aminoácido-metal: produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido(s).

- Metal proteinado: produto resultante da quelação de um sal solúvel com uma proteína parcialmente hidrolisada.

- Complexo metal-polissacarídeo: produto resultante da complexação de um sal solúvel com polissacarídeo.

Em geral, elementos minerais quelatados possuem biodisponibilidade maior ou igual àqueles na forma de sulfato ou óxido (Ammerman e Henry, 1994).

2.14.1 Biodisponibilidade dos quelatados

O'Dell (1984) enfatizou a importância de estudos da utilização de nutrientes dentro do processo metabólico normal do animal. Daí tem-se tentado desenvolver compostos orgânicos semelhantes àquelas moléculas transportadoras de minerais no organismo animal, de maneira a garantir sua eficiência em suprir deficiências.

Assim, a disponibilidade biológica do metal na forma quelatada é dependente de três condições básicas na estrutura do composto:

- Forma de ligação com o metal: nos quelatados formados com dois ou três aminoácidos, o íon metálico fica inerte na molécula, entrando com facilidade nas vias metabólicas, pois assume a característica da molécula orgânica.
- Peso molecular da forma quelatada: o baixo peso molecular é a chave para a absorção como uma molécula intacta. Se o peso molecular de um quelato for maior do que 800 dáltons, certamente sofrerá prévia hidrólise na luz do trato digestivo e a absorção pela mucosa não será garantida (AAFCO, 1997).
- Constante de estabilização do quelatado: deve ser constituído de dois ou três anéis de aminoácidos quelantes para serem estáveis. Se a constante de estabilização dos aminoácidos é grande, estes irão resistir à ação de peptidases que quebram as ligações peptídicas internas, liberando o átomo de metal na molécula (Ashmead, 1993).

2.14.2 Absorção dos quelatados

O transporte para o interior das células acontece por difusão passiva ou por transporte ativo. Nessas condições é que podem ocorrer perdas pela reação com compostos, como colóides insolúveis ou no processo de competição pelos sítios de absorção entre os elementos minerais, com interações antagônicas que inibem a absorção (Herrick, 1993). Trabalhos "in vivo" têm demonstrado que minerais sob a forma de sais inorgânicos são geralmente ionizados no estômago e absorvidos no duodeno, onde o pH ácido determina a solubilidade. Daí são ligados a proteínas e incorporados pela membrana das células da mucosa intestinal (Ashmead, 1993).

No caso de aminoácidos quelatados, o elemento mineral metálico na molécula é quimicamente inerte, por causa da forma de ligação. Então não é afetado pelos diferentes ânions como os íons metálicos livres. Os minerais quelatados são absorvidos no jejuno, atravessam as células da mucosa e passam diretamente para o plasma.

Há necessidade de estudar melhor a seletividade dos agentes quelantes em relação aos minerais, à espécie e à quantidade mais efetiva, seu modo de ação e seu comportamento em diferentes espécies animais e interação com diferentes dietas. Os requerimentos dietéticos para minerais podem ser bem reduzidos pela adição de agentes quelantes à dieta animal, mas a relação custo benefício precisa ser melhor estabelecida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1: Confinamento

3.1.1 Local e período

O estudo foi conduzido nas dependências da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, no Campus de Pirassununga, por um período de 112 dias, sendo 28 dias de adaptação às instalações e alimentação.

3.1.2 Animais

Os animais foram selecionados no rebanho do Campus de Pirassununga evitando variações decorrentes de local, manejo, dieta, sistema de criação, idade e raça. Foram utilizados trinta e dois bovinos Nelore para o confinamento, sendo distribuídos oito animais por tratamento.

3.1.3 Instalações

Os animais do confinamento foram alojados em quatro baias, instaladas em barracão coberto, e a alimentação foi oferecida individualmente através do sistema de portão tipo “calan”.



Figura 1. Animais no confinamento em sistema de alimentação individual por sistema de portão tipo “calan”.

3.1.4 Procedimento experimental

Os animais foram colocados aleatoriamente nas baias e sorteados para os tratamentos. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, para proporcionar uma melhor ingestão da dieta e a cada 28 dias os animais foram pesados para verificar o desempenho e colhidas amostras de sangue para determinar enxofre e cobre no soro.

Após oitenta e quatro dias de experimento os animais foram abatidos, sendo realizadas colheita de fígado e rim, e realizadas pesagens para determinação do rendimento de carcaça. Foram retiradas três amostras do músculo *Longissimus dorsi* de cada animal para análise de maciez da carne.

3.2 Experimento 2: Animais Canulados

3.2.1 Local e período

Os animais foram colocados aleatoriamente nas baias no setor de animais canulados da FZEA/USP, durante um período de 76 dias, subdividido em quatro períodos de 19 dias, sendo 14 dias de adaptação às dietas e cinco dias para o ensaio de degradabilidade ruminal.

3.2.2 Animais e instalações

Foram utilizados oito novilhos, com cânulas ruminais, com peso médio de 380 ± 22 kg e idade aproximada de 24 meses, que permaneceram em baias com piso cimentado, sendo a contenção feita por cabresto e correntes, com bebedouros automáticos e cochos de alvenaria, conforme ilustra a figura 2.

3.2.3 Procedimento experimental

Após alocados nas baias os animais foram arraçoados com dieta total, semelhante a fornecida no confinamento. Foi utilizado cana-de-açúcar picada como volumoso, sendo a proporção volumoso:concentrado com base na matéria seca de 40:60. Durante a adaptação, a ração foi fornecida diariamente às 7:00 e às 15:00 em quantidade de matéria seca equivalente a 2% do peso vivo. As sobras foram

retiradas e pesadas diariamente antes da primeira alimentação. No período de colheita, a dieta fornecida correspondeu a 90% da ingestão média dos animais, de forma que não houvesse sobras.

Passado o período de adaptação de 14 dias para cada tratamento, foi colhido líquido ruminal durante cinco dias por período para contagem de protozoários e determinação do pH ruminal. Também foram incubados saquinhos de náilon para determinar a degradabilidade da matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido.

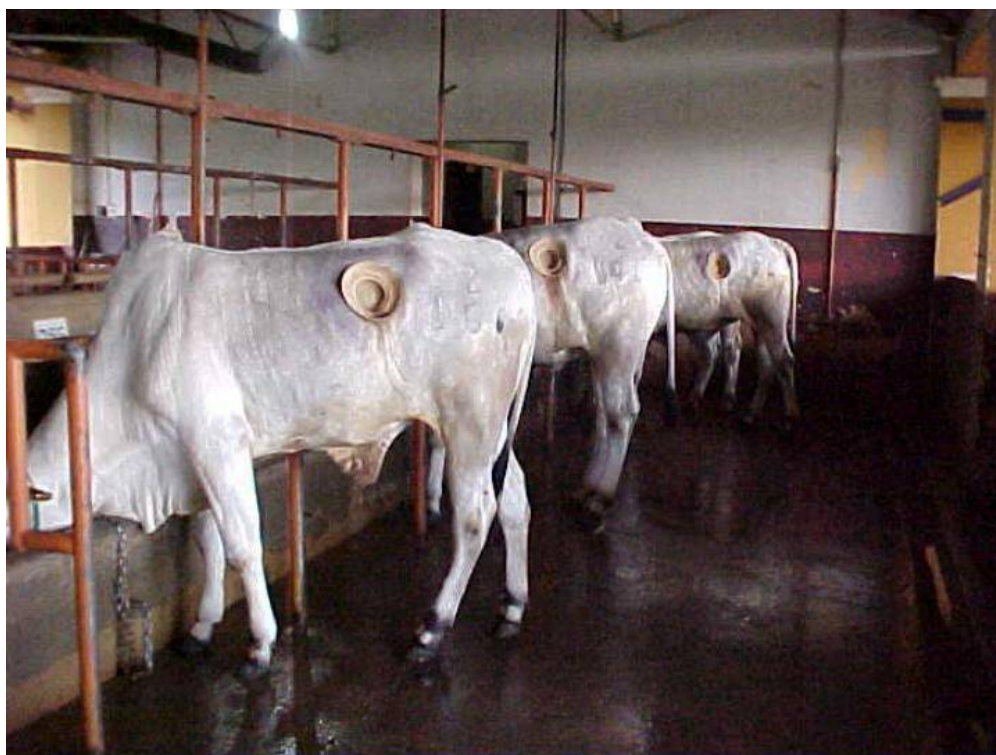


Figura 2. Animais canulados recebendo alimentação individual para ensaio de degradabilidade ruminal.

3.2.4. Degradabilidade Ruminal

A degradabilidade ruminal “*in situ*” foi realizada utilizando técnica de acordo com Orskov e McDonald (1979) utilizando sacos de náilon da marca Ankon (Ankon Technology) medindo 7x14 cm e com poros de 50 micrômetros.

Os sacos de náilon foram pesados individualmente e foram adicionadas amostras da dieta total com aproximadamente 5 e 6 gramas (0,05g e 0,06g de amostra por cm² do saco de náilon) secas a 65°C por 48 horas e moídas em moinho com peneira de orifício 2mm. Foram atados mosquetões de aço aos sacos de náilon e estes foram fechados com elásticos de látex, como ilustram as figuras 3 e 4.

Os períodos de incubação foram de 0, 1,5, 3, 6, 12, 24 e 48 horas para determinação da degradabilidade da matéria seca e proteína bruta e 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas para determinação da degradabilidade da fibra em detergente ácido e da fibra em detergente neutro.

Após a retirada dos sacos de náilon do rúmen, estes foram lavados em água corrente com balde, até que a água se apresentasse clara. Então foram secos em estufa a 65°C por 48 horas.

No tempo zero, ou seja, antes da alimentação, os sacos de náilon foram mergulhados em água aquecida a 39°C por 15 minutos conforme técnica descrita por Cummins et al. (1983).

Após a secagem, os sacos foram pesados e as amostras armazenadas em potes plásticos identificados para posterior análise de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN).

O percentual de degradabilidade de matéria seca foi calculado pela fórmula:

$$DMS\% = \left(1 - \frac{SPI - SV}{SAI - SV} \right) \times 100$$

Onde:

DMS% = percentual de degradabilidade da MS;

SPI = peso do saco após a incubação ruminal;

SAI = peso do saco antes da incubação ruminal;

SV = peso do saco vazio.



Figura 3. Saquinho de náilon utilizado para ensaio de degradabilidade.



Figura 4. Saquinhos de náilon com peso, após incubação no rúmen.

3.2.5 Amostragem de líquido ruminal

O líquido ruminal foi colhido com o uso de bomba de vácuo, como pode ser observado na figura 5 e captado em kitassato. Foi colhida amostra de aproximadamente 100 mL.

As colheitas foram realizadas para determinação do pH e análises de protozoários.

3.2.6 Fermentação Ruminal

3.2.6.1 pH Ruminal

A determinação do pH do líquido ruminal foi feita logo após a colheita, através de peagâmetro de mesa calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

3.2.6.2 Protozoários Ciliados

Uma alíquota de 10 mL de líquido ruminal foi transferida para frascos de vidro com 10mL de formaldeído a 37%. As amostras permaneceram em repouso até o momento das determinações, que foram executadas conforme metodologia de Dehority (1977) para determinação das curvas de aparecimento dos gêneros de ciliados, utilizando câmara de contagem de Sedgwick-Rafter com capacidade de 1mL. Utilizou-se microscópio ótico comum provido de retículo com área de 0,4362 mm².



Figura 5. Colheita de líquido ruminal com bomba de vácuo.

3.3 Tratamentos

Os animais foram distribuídos nos seguintes tratamentos:

Controle: Controle negativo;

Flor de enxofre: Enxofre inorgânico;

Metionina: Aminoácido sulfurado;

Carboquelatado: Enxofre orgânico na forma de carboquelado.

Em todos os tratamentos, com exceção do controle negativo, foi oferecido 0,20% de enxofre, 10 mg de cobre e 5mg de molibdênio por quilograma de matéria seca ingerida.

As misturas de vitaminas e minerais foram formuladas e confeccionadas especificamente para este experimento, sem adição dos minerais em estudo,

enxofre, cobre e molibdênio, sendo estes pesados em balanças de precisão e incluídos em 500g de concentrado visando maior controle e segurança na ingestão destes nutrientes. Durante todo período experimental os animais receberam água "ad libitum", e ração formulada segundo as recomendações do (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

Tabela 1 – Composição percentual da ração experimental.

