

Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre¹

Ana Paula Marques², Franklin Riet-Correa³, Mauro Pereira Soares², Enrico Lippi Ortolani⁴ e Maurício Javier Giuliodori⁵

ABSTRACT.- Marques A.P., Riet-Correa F., Soares M.P., Ortolani E.L. & Giuliodori M.J. 2003. [Sudden deaths in cattle associated with copper deficiency.] Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 23(1):21-32. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

An outbreak of sudden death was observed in cattle in southern Brazil. No significant gross or microscopic lesions were found in 10 cattle at post-mortem examination. To test if the sudden deaths were caused by a toxic plant, 13 weeds were collected and given to rabbits at a total of 440 to 600 g per kg body weight within 7 days. Results were negative. Mean copper levels of the liver in 10 cattle were very low (3.6 ± 1.6 ppm-dry matter) suggesting Cu deficiency as the cause of the disease. Five samples of pasture collected during the outbreak had normal levels of Cu (8.4 ± 0.8 ppm-d.m.) and S ($0.2\% \pm 0.03$ -d.m.), but high levels of Fe (522 ± 122 ppm-d.m.). One group of 10 heifers was supplemented with Cu subcutaneously. This group and a similar control group were maintained in the same area where the outbreak occurred. Serum levels of Cu, S, Fe, Mo and ceruloplasmin were determined bimonthly in both groups during one year. Mean serum levels of Cu (1.76 ± 1.06 to 10.34 ± 3.1 $\mu\text{mol/l}$ for the control group and 3.86 ± 1.53 to 10.61 ± 1.34 $\mu\text{mol/l}$ for the treated group) and ceruloplasmin (6.59 ± 3.93 to 18.61 ± 4.14 mg/l for the control group and 10.31 ± 5.48 to 32.49 ± 6.05 mg/l for the treated group) were significantly higher in the supplemented group ($P=0.0046$ for Cu and $P=0.0001$ for ceruloplasmin), but they were below normal levels in most samples of both groups. Serum levels of Cu and ceruloplasmin were correlated ($r=0.67$; $P=0.005$). In both groups serum levels of Fe (40.09 ± 5.25 to 78.48 ± 28.23 $\mu\text{mol/l}$) were higher than normal levels. Samples of forage were collected bimonthly for determination of Cu, Mo, S, Fe and protein in 7 points of the paddock where the outbreak occurred. Levels of Cu (1.36 ± 0.56 to 4.76 ± 1.15 ppm-d.m.) were below the normal ranges. The concentration of Mo (0.17 ± 0.06 to 0.96 ± 0.47 ppm-d.m.) was within normal ranges. Levels of S ($0.21 \pm 0.04\%$ to $0.5 \pm 0.17\%$) and Fe (172.92 ± 62.64 to 437.24 ± 205.44 ppm-d.m.) were occasionally within toxic level. Levels of protein varied from $7.77 \pm 2.6\%$ to $13.16 \pm 3.02\%$. Six samples of water and six of submersed pastures were collected at the end of the experiment when the paddock was flooded. High levels of iron (169.23 ± 83.49 ppm-d.m.) and S ($0.06 \pm 0.03\%$) were found in the water. Levels of Fe and S in the submerse pasture were of 469.3 ± 218.28 ppm and $0.19 \pm 0.05\%$, respectively. The results obtained suggest that the sudden deaths are due to Cu deficiency. Three factors seem to be responsible for the Cu deficiency: 1) high levels of iron in pastures and water; 2) occasionally low levels of copper in the pastures; and 3) the ingestion of S above the requirements due to the levels occasionally high in pastures and high in water.

¹Aceito para publicação em 30 de dezembro de 2002.

Parte da dissertação de mestrado da primeira autora defendida no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

²Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, UFPel, 96010-900 Pelotas, RS.

³Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, PB 58700-000 Email riet@cstr.ufpb.br

⁴Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP 05340-000.

⁵Laboratorio de Nutrición Mineral, Cátedra de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

The outbreak reported is similar to other outbreaks of sudden deaths associated with low liver copper previously reported during winter in the same region of southern Brazil. This area is characterized by acid sandy soils with frequent flooding during this season. In periodically flooded acid soils iron is solubilized and absorbed by the plants, decreasing the Cu content and increasing the Fe content of forage. This seems to be the main reason for Cu deficiency in the region.

INDEX TERMS: Cattle, copper deficiency, sudden death, iron, molibdenum, sulfur.