Ingrediente	% da MS
Milho moído	17,548
Polpa cítrica	27,000
Uréia	1,000
Cana-de-açúcar	40,000
Farelo de algodão 38%	13,452
Rumensin	0,027
Minerais	1,000
Total	100

3.4 Análises

Na ração, conforme ilustra a tabela 2, foram executadas as seguintes determinações: matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, matéria mineral, cálcio, fósforo, potássio e enxofre (AOAC, 1990). Os tecidos colhidos sofreram os seguintes procedimentos antes de serem submetidos as análises: descongelamento, separação de um fragmento retirado sempre da mesma região do órgão, lavado em água destilada deionizada, seco em papel absorvente descartável e pesado em balança de precisão.

No caso do soro, este foi descongelado, e com o uso de pipetas volumétricas foram retiradas amostras necessárias para cada análise.

O enxofre foi determinado por turbidimetria em sistema "Flow Injection Analysis" e o cobre por espectrofotometria de absorção atômica.

Tabela 2 – Resultados da análise bromatológica das rações fornecidas aos bois nos diferentes tratamentos

Nutrientes (%)	Controle	Flor de Enxofre	Metionina	Carboquelatado
MS	47,80	47,53	48,01	47,19
PB	13,28	13,79	13,85	13,47
FB	27,62	28,47	26,94	27,51
EE	1,75	1,98	1,45	1,67
MM	3,24	3,91	4,16	4,11
FDA	23,63	23,14	24,05	23,81
FDN	56,85	55,33	54,98	56,92
S	0,09	0,23	0,28	0,21
Ca	0,92	0,90	0,97	0,93
P	0,41	0,38	0,37	0,44
K	0,90	0,87	0,92	0,91
Cu (mg/kg)	6,02	11,53	10,94	11,71

MS: Matéria Seca (105°C); PB: Proteína Bruta; FB: Fibra Bruta; EE: Extarto Etéreo; MM: Matéria Mineral; FDA: Fibra em Detergente Ácido; FDN: Fibra em Detergente Neutro; S: Enxofre; Ca: Cálcio; P: fósforo; K: Potássio; Cu: Cobre.

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento estatístico foi do tipo inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento no experimento de desempenho. Para o experimento com animais canulados foi utilizado o delineamento experimental em quadrado latino 4 x 4, totalizando 8 animais canulados por tratamento. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1988), analisando as variáveis através de contrastes pelo PROC GLM, para o estudo da relação entre as fontes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho e Conversão Alimentar

Os resultados de desempenho e conversão alimentar durante os períodos experimentais estão apresentados nas figuras 6, 7, 8 e 9

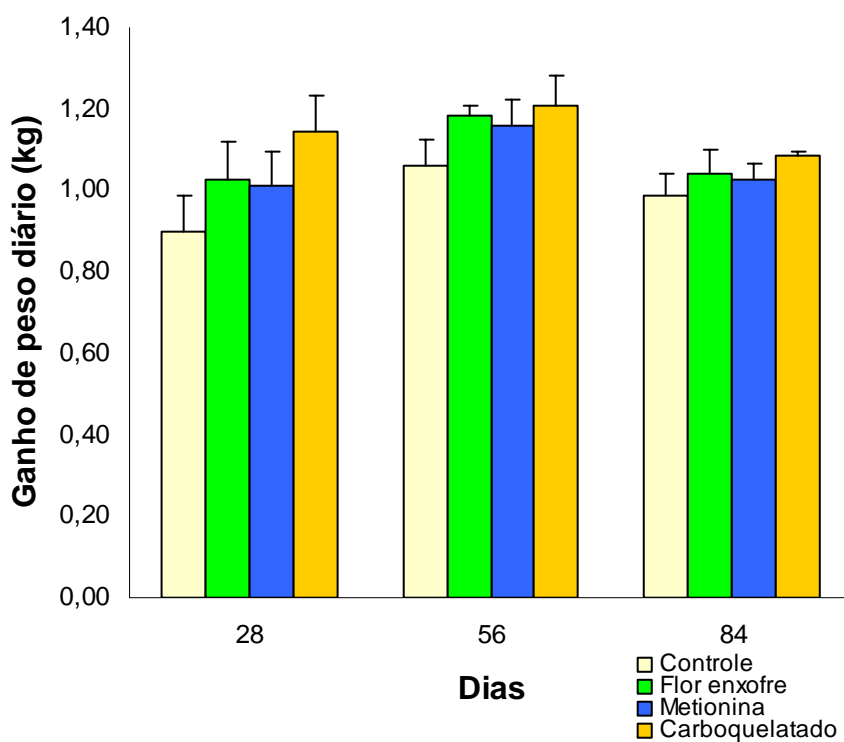


Figura 6. Desempenho de bovino Nelore em confinamento, submetidos a tratamentos com diferentes fontes de enxofre.

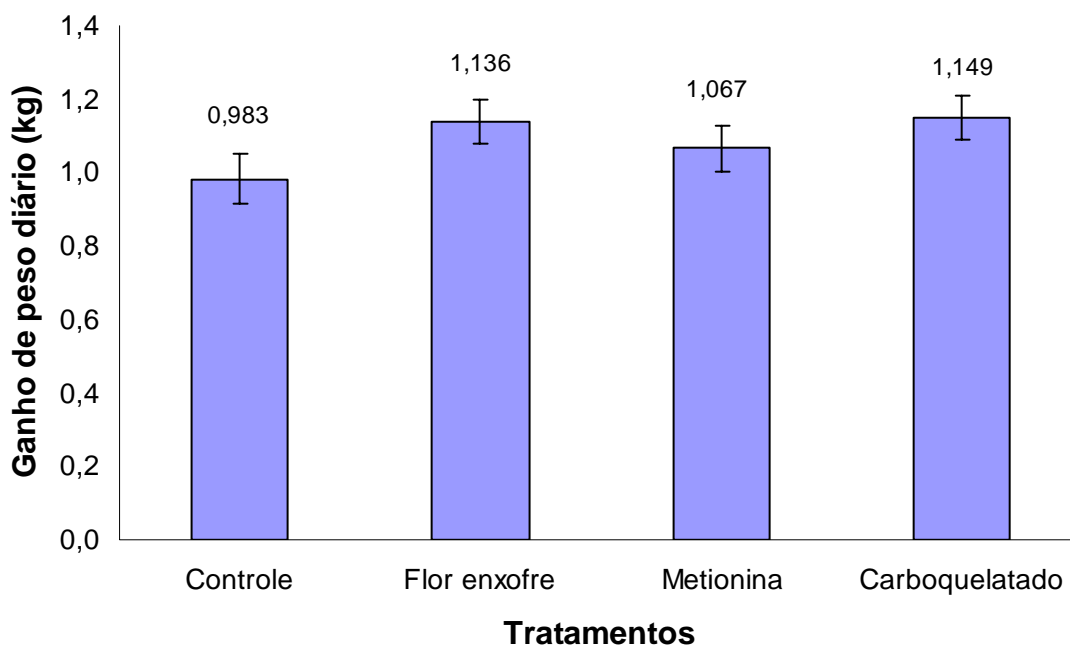


Figura 7. Desempenho médio de bovinos Nelore em confinamento, submetidos a tratamentos com diferentes fontes de enxofre.

Pela figura 6, é possível observar que houve um maior ganho de peso no primeiro período ($P < 0,05$) para os animais do tratamento com carboquelatado, com ganho de peso 11% superior à flor de enxofre. No entanto, se considerarmos o período total de confinamento, como ilustra a figura 7, não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) entre as fontes flor de enxofre, metionina e carboquelatado, mas nas três fontes testadas o desempenho foi maior do que no grupo controle, mostrando que de fato é necessário suplementar enxofre acima do nível da dieta basal para obter um bom desempenho.

A taxa de crescimento em ruminantes tem sido utilizada como parâmetro para adequar a quantidade de enxofre na dieta, especialmente em dietas contendo nitrogênio não protéico, como uréia. Em dietas de ovinos e caprinos contendo 4% de uréia, houve um aumento no ganho de peso dos animais suplementados com metionina (BIRD e MOIR, 1972), sulfatos e enxofre na forma elementar (ONWUKA e AKINSOYINU, 1989).

Bouchard e Conrad, (1973) adicionaram sulfato de sódio e metionina em uma dieta basal de ovinos contendo 0,06% de enxofre elevando para 0,18% de enxofre e

verificaram um aumento de 14% na produção, mas não houve diferença significativa entre as fontes.

Kandyliis (1984) verificou que em ruminantes não se faz necessária a inclusão de aminoácidos sulfurados na dieta, uma vez que a anatomia digestiva dos animais permitem que a população de microrganismos do rúmen consigam incorporar fontes inorgânicas de enxofre em proteína microbiana, que seguindo a digestão para o intestino delgado por proteólise enzimática, deixa disponível os aminoácidos necessários para formação de tecidos nos ruminantes.

Experimentos com biodisponibilidade foram realizados em bovinos e ovinos em crescimento, (Gil; Shirley e Moore, 1973; Patterson e Kung, 1988) e não encontraram diferenças significativas entre as fontes como sulfato de sódio, sulfato de amônia, sulfato de cálcio, nem mesmo quando comparada às formas orgânicas incluindo os isômeros de metionina.

Portanto, fica evidente que o enxofre é um nutriente mais crítico para ruminantes do que para monogástricos e que de maneira geral, não são encontradas diferenças significativas quando o parâmetro analisado é o ganho de peso.

Nas figura 8 e 9 podemos analisar a conversão alimentar por período e a conversão alimentar média respectivamente.

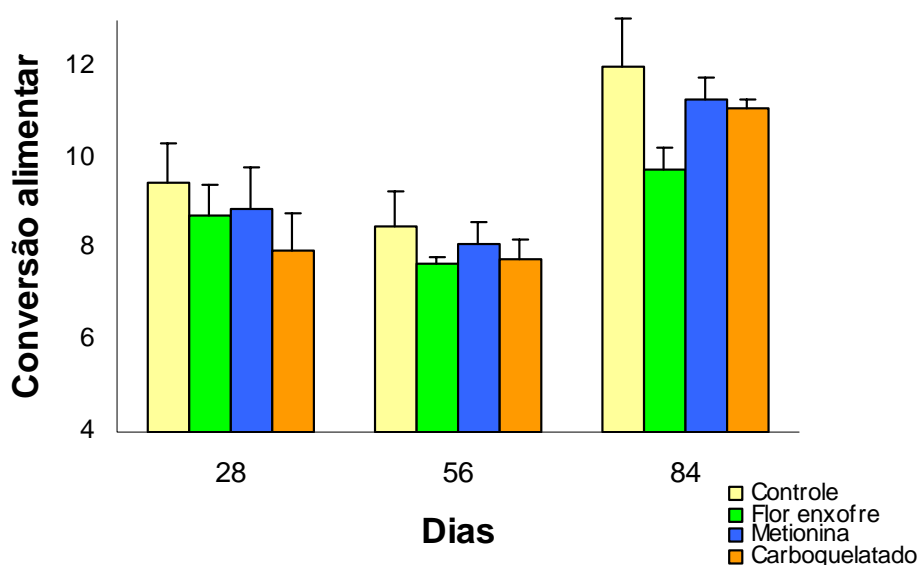


Figura 8. Conversão alimentar (kg MS/kg ganho) em períodos de 28 dias, de bovinos Nelore em confinamento, suplementados com diferentes fontes de enxofre.