RESUMO. Foi estudado um surto de morte súbita em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. Nos animais necropsiados não foram observadas lesões macroscópicas ou microscópicas significativas. Para testar se as mortes súbitas teriam sido causadas por plantas tóxicas, 13 espécies de plantas foram coletadas e administradas a coelhos num total de 440 a 600 g/ kg de peso vivo num período de 7 dias. Os resultados foram negativos. Os teores de cobre no fígado dos bovinos foram muito baixos ($3,6 \pm 1,6$ ppm-base seca) sugerindo que as mortes foram causadas por deficiência de cobre. Cinco amostras de pasto, coletadas no local do surto, apresentaram teores normais de Cu ($8,4 \pm 0,8$ ppm-bs) e S ($0,2\% \pm 0,03\%$ -bs), mas altos teores de Fe (522 ± 122 ppm-bs). Um grupo de 10 novilhas foi suplementado com Cu subcutâneo. Este grupo e um grupo controle foram mantidos em área similar à da ocorrência do surto. Teores séricos de Cu, S, Fe, Mo e ceruloplasmina foram determinados bimensalmente durante um ano de experimento. Os teores médios de Cu ($1,76 \pm 1,06$ a $10,34 \pm 3,1$ $\mu\text{mol/l}$ no grupo controle e $3,86 \pm 1,53$ a $10,61 \pm 1,34$ $\mu\text{mol/l}$ para o grupo suplementado) e ceruloplasmina ($6,59 \pm 3,93$ a $18,61 \pm 4,14$ mg/l para o grupo controle e $10,35 \pm 5,48$ a $32,49 \pm 6,05$ mg/l para o grupo suplementado) foram significativamente maiores no grupo suplementado ($P=0,0046$ para o Cu e $P=0,0001$ para a ceruloplasmina), mas a maioria das amostras tiveram teores abaixo do normal em ambos os grupos. Houve uma correlação entre os teores de Cu e os de ceruloplasmina ($r=0,67$, $P=0,05$). Em ambos os grupos os teores séricos de Fe ($40,09 \pm 5,22$ a $78,48 \pm 28,23$ $\mu\text{mol/l}$) estiveram acima dos teores normais. Amostras de forragens foram coletadas bimensalmente em sete pontos do campo onde ocorreu o surto para determinação de Cu, Mo, S, Fe e proteína. Os teores de Cu ($1,36 \pm 0,56$ a $4,76 \pm 1,15$ ppm-bs) estiveram abaixo dos requerimentos. Os teores de Mo ($0,17 \pm 0,06$ a $0,96 \pm 0,47$ ppm-bs) estiveram dentro da normalidade. Valores de S ($0,21 \pm 0,04\%$ a $0,5 \pm 0,17\%$) e Fe ($172,92 \pm 62,64$ a $437,24 \pm 205,44$ ppm-bs) alcançaram, ocasionalmente, níveis tóxicos. Teores de proteína variaram de $7,77 \pm 2,6\%$ a $13,16 \pm 3,02\%$. Seis amostras de água e 6 amostras de pasto submerso foram coletadas no fim do experimento quando o campo estava inundado. Altos teores de Fe ($169, 23 \pm 83,49$ ppm) e S ($0,06 \pm 0,03\%$) foram encontrados na água. Os teores de Fe e S no pasto submerso foram de $469,5 \pm 218,28$ ppm e $0,19 \pm 0,05\%$, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que as mortes súbitas foram causadas por deficiência de Cu. Três fatores parecem ser responsáveis pela deficiência de Cu: 1) altos teores de Fe na pastagem e na água; 2) ocasionalmente baixos teores de Cu na pastagem; e 3) ingestão de S

acima dos requerimentos, devido aos teores ocasionalmente altos na pastagem e na água. O surto descrito é similar a outros surtos de morte súbita em bovinos descritos no sul do Rio Grande do Sul durante o inverno, que foram, também, associados a baixos teores de cobre no fígado. As regiões onde ocorre a enfermidade são caracterizadas por solos arenosos e ácidos com inundações frequentes durante o inverno. Em solos ácidos periodicamente inundáveis o ferro é solubilizado e absorvido pelas plantas, diminuindo o conteúdo de Cu na forragem e aumentando os teores de Fe. Esta parece ser a maior razão para a deficiência de cobre na região.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovinos, deficiência de cobre, morte súbita, ferro, molibdênio, enxofre.

INTRODUÇÃO

O cobre é um dos microelementos essenciais para os animais e plantas. Nos animais ele participa da hematopoiese, metabolismo dos tecidos conectivos, formação da mielina e dos ossos e pigmentação e formação de lã e pêlos. (Cavalheiro & Trindade 1992, NRC 1996, Radostits et al. 1999). Para bovinos, as necessidades de cobre na dieta variam de 4 a 10 ppm e para ovinos são de 5 ppm (NRC 1996).

Em muitos casos a deficiência de Cu pode ser primária, quando a ingestão dietética do elemento for insuficiente diante dos níveis requeridos pelo animal para os processos metabólicos dependentes do cobre. Pode, também, ser secundária quando, apesar da ingestão adequada, sua absorção e utilização pelos tecidos estiver prejudicada pela presença de antagonistas na dieta. Mo, S e Fe são os principais minerais que interferem na absorção do Cu (Homse 1981, Suttle 1986a,b, 1991, Niederman et al. 1994, Gengelbach et al. 1994, Radostits et al. 1999).

A hipocuprose é uma das deficiências de maior interesse em ruminantes, apresentando uma ampla variedade de sintomas e extensa distribuição geográfica, tanto em nosso país quanto em outras partes do mundo (Homse 1981, Moraes et al. 1999, Radostits et al. 1999).

A hipocuprose em ovinos pode causar fragilidade e perda da ondulação da lã ou despigmentação da lã preta, alterações congênitas ou adquiridas da mielina (ataxia enzoótica), osteoporose, anemia e redução do crescimento (Valli 1985, Underwood & Suttle 1999). No Brasil, a ataxia enzoótica foi descrita pela primeira vez em ovinos no Estado do Piauí. Os animais apresentavam desequilíbrio do trem posterior e em casos graves paraplegia. Exames histológicos revelaram degeneração simétrica na mielina da medula espinhal. Teores

muito baixos de Cu (7-23 ppm) foram encontrados no fígado (Tokarnia et al. 1966).

Em bovinos, diversos quadros clínicos são observados na hipocuprose, podendo ocorrer menor desenvolvimento corporal e baixo desempenho reprodutivo (Phillippo et al. 1987a,b), anemia, osteoporose, alterações da pigmentação dos pêlos e diarreia (Valli 1985, Underwood & Suttle 1999). Ocorrem, também, ataxia neonatal (Sanders 1980) e morte súbita (Bennets et al. 1948).

No Brasil, tem sido evidenciada no Piauí, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul uma doença conhecida como "ronca". Sua principal característica é a respiração ruidosa, intensificada com a movimentação dos animais. Está associada a valores muito baixos de cobre e extremamente altos de ferro no fígado (Tokarnia et al. 1971, Tokarnia & Döbereiner 1998, Moraes et al. 1999).

No Rio Grande do Sul, duas doenças têm sido associadas à carência de cobre em bovinos. A primeira delas caracteriza-se por hipomielinogênese congênita e apresenta um quadro clínico caracterizado pelo nascimento de bezerros com opistótono e incapacidade para se manterem em pé. As alterações histológicas caracterizam-se por uma marcada deficiência de mielina. Baixos teores de cobre são encontrados no fígado (7,64 ppm) e sistema nervoso central (< 9 ppm) (Riet-Correa et al. 1993). O quadro clínico e patológico assemelha-se à ataxia neonatal dos bezerros descrita por Sanders (1980) e à ataxia enzoótica de ovinos (Tokarnia et al. 1966, Valli 1985). O outro quadro clínico são mortes súbitas, que ocorrem desde 1986 no sul do Rio Grande do Sul, em estabelecimentos localizados às margens da Lagoa Mirim e Lagoa dos Patos. Animais aparentemente normais, quando movimentados, caem e morrem subitamente, apresentando apenas tremores musculares. Os teores de cobre no fígado variam de 1,3 a 8,4 ppm-base seca (b.s.) (Bondan et al. 1991, Riet-Correa et al. 1993). A doença é semelhante à "falling disease" descrita por Bennets et al. (1948) na Austrália.

Baixos teores de Cu em pastagens e depleção do mineral no fígado e/ou soro de ruminantes foram encontrados no Piauí (Tokarnia et al. 1960, 1966, 1968, 1971), Ceará (Tokarnia et al. 1968), Ilha de Marajó (Tokarnia et al. 1968, 1971), Maranhão (Tokarnia et al. 1960, 1968, Moraes et al. 1999), Amapá (Tokarnia et al. 1971), Roraima (Tokarnia et al. 1968, Sousa et al. 1989), Amazônia (Barros et al. 1981, Moraes et al. 1999), Goiás (Lopes et al. 1980), Rio de Janeiro (Tokarnia et al. 1971, Moraes et al. 1999), Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Tokarnia et al. 1971, Fernandes & Santiago 1972, Sousa et al. 1980, Brum et al. 1987, Pott et al. 1989 a,b,c, Moraes et al. 1994, 1999) Minas Gerais (Guimarães et al. 1992, Moraes et al. 1999), São Paulo (Lisbôa et al. 1996), Santa Catarina (Tokarnia et al. 1971) e Rio Grande do Sul (Bauer et al. 1964, Gavillon & Quadros 1976, Trindade et al. 1990, Bondan et al. 1991, Riet-Correa et al. 1993, Moraes et al. 1999).