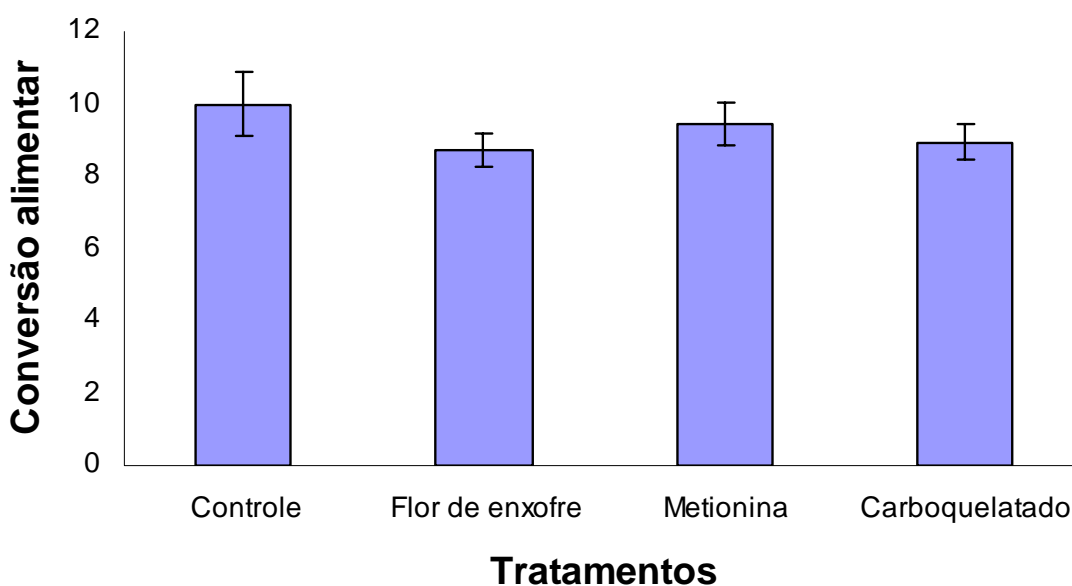


Figura 9. Conversão alimentar média (kg MS/kg ganho) de bovinos Nelore em confinamento, suplementados com diferentes fontes de enxofre.

Observando a figura 8, verificamos que ocorreu uma piora na conversão alimentar no terceiro período, resultado explicado pela própria fisiologia do crescimento, que mostra a necessidade de um maior aporte energético para deposição de gordura.

No primeiro período, a conversão alimentar foi significativamente melhor ($P < 0,05$) para o carboquelatado quando comparado as demais fontes, mas este resultado não se manteve se considerarmos todo período de confinamento, onde não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) entre as fontes flor de enxofre, carboquelatado e metionina, ocasião em que as três fontes diferiram ($P < 0,05$) do tratamento controle, como podemos observar na figura 9. A metionina teve tendência a uma menor conversão alimentar, talvez pelo próprio fato de ter baixa palatabilidade, como verificou Kandyli (1984) utilizando dietas com 12 a 24 g/dia de metionina.

Underwood e Suttle (1999) verificaram que a metionina não oferece vantagens como fonte de enxofre para ruminantes, pelo fato de não ter proporcionado benefícios significativos em ganho de peso e degradabilidade ruminal, além de ser mais cara do que as fontes inorgânicas freqüentemente utilizadas. Por isso, tem se recomendado o uso de fontes inorgânicas para

maximizar a síntese de proteína microbiana seguida por um bom desempenho e a um custo acessível. Quando fazemos a inter-relação entre conversão alimentar e ganho de peso, também podemos observar que a fonte com carboquelatado apresenta um bom resultado no primeiro período, sendo uma alternativa interessante para animais em crescimento, desde que a relação custo/benefício seja atendida.

4.2 Parâmetros sanguíneos para cobre e enxofre

A cada vinte e oito dias foram colhidas amostras de sangue para determinação de enxofre e cobre, conforme ilustram as figuras 10 e 11.

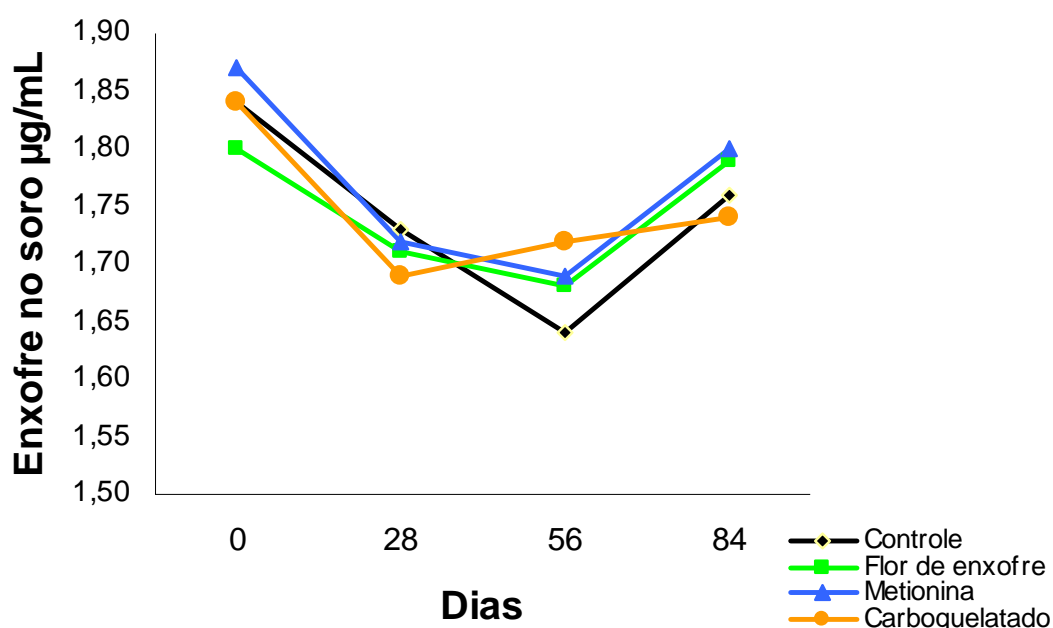


Figura 10. Concentração de enxofre em $\mu\text{g/mL}$ no soro sanguíneo de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

A figura 10 mostra que no início do experimento os animais apresentavam uma maior quantidade de enxofre no soro sanguíneo, provavelmente devido à dieta que eles recebiam, pasto de *Brachiaria brizantha* com suplementação mineral *ad libitum*. No terceiro período houve um aumento em todos os tratamentos, entretanto, não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as fontes, quando considerada a concentração de enxofre no soro sanguíneo.

Todos os tratamentos superaram os níveis considerados críticos por Weston et al. (1988) que é de 1,6 µg/mL e o de Hegarty, Nolan e Leng (1991) que consideram crítico abaixo de 1,0 µg/mL

Mata et al. (1997) e White, Kumagai e Bernes (1997) verificaram que a concentração de enxofre no soro é um bom parâmetro para se detectar a deficiência de enxofre na dieta, ou o uso de fontes de baixa biodisponibilidade.

Ojeniyi e Kayode (1993) também verificaram que pastagens fertilizadas com 50kg/ha de sulfato de cálcio (CaSO₄) ou sulfato de potássio (K₂SO₄) garantem níveis de enxofre normais para as atividades metabólicas e melhoram o desempenho dos animais, pois o enxofre também ajuda na atividade dos microrganismos ruminais. Suttle (1991) verificou que além do enxofre, para se obter um ganho satisfatório é necessário atender os requerimentos de energia, nitrogênio e fósforo.

Morrison, Murrai e Boniface (1990), verificaram que a concentração de enxofre no soro sanguíneo geralmente reflete se ocorre uma ingestão suficiente, quando outros fatores não influenciam. A falta de nitrogênio por exemplo pode reduzir a síntese de proteína microbiana e com isso aumenta os níveis de enxofre no soro.

Underwood e Suttle (1999) descreveram a importância em suplementar enxofre e o acompanhamento através da concentração no soro, devido a sua grande importância em funções associadas com a formação de tecido conectivo; queratina, condroitina, hormônios como a insulina e a ocitocina e vitaminas como a tiamina e biotina. Também participa da constituição de diversas proteínas, está presente nas reações sulfidril (SH) e mantém a configuração espacial de cadeias de polipeptídeos que se ligam a grupos prostéticos e substratos que são essenciais para atividade de muitas enzimas.

Apesar da importância do enxofre, pelo presente trabalho, é possível afirmar que as três fontes utilizadas são capazes de atender os requerimentos para o enxofre levando em consideração o parâmetro sanguíneo, portanto o fator custo pode ser determinante na escolha de uma delas.

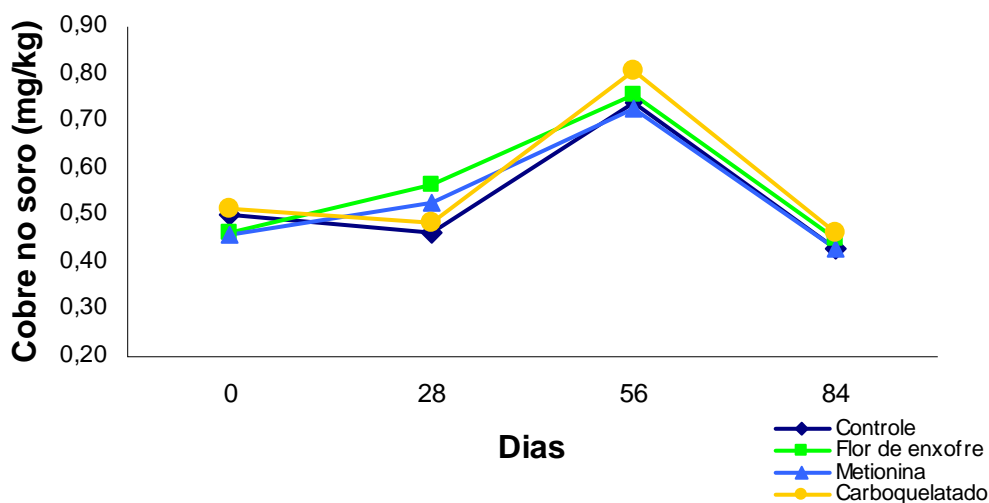


Figura 11. Concentração de cobre em (mg/kg) no soro sanguíneo de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

A figura 11 nos permite observar que ocorrem alterações nos níveis de cobre no soro sanguíneo no decorrer do tempo, mas não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) quando utilizadas diferentes fontes de enxofre.

A deficiência de cobre tem efeito negativo em numerosos órgãos e tecidos, incluindo o sistema hematopoiético, cardiovascular e sistema nervoso central. A deficiência de cobre é um problema em regiões onde os animais estão em regime de pastejo, sem uma suplementação adequada, pois além da baixa concentração nas forragens, elevadas quantidades de enxofre e molibdênio podem interferir na sua utilização. Como em todos tratamentos ocorreu suplementação com cobre 10 mg/kg de matéria seca, não houve sinais de deficiência, mesmo na presença do enxofre 0,2% e do molibdênio 5mg/kg de matéria seca.

Observando a figura 10 e 11 simultaneamente pode-se perceber que as curvas têm comportamentos contrários, mostrando que de fato existe antagonismo entre os elementos enxofre e cobre, mas a fonte de enxofre não se mostrou um fator determinante.

Suttle (1975), aplicando o princípio da depleção-repleção para verificar a biodisponibilidade de cobre em ovinos, verificou que a hipocupremia ocorre quando o nível de cobre no plasma é inferior a 0,35 ppm.

Lee et al. (1999) mensuraram e compararam a concentração de cobre no soro e no fígado como indicadores de biodisponibilidade e verificaram que o fígado é o melhor órgão, pois promove uma resposta linear e uma menor variabilidade entre os dados.

A baixa concentração de cobre no soro pode causar ruptura da aorta, pois diminui a capacidade de formar desmosina de lisina e com isso reduz a elasticidade da aorta (BUCKINGHAN et al., 1981). Thompson et al. (1994) verificaram que níveis de cobre no soro abaixo do normal, podem levar os animais a um quadro de anemia em todas as espécies, além de defeitos na cartilagem articular e desordens no desenvolvimento ósseo, facilitando as fraturas.

A técnica de balanço geralmente não dá bons resultados para mensurar biodisponibilidade de cobre em ruminantes (SUTTLE, 1977). A taxa de crescimento também tem sido pouco utilizada por ser relativamente insensível à adição de cobre na dieta.

O parâmetro sangüíneo apesar de não fornecer o melhor resultado, permite com facilidade o acompanhamento para verificar se as concentrações mínimas estão sendo atingidas, uma vez que a deficiência subclínica tem grande efeito na economia por prejudicar a produção de leite, crescimento e reprodução, sem apresentar evidências de que se trata de deficiência de cobre.

4.3 Concentração de cobre e enxofre no fígado

As figuras 12 e 13 mostram respectivamente a concentração de enxofre e cobre no fígado.

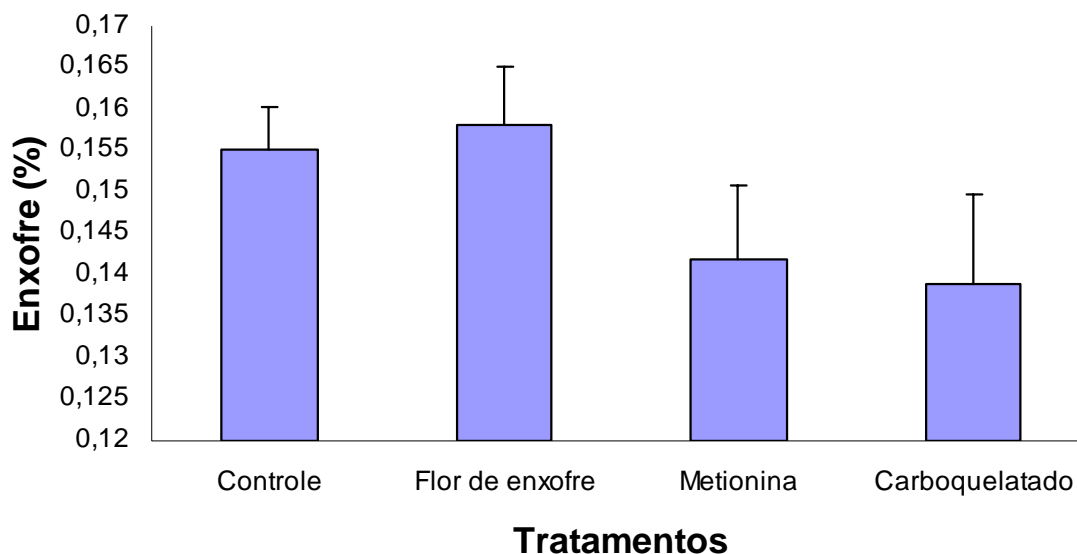


Figura 12. Concentração de enxofre (%) no fígado de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

Através da figura 12, e observando os resultados da análise estatística, pode-se afirmar que os tratamentos utilizando metionina e carboquelatado diferem significativamente ($P < 0,05$) dos tratamentos com flor de enxofre e controle.

Apesar de não se encontrar trabalhos com mensuração de enxofre no fígado para confrontar os dados, pode-se perceber que as formas orgânicas têm um menor acúmulo, talvez devido a uma maior biodisponibilidade, o que permite o seu uso pelos microrganismos do rúmen e mais tarde através da proteína microbiana são utilizados para formação do tecido muscular.

As denominadas fontes orgânicas, representadas por complexos organominerais, que, segundo Baruselli (2000), são complexos de quelação entre um íon mineral e aminoácidos, apresentam elevado índice de absorção entérica, e superior biodisponibilidade em relação às demais.

Em geral, elementos minerais quelatados mostraram biodisponibilidade maior ou igual àqueles na forma de sulfato ou óxido (AMMERMAN,BAKER e LEWIS, 1995).

Embora as formas orgânicas tenham apresentado menores concentrações de enxofre no fígado, podemos considerar valores normais entre 0,14 e 0,16 % de enxofre, pois não foram verificadas alterações ou prejuízos ao metabolismo e desempenho dos animais.

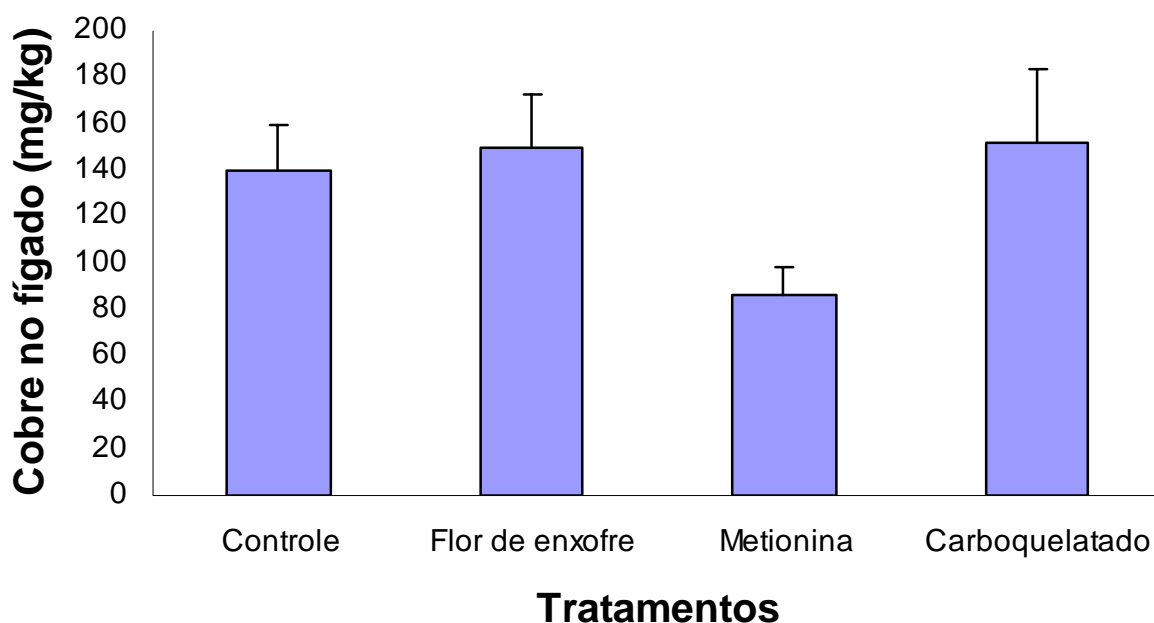


Figura 13. Concentração de cobre (mg/kg) no fígado de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

Observando a figura 13, verifica-se que o tratamento com metionina proporcionou um menor acúmulo de cobre no fígado quando comparado aos demais, sendo esta diferença significativa ($P < 0,05$). Solomon et al. (1991) mostraram efeito antagônico do enxofre em doses elevadas, próximo a 0,4%, sobre a absorção de cobre e nível de cobre hepático. A concentração de cobre no fígado tem sido utilizada para comparar a disponibilidade de cobre de várias fontes em suplementos para aves (LEDOUX et al., 1996); suínos (CROMWELL et al., 1978); bovinos (IVAN, 1988) e ovinos (CHARMLEY e IVAN, 1989). O acúmulo de cobre no fígado é dependente da concentração de cobre na dieta e varia de acordo com a espécie.

Com relação às fontes: sulfato de cobre, carbonato de cobre, óxido cuproso, cobre metionina e cobre lisina, não foram encontradas diferenças significativas, entretanto, o óxido de cobre teve menor biodisponibilidade (CROMWELL et al., 1998). Resultado semelhante foi encontrado por Kegley e Spears (1993), que verificaram uma baixa biodisponibilidade do óxido de cobre administrado oralmente para bovinos em crescimento.

Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que a metionina possui um maior efeito antagônico sobre o acúmulo de cobre no fígado, mas em todos os tratamentos os valores obtidos ficaram acima da concentração mínima de 80 mg/kg, citada por (McDOWELL, 1992). Penedo et al (2006) considerou valores normais para concentração de cobre hepático em bovinos superiores a 50 mg/kg, pois não influenciou no desempenho esperado.

4.4 Concentração de cobre e enxofre no rim

As figuras 14 e 15 ilustram respectivamente as concentrações de enxofre e cobre no rim

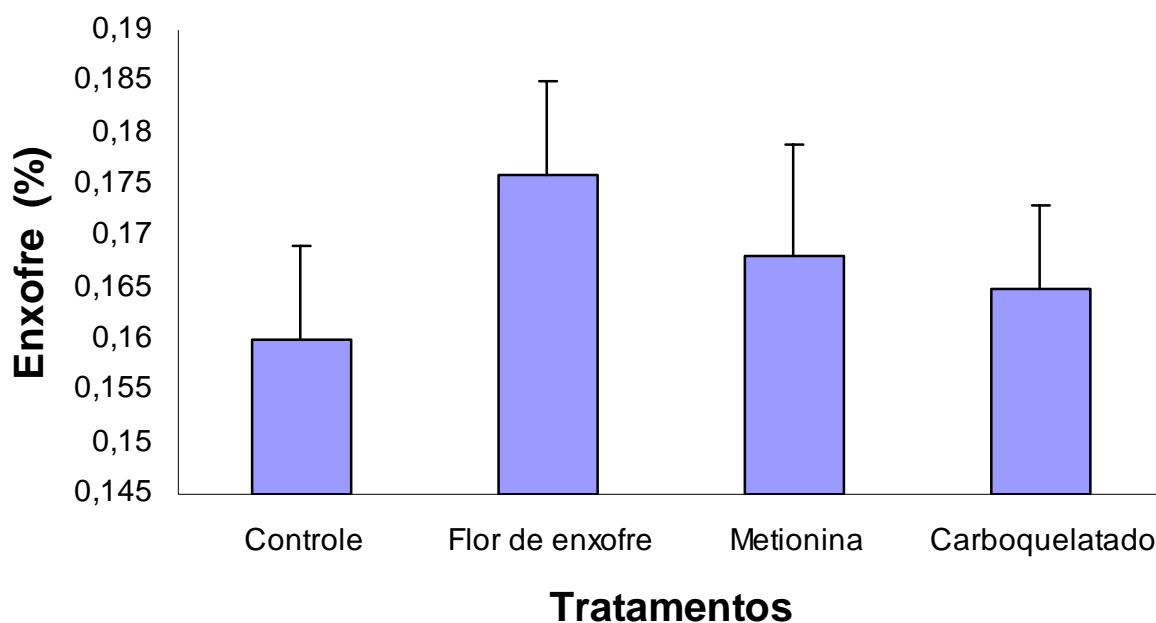


Figura 14. Concentração de enxofre (%) no rim de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

Analisando a figura 14, verifica-se que o tratamento controle apresentou uma menor quantidade de enxofre no rim, não havendo diferença significativa ($P>0,05$) quando comparado às demais fontes de suplementação. O enxofre é excretado principalmente através da urina como sulfato, derivado da oxidação de sulfito e do catabolismo de moléculas orgânicas contendo enxofre. Após a filtração glomerular, ocorre reabsorção nos túbulos e o excedente é excretado (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Bishara e Bray (1978) verificaram que o sulfato compete com o molibdato na reabsorção tubular e como o enxofre é um macronutriente, ele tem um efeito maior na reabsorção do micronutriente, mas o molibdênio influencia a excreção urinária de sulfato.

A ausência de trabalhos com este parâmetro dificulta a discussão, mas pode-se atribuir este menor valor ao tratamento controle, devido a ausência de uma fonte para suplementar o enxofre.

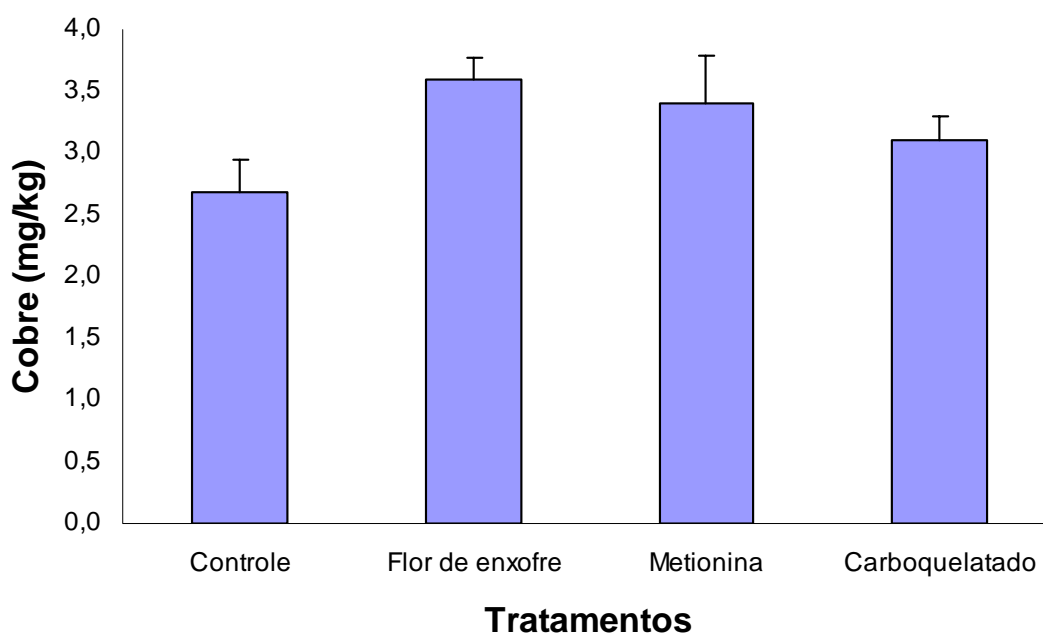


Figura 15. Concentração de cobre (mg/kg) no rim de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

A figura 15 ilustra um resultado esperado para o tratamento controle, com menor concentração de cobre no rim, ($P<0,05$) quando comparado aos demais tratamentos. Suttle (1974) já havia descrito que o acúmulo de cobre depende da

concentração de cobre na dieta, sendo que também ocorrem variações de acordo com as espécies. Simpson, Mills e McDonald (1981) verificaram que animais com bom desempenho e adequada conformação de carcaça apresentavam concentração de cobre no rim superior a 0,8 mg/kg com base na matéria fresca.

Penedo et al. (2006), obtiveram concentração de cobre no rim de bovinos próximo a 4,6 mg/kg na matéria fresca em pastagens adubadas com dejetos de suínos que recebiam dietas com 100mg/kg de cobre na matéria seca e consideraram o valor normal por ser inferior ao limite de 6mg/kg, que poderia causar problemas com intoxicação cúprica como relatou Puls, (1994).

No presente trabalho os valores obtidos foram satisfatórios e de fato os animais apresentaram bons resultados para ganho de peso e parâmetros de carcaça analisados.

4.5 Concentração de uréia no soro sanguíneo

A figura 16 ilustra a concentração de uréia no soro sanguíneo durante cada período dos 84 dias de confinamento

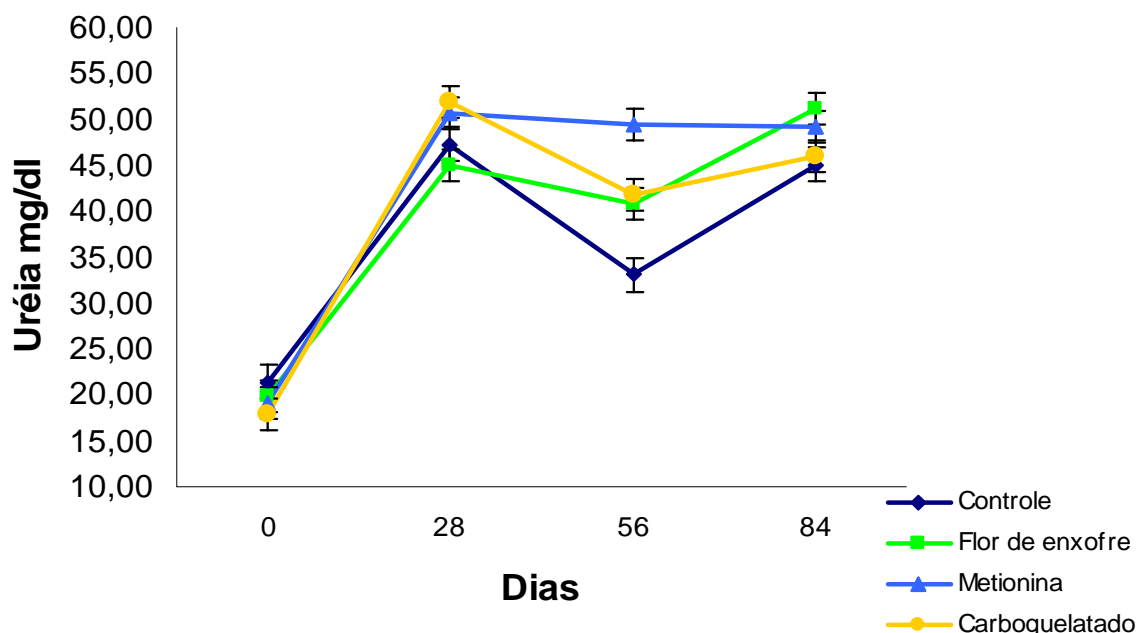


Figura 16. Concentração de uréia no soro sanguíneo (mg/dl) de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

Não foi encontrada diferença significativa ($P>0,05$) para concentração de uréia no soro sanguíneo em função da fonte de enxofre utilizada. A concentração de uréia pode ser utilizada para monitorar a ingestão de proteína, que deve ser o mais próximo possível das necessidades do animal. O excesso de nitrogênio pode prejudicar o desempenho reprodutivo e aumentar as exigências de energia, uma vez que são necessárias 13,3 kcal de energia digestível para excretar um grama de nitrogênio (BRODERICK E CLAYTON, 1997).

Dukes (1996) considerou como valores normais para bovinos entre 10 a 30 mg/dl, sendo que Pires et al. (1993) verificaram valores superiores a 30 mg/dl em dietas com nitrogênio originário da uréia e baixo nível de energia na dieta. Ruas, Torres e Borges (2000) encontraram níveis de uréia plasmática entre 15 e 33 mg/dL, que corresponde a valores entre 7 e 15 mg/dL de nitrogênio uréico plasmático (NUP). Hayes, Pfeiffer e Willimson (1996) encontraram em dietas com proteína bruta acima de 20 % valores correspondente a concentração de uréia no plasma superior a 45 mg/dl. Resultado que se assemelha ao encontrado no presente trabalho e que pode ser considerado normal para animais em confinamento, visto que o concentrado continha uréia em sua composição e o ganho de peso diário estimado foi alcançado.

4.6 Resultados de carcaça e maciez da carne

As figuras 17 e 18 mostram os resultados referentes ao rendimento de carcaça e maciez, respectivamente.

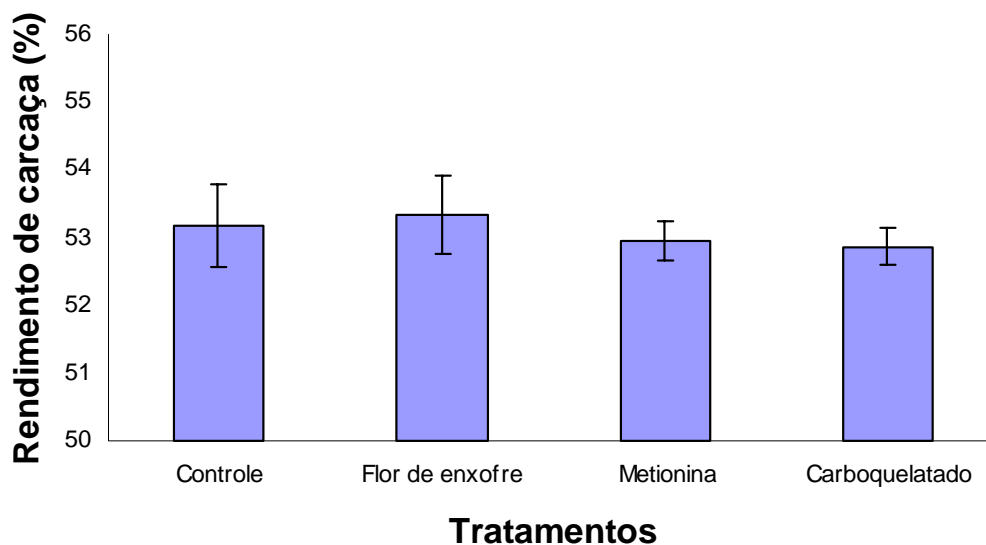


Figura 17. Rendimento de carcaça de bovinos nelore abatidos após 84 dias de período experimental.

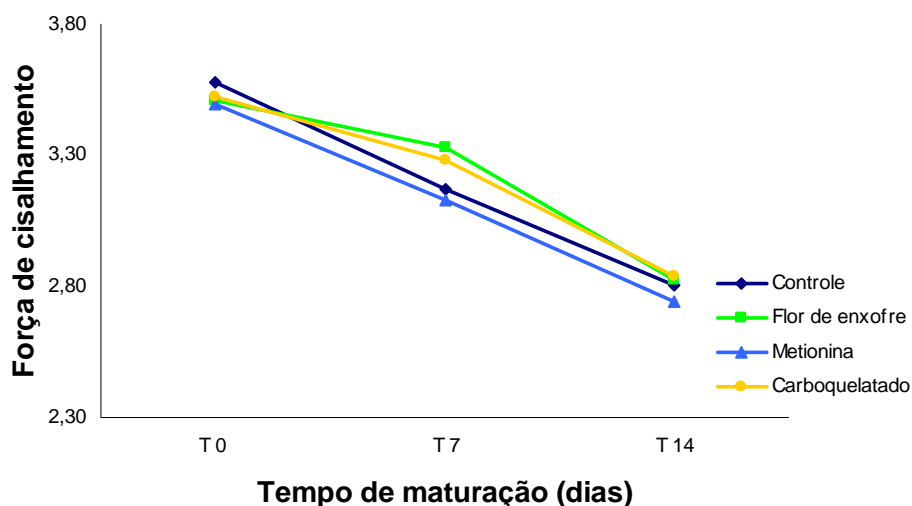


Figura 18. Força de cisalhamento no músculo *Longissimus dorsi*, de bovinos Nelore em confinamento alimentados com diferentes fontes de enxofre.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros de rendimento de carcaça e força de cisalhamento. Mas, foi observada uma diferença significativa no tempo para maciez ($P<0,05$), indicando que a maturação é um fator determinante na maciez da carne, independente do tratamento. Felício (1997) afirmou que alguns dos atributos mais importantes para atender as exigências do mercado consumidor são a maciez e suculência, garantindo ao produto qualidade gustativa.

Esses atributos podem sofrer influências de vários fatores, destacando-se os intrínsecos, vinculados ao genótipo dos animais, à nutrição, às condições ambientais, e os fatores extrínsecos, que se confundem com os procedimentos técnicos, adotados pelos frigoríficos e demais segmentos, até o consumidor final.

A carne possui baixa concentração de compostos que contêm enxofre, mas ele possui uma grande contribuição para o sabor, porque tem boa detecção sensorial (DRUM e SPAINER, 1991; GIJS et al., 2000). Trabalhos como de Raes et al. (2003), relataram que a concentração de compostos contendo enxofre na carcaça geralmente é maior em animais em regime de pastejo, principalmente em regiões onde se realiza adubação de pastagens, pois aumenta a concentração de enxofre na planta, chegando a 0,29% como descreveram Zin et al., (1997).

Campos et al. (2003) perceberam que aumento na concentração de cisteína na carne modifica a percepção do odor durante o cozimento, sendo este aspecto de grande relevância para não afetar a aceitação dos produtos cárneos perante o mercado consumidor.

4.7 Degradabilidade ruminal

Foi avaliada a degradabilidade da MS, PB, FDN e FDA com a intenção de averiguar o efeito das fontes de enxofre na degradabilidade da dieta, como ilustram as figuras 19,20,21 e 22.

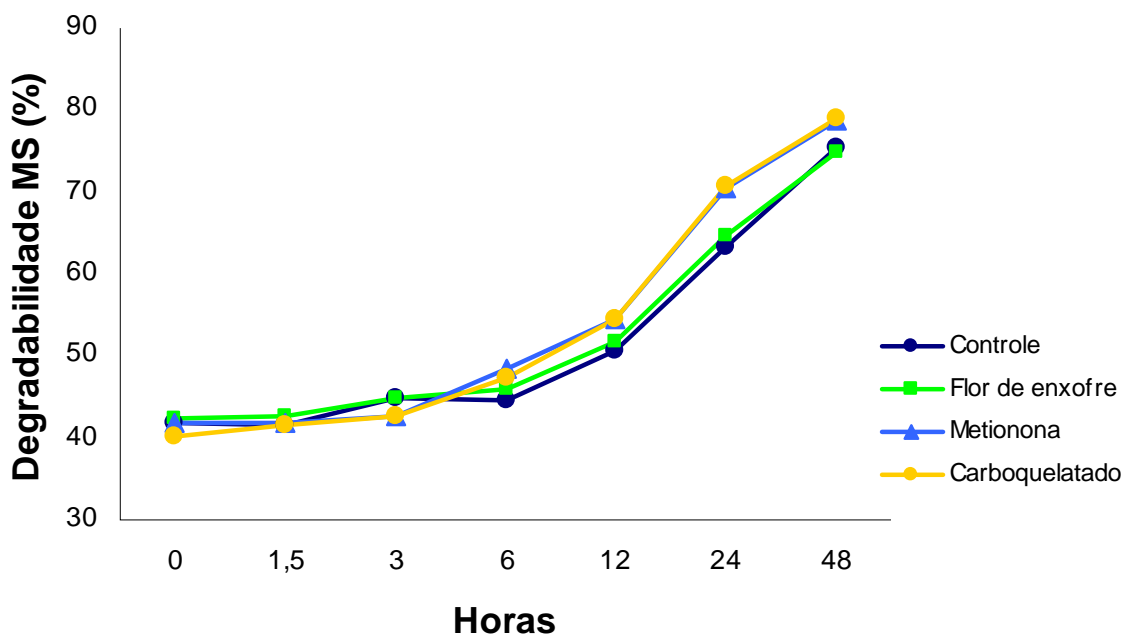


Figura 19. Degradabilidade da Matéria Seca nos diferentes tempos em bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na degradabilidade da matéria seca (MS) em função das diferentes fontes de enxofre, apesar do enxofre orgânico (carboquelatado) e metionina apresentar uma tendência positiva na degradabilidade, com diferença significativa para $P = 0,14$ quando comparado aos tratamentos controle e flor de enxofre. A curva de degradabilidade mostra um crescente aumento até 48 horas, chegando a 78%, valor próximo ao obtido por Valinote (2003), que foi de 74% também utilizando cana-de-açúcar como volumoso.

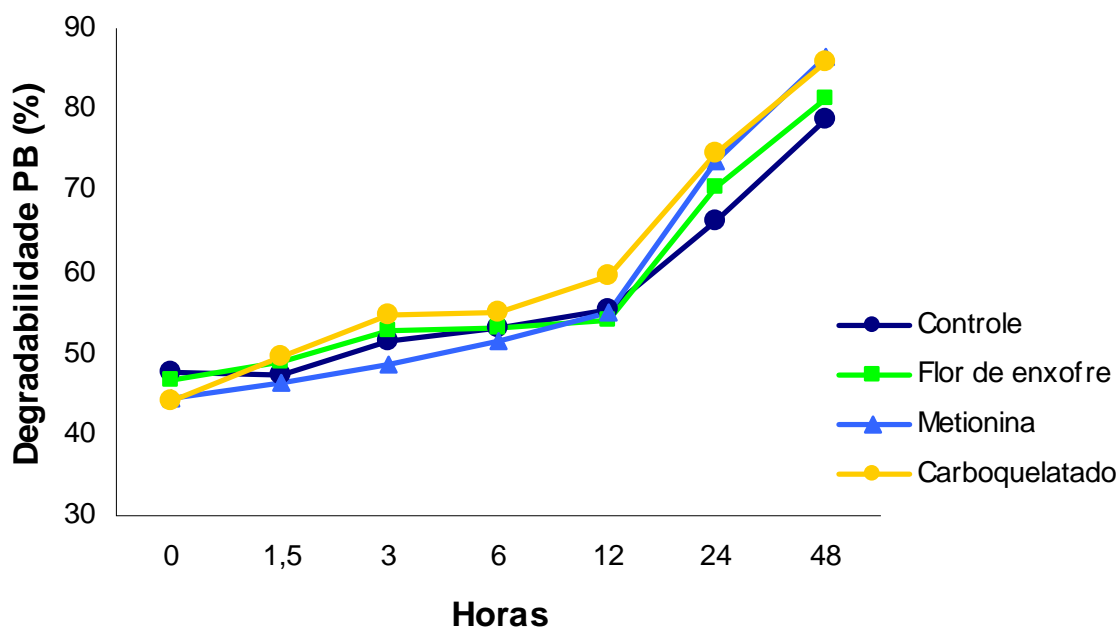


Figura 20. Degradabilidade da proteína bruta em função do tempo de incubação no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

A figura 20 ilustra os resultados da degradabilidade da proteína bruta em função do tempo, onde foi possível verificar que não existe diferença significativa entre as fontes de enxofre ($P > 0,05$).

Os valores obtidos para degradabilidade da proteína 80%, foram superiores aos obtidos por Valinote (2003), que foi de 73%, embora ambos tenham utilizado cana-de-açúcar como volumoso. Talvez este aumento na degradabilidade possa ser atribuído ao enxofre, pois apesar de não ocorrer diferença estatística, a suplementação com enxofre melhorou a degradabilidade. De acordo com Henry e Ammerman (1995), a suplementação com enxofre aumenta a população de microrganismos no rúmen, que proporciona efeito direto na degradabilidade.

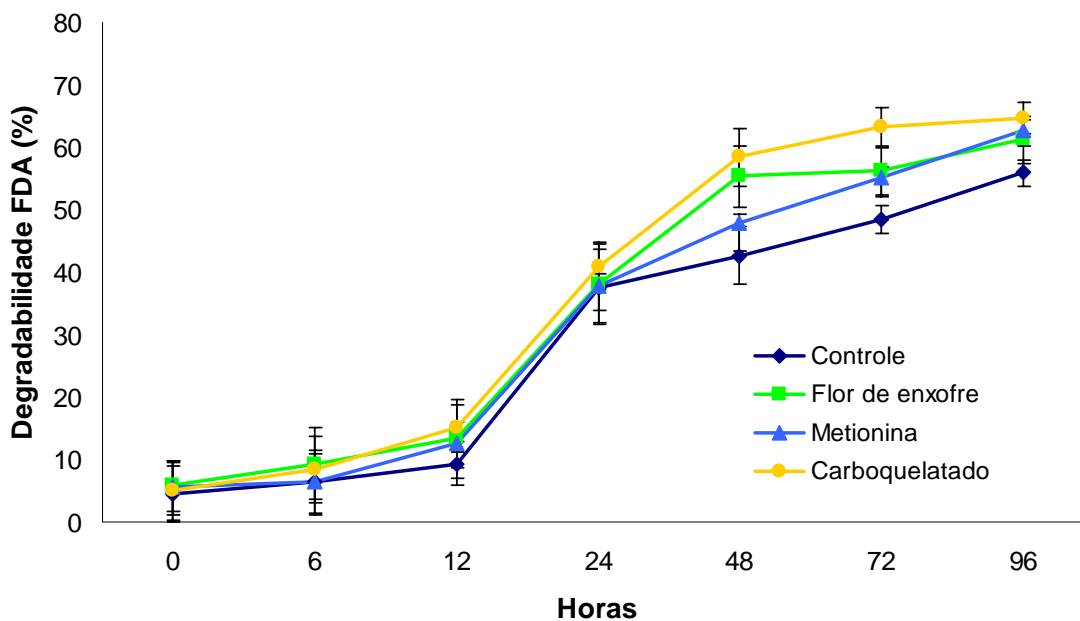


Figura 21. Degradabilidade da fibra em detergente ácido em função do tempo de incubação no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

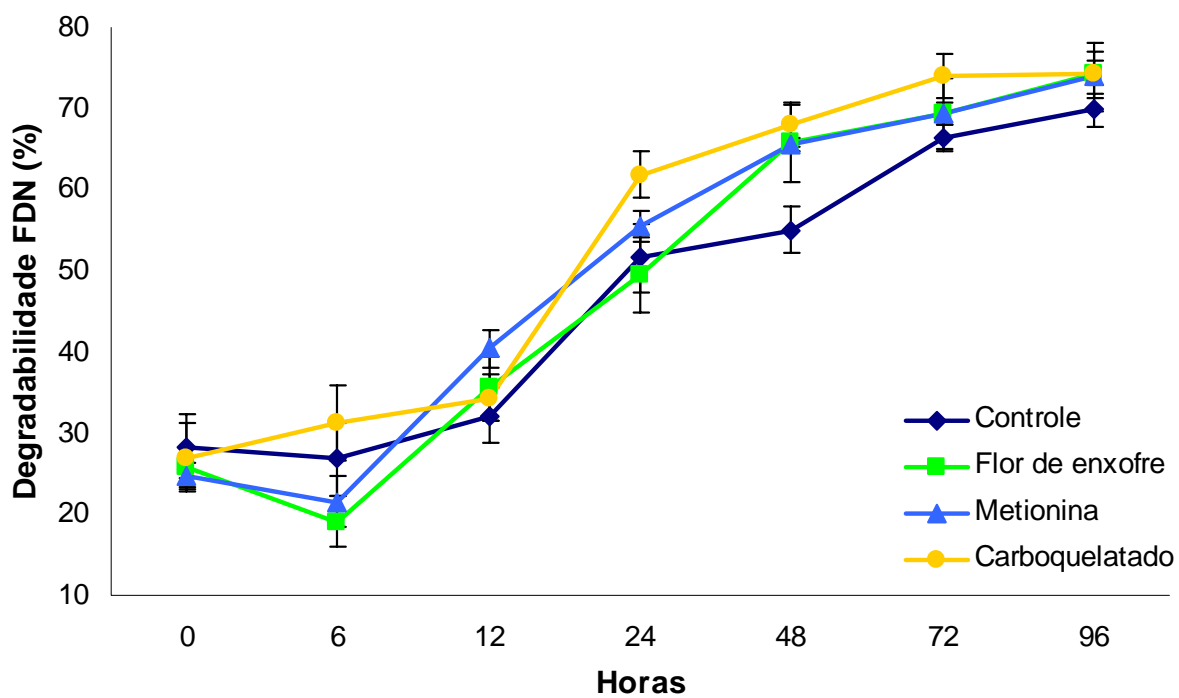


Figura 22. Degradabilidade da fibra em detergente neutro em função do tempo de incubação no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

As figuras 21 e 22 mostram respectivamente a degradabilidade de FDA e FDN. Apesar de não ter encontrado diferenças significativas ($P>0,05$) entre as fontes de enxofre testadas, pode-se verificar que o enxofre orgânico (carboquelatado) apresenta tendência positiva em melhorar a degradabilidade da fibra, quando comparado aos demais tratamentos, enquanto que o controle expressa os piores resultados.

Alguns autores como Guardiola et al. (1983); Patterson e Kung (1988), verificaram que a digestão da celulose aumenta com a suplementação com enxofre, mas não encontraram diferença significativa entre fontes.

Buttrey et al. (1986) verificaram aumento na degradabilidade do FDN e FDA na silagem de milho, quando a cultura era fertilizada com enxofre. Ammerman, Baker e Lewis (1995) observaram que os microrganismos do rúmen necessitam de enxofre, sendo que estes podem utilizar fontes orgânicas ou inorgânicas para síntese de proteína microbiana.

Não há dúvidas de que a ausência ou deficiência de enxofre influencia negativamente no metabolismo ruminal, prejudicando a produtividade animal. Neste trabalho, a fonte orgânica (carboquelatado) apesar de não mostrar resultados significativos ($P>0,05$), para os parâmetros ruminiais avaliados, mostrou tendência numérica em superar os demais tratamentos, proporcionando aos animais enquanto na fase de crescimento, ganho de peso diário superior em 11%, quando comparado a fonte de enxofre inorgânica (flor de enxofre), podendo ser uma alternativa interessante para dietas com maiores proporções de alimentos volumosos, desde que obedecida uma relação positiva entre o custo e o benefício.

4.8 Protozoários Ciliados e pH Ruminal

Foram identificados e contados os protozoários do gênero *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Ostrachodinium* e *Eudiplodinium*, sendo os resultados apresentados na tabela 3 e na figura 23 estão representados os valores de pH no rúmen.

Tabela 3. Quantidade de protozoários ciliados por mL de líquido ruminal, em função da suplementação com diferentes fontes de enxofre para bovinos em regime de confinamento.

Protozoários Ciliados 10 ⁴ / mL				
	Controle	Flor de enxofre	Metionina.	Carboquelatado
<i>Entodinium</i>	18,58 ^a	8,17 ^b	10,86 ^b	27,00 ^c
<i>Diplodinium</i>	2,05 ^a	5,41 ^b	2,19 ^a	4,4 ^b
<i>Epidinium</i>	6,73 ^a	17,68 ^b	3,42 ^c	10,16 ^d
<i>Isotricha</i>	3,59 ^a	4,36 ^a	3,96 ^a	4,00 ^a
<i>Dasytricha</i>	6,00 ^a	0,61 ^b	1,87 ^b	5,37 ^a
<i>Ostrachodinium</i>	0,54 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>Eudiplodinium</i>	0,55 ^a	0,79 ^a	0,78 ^a	0,52 ^a
Total	38,06^a	37,02^a	23,17^b	51,47^c

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05)

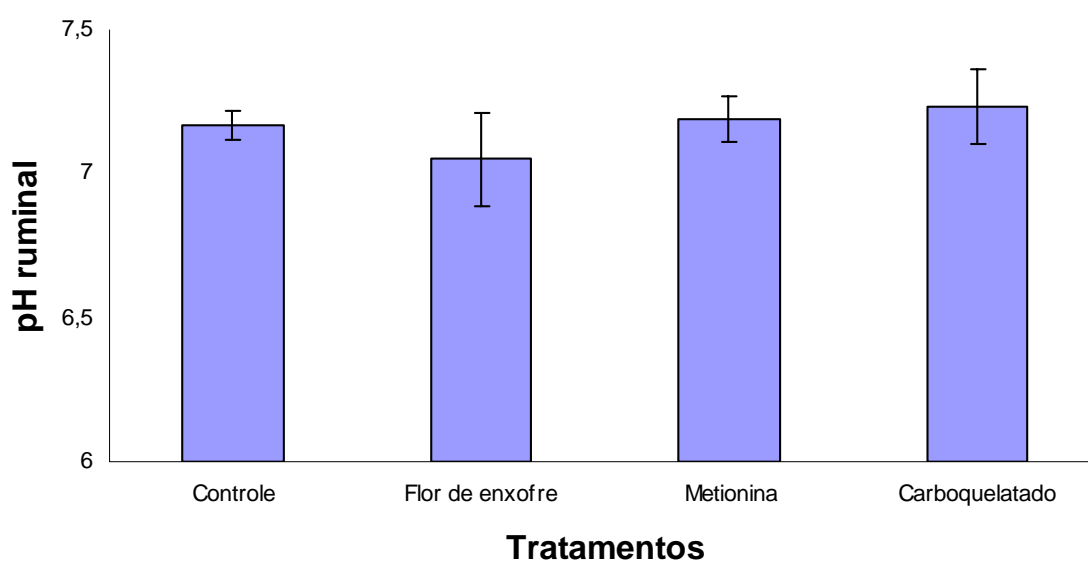


Figura 23. Valor médio de pH no rúmen de bovinos suplementados com diferentes fontes de enxofre.

O carboquelatado proporcionou um aumento significativo ($P < 0,05$) no número de protozoários totais, conforme ilustra a tabela 3, sendo este resultado interessante para justificar a tendência em aumentar a degradabilidade da fibra quando os animais foram suplementados com esta fonte.

Morrisson, Murray e Boniface (1990) verificaram que alterações na fonte de enxofre podem influenciar na população de microrganismos ruminais, alterando os parâmetros bioquímicos de fermentação ruminal, como pH, produção de amônia, produção de ácidos graxos voláteis e reduzindo até mesmo a síntese de proteína microbiana.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as fontes de enxofre ($P > 0,05$) quando levado em consideração o pH ruminal, conforme ilustra a figura 23, no entanto, os valores médios obtidos estão próximos a sete, o que garante um ambiente adequado para ação dos microrganismos ruminais, mantendo a homeostasia. Os valores obtidos próximo a sete são justificáveis devido a proporção de volumoso que estimula uma maior ruminação e, conseqüentemente, salivação, o que confere aumento no pH, como citou Chalupa et al., (1996).

Hu, Yu e Zheng (2006) verificaram que o pH e o substrato possuem efeito sobre a concentração de ácidos graxos voláteis e proliferação de microrganismos no rúmen, sendo os melhores resultados obtidos com valores de pH entre 6,9 e 7,5. Barnes e Keller (2003) também descreveram a importância do substrato volumoso em valores mínimos próximo a 20% para evitar problemas relacionados à acidose metabólica, que além de prejudicar o desempenho dos animais, inviabiliza a produção de ruminantes.

5 CONCLUSÕES

Os animais suplementados com carboquelado obtiveram uma melhor conversão alimentar no primeiro período, mostrando maior eficiência no aproveitamento da dieta da fase inicial.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as fontes para concentração de enxofre no soro sanguíneo, mostrando que todas são capazes de suplementar caso exista déficit deste mineral.

Foi verificado que de fato existe efeito antagônico do enxofre sobre a concentração de cobre no soro, mas não foram identificadas diferenças entre as fontes de enxofre.

As fontes de enxofre utilizando carboquelatado e metionina proporcionaram um menor acúmulo de enxofre no fígado, mas somente a metionina teve efeito significativo sobre a redução na concentração de cobre hepático.

As fontes de enxofre não tiveram efeito sobre o rendimento de carcaça e maciez da carne

O enxofre carboquelatado aumentou significativamente a quantidade total de protozoários ciliados, o que possivelmente justifica esta tendência em maior degradabilidade da matéria seca, da fibra em detergente ácido e da fibra em detergente neutro.

O enxofre carboquelatado mostrou ser uma alternativa interessante para suplementar enxofre em animais no período inicial do confinamento, visto que melhora a conversão alimentar e o desempenho dos animais

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMERMAN, C.B.; HENRY, P.R. **Role of minerals in animal production**: newer developments. Livestock production for the 21 st century: priorities and research needs. University of Saskatchewan, p.251-66, 1994.

AMMERMAN, C.B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, vitamins**. 1.ed. Califórnia: Academic Press, 1995.

ANDERSON, J.O.; WARNICK, R.E.; DALAIC, R.K. Replacing dietary methionine and cystine in sheep diet with sulfate or other sulfur compounds. **N. Z. J. Sci.**, Wellington, v. 54, p. 1122-31,1975.

ANDRIGUETTO, J.M. et al. Os minerais na nutrição In:____.**Nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 1981. cap.6 ,p.173-255: 5^a ed.

AOYAGI, S.; BAKER, H. Copper amino acid complexes are partially protected against inhibitory effects of L-cysteina and L-ascorbate. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 124, p. 388-96, 1994.

AOYAGI, S.; HINEY, K.M.; BAKER, H. Copper bioavailability in pork liver and in various animal by products as determined by chick bioassay. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.73, n. 8, p.799-807, 1995.

ASHEMEAD, H.D. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metals salts. In: ASHEMEAD, H.D.(Ed). **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**. New Jersey: Noyes, 1993. p.47-51.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL (AAFCO). **Official Publication**. Atlanta, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 11. ed. Washington D.C. 1990. 1051p.

BARNES, S.P.; KELLER, J. Cellulosic waste degradation by rumen-enhanced acidogenesis. **W. Sci. Technol.**, v.48, p.155-62, 2003.

BARUSELLI, M.S. Minerais Orgânicos: o que são, como funcionam e vantagens do seu uso em ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA, 2, 2000, Botucatu. **Anais**. Botucatu:, 2000. p.19.

BIRD, P.R.; MOIR, R.J. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. Methionine degradation and utilization in sheep when infused into the rumen or abomasum. **Aust. J. Biol. Sci.**, Champaign, v. 25, n.2, p. 835-842, 1972.

BISHARA, H.N.; BRAY, A.C. Competition between molybdate and sulphate for renal tubular reabsorption in sheep. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**, v.12, p.123, 1978.

BOILA, R.J.; GOLFMAN, L.S. Effects of molybdenum and sulfur on digestion by steers. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.69, n. 4, p.1626-35, 1991.

BOUCHARD, R.; CONRAD, H.R. Sulfur requirement of lactating dairy cows. Fate of sulfur-35 from sodium and calcium sulfate. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 56, p. 1435-44, 1973.

BOUCHARD, R.; CONRAD, H.R. Sulfur metabolism and nutritional changes in lactating cows associated with supplemental sulfate and methionine hydroxy analog. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v.54, p. 587-596, 1974.

BRODERICK, A.G.; CLAYTON, M.K. A statistical evaluation of animal and nutrition factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **J. Dairy. Sci.**, Champaign, v.80, n. 11, p.2964-2971, 1997.

BUCKINGHAN, K. et al. Copper deficiency and elastin metabolism in avian lung. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 166, p. 310 – 19, 1981.

BULL, L.S.; VANDERSALL, J.H. Sulfur source for in vitro cellulose digestion and in vivo ration utilization, nitrogen metabolism, and sulfur balance. **J. Dairy. Sci.**, Champaign, v.56, p.106-12, 1973.

BURK, R.F.; HILL, K.E. Selenoprotein P.A selenium–rich extracellular glycoprotein. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 124, p.1891-97, 1994.

BUTTREY, S.A. et al. Effect of sulfur fertilization on chemical composition, ensiling characteristics and utilization of corn silage by lambs. **J. Anim. Sci.**, Philadelphia, v.63, p.1236-45,1986.

CAMPOS, M.M. et al. Modelling the effect of fatty acids in odour development of cooked meat in vitro : sensory perception. **Meat Sci.**, v. 63, n.3, p. 367-75, 2003.

CHALUPA,W. et al. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long chain fatty acids. **J. Dairy. Sci.**, Champaign, v.69, p.1293-1301, 1986.

CHARMLEY, L.L; IVAM, M. The relative accumulation of copper in the liver and kidneys of sheep fed corn-silage supplemented with copper chloride, copper-acetato or copper-sulfate corn. **Can. J. Anim. Sci.**, Champaign, v.69, p.205-14, 1989.

CLAYPOOL, D.A. et al. Relationship between the level of copper in the blood plasma and liver of cattle. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.41, p. 911-14, 1975.

CROMWELL, G.L.; HAYS, V.W.; TRYJILLOFIGUEROA,V.; KEMP, J.D. Effects of dietary-protein and energy levels for growing-finishing swine on performance, muscle composition and eating quality of pork. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.47, p. 505-13, 1978.

CROMWELL, G.L. et al. Tribasic copper chloride and copper sulfate as copper sources for weaning pigs. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.76, p. 118-23, 1998.

CUMMINS, K.A. et al. Nitrogen degradability and microbial protein synthesis in calves fed diets of varying degradability by the bag technique. **J. Dairy. Sci.**, Champaign, v.66, p.2356-64, 1983.

DEHORITY, B.A. **Classification and morphology of rumen protozoa**. Wooster, Ohio Agricultural Research and Development Center, 1977. 82p.

DICK, A.T.; DEWEY, D.W.; GAWTHORNE, J.M. Thiomolibdates and the copper-molybdenum-sulfur interaction in ruminant nutrition. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v. 85, p. 567-74, 1975.

DOVE, C.R.; EWAN, R.C. Effect of excess dietary copper, iron or zinc on the tocopherol and selenium status of growing pigs. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 68, n. 8, p. 2407-13, 1990.

DRUMM, T.D.; SPAINER, A.M. Changes in the content of lipid autoxidation and sulphur-containing compounds in cooked beef during storage. **J. of Agr. And Food Chem.** v. 39, n.2, p. 336-43, 1991.

DUKES, H. **Fisiologia dos animais domésticos**. eds. SWENSON, M.J.; REECE, W. 11 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 219-246, 1996.

ENGEL, R.W. et al. Effect of copper intake on concentration in body tissue and on growth, reproduction and production in dairy cattle. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.23, p. 1160-64, 1964.

FELÍCIO, P.E. Fatores ante e post mortem que influenciam na qualidade da carne bovina. **In Produção do Novilho de Corte**. A.M. Peixoto, J.C.Moura & V.P. Faria Eds. p. 79-97. FEALQ, Piracicaba, 1997.

GIJS, L. et al. Retention of sulfur flavours by food matrix and determination sensorial data independent of the medium composition. **Food. Chem.**, v.69, n.3, p.319-30, 2000.

GIL, L.A.; SHIRLEY, R.L.; MOORE, J.E. Effect of methionine hydroxi analog on bacterial protein synthesis from urea and glucose, starch or cellulose by rumen microbes, in vitro. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.37, p. 159-66, 1973.

GOONERATNE, S.R.; CHRISTENSEN, D.A. A survey of maternal cooper status and foetal tissue copper concentration in bovine. **Can. J. Anim. Sci.**, Champaign, v.69, p.141-50, 1989.

GRIEVE, D.G.; MERRIL, W.G.; COPPOCK, C.E. Sulfur supplementation of urea containing silages and concentrates. Ration digestibility, nitrogen, and sulfur balances. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 56, p. 224-32,1973.

GUARDIOLA, C.M. et al. The effects of sulphur supplementation on cellulose digestion in vitro and on nutrient digestion, nitrogen metabolism and rumen characteristics of lambs fed on good quality fecue and tropical star grass hays. **Anim. Feed. Sci. Tech.** v. 8, p. 129-136, 1983..

HALPIN, K.M.; BAKER, D.H. Selenium deficiency and transsulfuration in the chick. **J. Nutr.**, Philadelphia, v.114, p.606-12, 1984.

HARMS, R.H.; BURESH, R.E. A comparison of diets with and without supplemented inorganic sulfate and choline for use in comparing relative potencies of various methionine supplements. **Nutr. Rep. Int.**, Los Altos, v. 35, p.909-20, 1987.

HAYES, D.P.; PFEIFFER, D.U.; WILLIMSON, N.B. Effect of intraruminal monensin capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 79, n.5, p. 1000-08, 1996.

HEGARTY, R.S.; NOLAN, J.V.; LENG, R.A. Sulphur availability and microbial fermentation in the fauna free rumen. **Arch. Für Anim. Nutr.**, Berlin, v.41, p. 725-36, 1991.

HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. (1995) Sulfur bioavailability. In: Ammerman, C.B.; Baker, D.H.; Lewis, A.J. **Bioavailability of Nutrients for Animals**. Academic Press, New York, p.349 – 366.

HERRICK, J.B. Mineral in animal health. In: ASHEMEAD, H.D.(Ed). **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**. New Jersey: Noyes, 1993. p. 154-69.

HIDIROGLOU, M. et al. Effects of levels of dietary sulfur on the growth performance and blood mineral profile of sheep fed urea-supplemented corn silage. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, Berne, v. 47, p. 284-91, 1977.

HU, Z.H.; YU, H.Q.; ZHENG, J.C. Application of response surface methodology for optimization of acidogenesis of cattail by rumen cultures. **Biores. Technol.**, v.97, n.16, p.2103-09, 2006.

HUME, I.D.; BIRD, P.R. Synthesis of microbial protein in the rumen, the influence of the level and form of dietary sulphur. **Aust. J. Agr. Res.**, Victoria, v.21, n.2, p. 315-24, 1970.

IVAN, M.M. The effect of faunation of rumen on solubility and liver content of copper in sheep fed low or high copper diets. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 66, p. 1498-1501, 1988.

JOHNSON, W.H., GOODRICH, R.D.; MEISKE, J.C. Metabolism of radioactive sulfur from elemental sulfur, sodium sulfate and methionine by lambs. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 32, p. 778-85, 1971.

KANDYLIS, K. Toxicity of sulphur in ruminants: review. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 67, p. 2179-87, 1984.

KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W. Bioavailability of feed grade copper sources in growing cattle. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 71, n. 1, p.27-35,1993.

KELLOG, D.W.; RAKES, J.M.; GIIEDT, D.W. Effect of zinc methionine supplementation on performance and selected blood parameters of lactating dairy cows. **Nutr. Rep. Int.**, Los Altos, v. 40, p.1049-57, 1989.

KINCAID, R.L.; WHITE, C.L. The effects of ammonium tetrathiomolybdate intake on tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs. **J. Anim. Sci.**, v. 66, p. 3252-58,1988.

LANGLANDS, J.P. et al. Deposition of copper, manganese, selenium and zinc in Merino sheep. **Aust. J. Agric. Res.**, Victoria, v.35, n.5, p.701-7,1984.

LEDOUX, D.R.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Response to high dietary copper and duration of feeding time on tissue copper concentration of sheep. **Nutr. Res.**, Tarrytown, v.16, n.1, p. 69-78,1996.

LEE, R.W. Effect of ZINPRO[®] zinc methionine or CuPLEX[®] copper lysine on Performance and Health of Wheat Pasture Cattle. TB C-9202-B. **Zinpro Corporation**, 1991.

LEE, J. Research about element trace in animals. **Aust. J. Agric. Res.**, Victoria, v.50, p.1341-64,1999.

LESPERANCE, A.P., BOHMAN, V.R., OLDFIELD, J.E. Interaction of molybdenum, sulfate and alfafa in the bovine. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.60, p.791-803,1985.

LILLEY, C.W. et al. Linking copper and bacteria with abomasal ulcers in beef calves. **Vet. Med.**, Lenexa, v.80, p.85-88,1985.

LIMA, F.B.; STAHLY, T.S.; CROMWELL, G.L. Effects of copper, with and without ferrous sulfide, and antibiotics on the performance of pigs. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.52, p.241-47,1981.

LOVETT, T.D. et al. Methionine, choline and sulfate interrelationships in the diet of weanling swine. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.63, p.467-71,1986.

MASON, J. The putative role of thiomolybdates in the pathogenesis of Mo-induced hypocupraemia and molybdenosis: some recent developments. **Irish Vet. J.**, Dublin, v. 36, p. 164-68, 1982.

MATA, G. et al. Production and glutathione responses to rumen-protected methionine in young sheep grazing dry pastures over summer and autumn. **Aust. J. Agr. Res.** v.48, p. 1111-20, 1997.

McDOWELL, L.R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. New York: Academic Press,1992.

McFARLANE, J.D.; JUDSON, G.J.; TURNBULL, R.K. An evaluation of copper containing soluble glass pellets, copper oxide particles and injectable copper as supplements for cattle and sheep. **Aust. J. Exp. Agr.**, Melbourne, v. 31, p. 165-73, 1991.

MILLS, C.F. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 65, p. 1702-11,1987.

MORRIS, R.J. Sulphur in ruminant nutrition fertilization vs supplementation. **Sulphur Agr.**, Washington, v. 8, p.11, 1984.

MORRISON, M.; MURRAY, R.M.; BONIFACE, A.N. Nutrient metabolism and rumen microorganisms in sheep fed a poor quality tropical grass hay supplemented with sulphate. **J. of Agr. Sci.** v. 115, p. 269-75, 1990.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Mineral tolerance of domestic animal**. National Academy Press. Washington, DC,1980.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient requirements of beef cattle**. National Academy Press. Washington, DC,1984.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient requirements of sheep**. National Academy Press, Washington, DC, 1985.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient requirements of beef cattle**. 7. ed. National Academy Press. Washington, DC, 1996.

O'DELL, B.L. et al. The lung of the copper-deficient rat. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 91, p. 413-32, 1978.

O'DELL, B.L. Bioavailability of trace elements. **Nutrition Reviews**, New York, v.42, p. 301-308, 1984.

O'DELL, B.L.; SUNDE, R.A. **Handbook of nutritionally essential mineral elements**. New York: Marcel Dekker, 1997.

OJENIYI, S.O.; KAYODE, G.O. Response of maize to copper and sulphur in tropical regions. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v.120, p. 269-75, 1993.

ONWUKA, C.F.I.; AKINSOYINU, A.O. Effects of elemental sulphur levels on urea-nitrogen utilization by west African dwarf goats and sheep. **Trop. Agric.** v. 66, p. 158-65, 1989.

ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The stimulation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage. **J. of Agr. Sci.** v. 92, n.1, p. 499-503, 1979.

PATTERSON, J.A.; KUNG Jr.L. Metabolism of DL-methionine and methionine analogs by rumen microorganisms. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 71, p. 3292-99, 1988.

PENEDO, J.B. et al. Influence of copper status on the accumulation of toxic and essential metals in cattle. **Environ. Intern.** v. 32, p. 901-906, 2006.

- PIRES, C.C. et al. Exigências nutricionais de bovinos de corte em acabamento I. Composição corporal e exigências de proteína para ganho de peso. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, Visçosa, MG, v.22, n.1, p. 110-120, jan/fev., 1993.
- PHILLIPPO, M.; HUMPHRIES, W.R.; ATKINSOM, T. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrous cycles in cattle. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v.109, n.1, p. 321-30, 1987.
- PILLATI, C.; LOMBARDO DE BARROS, S.C.; GIUDICE, J.C. Intoxicação crônica por cobre em ovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.9, n.5, p.31-34, 1990.
- POPE, A.L. et al. The effect of sulphur on Se⁷⁵ absorption and retention in sheep. **J. Nutr.**, Philadelphia, v.109, p.1448-55, 1979.
- PULS, R. **Mineral Levels in Animal Health.**, 2.ed. Diagnostic data, Sherpa international, Clearbook, p.83-109, 1994.
- RAES, K. et al. Meat quality, fatty acid composition and flavour analysis in Belgian retail beef. **Meat Sci.**, v. 65, n.4, p. 1237-46, 2003.
- RESS, M.C.; MINSON, D.J. Fertilizer sulfur as a factor affecting voluntary intake, digestibility and retention time of pangola grass by sheep. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 39, p. 5-11, 1978.
- RIBEIRO, L.A.O.; NETO, J. A.S.P.; RODRIGUES, N.C., Intoxicação crônica por cobre em ovinos mantidos em pomar de macieiras. **Pesqui. Vet. Bras**, Rio de Janeiro, v.9, p.51-54, 1995.
- RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J.A.; GIESTA, S. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesqui. Vet. Bras**, Rio de Janeiro, v.9, p.51-54, 1989.
- RIET-CORREA, F. et al. Efeito da suplementação com cobre e doenças associadas à carência de cobre em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.13, p. 45-49, 1993.

RUAS, J.R.M.; TORRES, C.A.A.; BORGES, L.E. Efeito da suplementação protéica a pasto sobre eficiência reprodutiva e concentração sanguínea de colesterol, glicose e uréia em vacas Nelore. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, Viçosa, MG, v.29, n.6, p. 2043-50, 2000.

SAS Institute. **SAS user's guide**: statistics 5 ed. Cary, NC, SAS Inst, 1988.

SIMPSON, A.M.; MILLS, C.F.; McDONALD, I. Tissue copper retention or loss in young growing cattle. Proceedings of the Fourth International Symposium on Trace Element Metabolism in Man and Animals. **Aust. Acad. of Sci**, Camberra, p.133-36, 1981.

SOLI, N.E. Chronic copper poisoning in sheep. **Nolway Vet. Med.**, v.32, p.75-89, 1980.

SOLOMON, R. et al. Absorption of macro and micro-elements by sheep from barley and barley plus sulphur dioxide-treated straw rations. **Small Rum. Res.**, v.6, p. 55-62, 1991.

SPEARS, J.W.; BUSH, L.P.; ELY, D.G. Influence of nitrate and molybdenum on sulfur utilization by rumen microorganisms. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.60, p. 1889-96, 1977.

SPEARS, J.W.; BURNS J.C.; HATCH, P.A. Sulfur fertilization of cool season grasses and effect on utilization of minerals, nitrogen, and fiber by steers. **J. Dairy Sci**, v.68, n.2, p.347-355, 1985.

SPEARS, J.W.; KEGLEY, E.B. Effect of zinc and manganese on performance of beef cows and calves . **J. Anim. Sci.**, v. 69, p.59, 1991.

SPEARS, J.W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Anim. Feed and Tech.**, v.58, n.1-2, p.151-63, 1996.

SUTTLE, N.F. Effects of organic and inorganic sulphur on the availability of dietary copper to sheep. **J. Nutr.**, v. 32, p. 559-568, 1974.

SUTTLE, N.F. Effects of age and weaning on the apparent availability of dietary copper to young lamb. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v.84, p. 255-61, 1975.

SUTTLE, N.F. Reducing the potential toxicity of concentrates to sheep by the use of molybdenum and sulphur supplements. **Anim. Feed. Sci. and Tech.** v.2, p. 235-46, 1977.

SUTTLE, N.F. **Mineral supplementation of low quality roughages.**In: **Isotope and related techniques in animal production and health.** Intern. At. En. Agency. p. 101-14, 1991.

THOMPSON, K.G. et al. Osteochondrosis associated with copper deficiency in young farmed red deer and wapiti x red deer hybrids. **New Zeal. Vet. J.**, v. 32, p.137-43, 1994.

UNDERWOOD, E.J. **Trace elements in human and animal nutrition**, 4 ed., New York: Academic Press, 1977

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N. **The mineral nutrition of livestock**, 3 ed., New York: CABI, 1999.

VALINOTE, A.C. Utilização de gordura e monensina sobre fermentação e cinética ruminal e protozoários ciliados de novilhos da raça Nelore. Pirassununga, 2003. 95p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

XIN, Z. et al. Copper status and requirement during the dry period and early lactation in multiparous Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v.76, n.9, p.2711-16, 1993.

WESTON, R.H. et al. Feed intake and digestion response in sheep to the addition of inorganic sulphur to a herbage diet of low sulphur content. **Aust. J. Agr. Res.** v.39, p. 1107-19, 1988.

WHITE, C.L.; KUMAGAI, H.; BERNES, M.J. The sulphur and selenium status of pregnant ewes grazing Mediterranean pastures. **Aust. J. Agr. Res.** v.48, p. 1081-87, 1997.

ZIN, R.A. et al. Influence of dietary sulphur level in growth, performance and digestive function in feedlot cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p.1723 -1728, 1997.