O objetivo desse trabalho foi comprovar que mortes súbitas que ocorrem em bovinos na região sul do Rio Grande do Sul são devidas à carência de cobre. Além disso, objetivou determinar se a carência de Cu é causada pelos baixos níveis

do mineral nas pastagens, ou se é uma carência secundária em consequência de altos níveis de outros minerais (Mo, Fe e S).

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo de um surto de morte súbita

Um surto de morte súbita ocorreu, em junho de 1998 em um estabelecimento localizado no Sul do Rio Grande do Sul, no município de Arroio Grande, às margens da Lagoa Mirim.

De um total de 224 bovinos no pasto, morreram 19. Dez bovinos foram necropsiados. Amostras de fígado, rim, coração, pulmão, sistema nervoso central, rúmen e intestino foram coletadas e fixadas com formol a 10%. Após a fixação, os materiais foram incluídos em parafina, cortados a 5 mm e corados por hematoxilina-eosina para estudo histológico.

Amostras de fígado dos animais mortos foram cortadas com faca de aço inoxidável, armazenadas em sacos plásticos limpos, congeladas e posteriormente enviadas para a Universidade Nacional de La Plata, Argentina, para determinação dos teores de cobre e molibdênio por espectrofotometria de absorção atômica.

No mesmo dia da ocorrência do surto, foi percorrido o pasto problema a fim de constatar a presença de plantas suspeitas de causarem morte súbita. As plantas invasoras mais frequentes e com evidências de terem sido consumidas pelos animais foram coletadas para determinação botânica e administração experimental a coelhos. As espécies coletadas foram herbarizadas no herbário (PEL) do Instituto de Botânica da Universidade Federal de Pelotas. O material testemunha encontra-se no mencionado herbário com os números apresentados no Quadro 1.

As 13 espécies de plantas suspeitas de serem tóxicas foram administradas frescas à 13 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), de aproximadamente 60 dias de idade, pesando entre 1,260 kg e 1,420 kg. Esses animais foram colocados em gaiolas separadas e cada gaiola foi numerada de 1 a 13 conforme a identificação das plantas. (Quadro 1)

O experimento com coelhos teve duração de 7 dias e as plantas foram colocadas à disposição dos animais para consumo voluntário. No primeiro dia foram administrados 60 g. Do 2º ao 5º dia foram administradas 120 g por dia, e nos 6º e 7º dia 80 g por dia. As doses totais ingeridas durante os 7 dias por cada coelho apresentam-se no Quadro 1. Os animais eram exercitados diariamente durante 5 minutos para que algum sinal clínico ou mesmo casos de mortes súbitas causadas pelas plantas pudessem ser observados.

No campo, procedeu-se, também, à coleta de forragens para a determinação de Cu, Fe, Mn e S. As amostras de forragem foram coletadas em 5 locais diferentes representativos da flora do pasto e do consumo dos animais. As amostras foram coletadas com faca de aço inoxidável e luvas de borracha e armazenadas em sacos plásticos. Posteriormente foram embaladas em sacos de papel, para serem secas em estufa a temperatura de 100°C por 24 horas e enviadas para a Universidade Nacional de La Plata, Argentina, para análise dos minerais supracitados por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as amostras foram identificados de 1 a 5, conforme o ponto de coleta, e sempre manuseadas com luvas de borracha para evitar contaminação.

Variações nos níveis de minerais em animais, pastagens e água no local onde ocorreu o surto

Este experimento foi realizado em bovinos no estabelecimento onde ocorreram as mortes súbitas associadas à carência de cobre, anteriormente descritas.

Quadro 1. Identificação das plantas coletadas e doses totais ingeridas pelos coelhos

Coelho nº	Planta administrada				
	Família	Espécie	Nome popular nº	Tomo (7 dias)	Dose ingerida
1	Alismataceae	<i>Echinodorus longiscapus</i> Arech.	Chapéu-de-couro/ Erva do brejo	21000 PEL	550g/kg
2	Amaranthaceae	<i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.) Grisebach	Periquito-saracura/ Carrapicho do brejo	21011 PEL	440g/kg
3	Campanulaceae	<i>Pratia hederacea</i> (Cham.) G. Don	SNC*	21001 PEL	470g/kg
4	Compositae	<i>Eclipta bellidioides</i> (Spreng.) Sch. Bip. ex Blake	SNC	21002 PEL	460g/kg
5	Compositae	<i>Gamochaeta americana</i> (Mill.) Weddell	SNC	21004 PEL	600 g/kg
6	Compositae	<i>Gamochaeta</i> sp. SNC	21003 PEL	520g/kg	
7	Compositae	<i>Enhydra anagallis</i> Gardner	SNC	21012 PEL	440g/kg
8	Cruciferae	<i>Lepidium aletes</i> Macbride	SNC*	21005 PEL	520g/Kg
9	Lythraceae	<i>Cuphea carthagenensis</i> (Jacq.) Macbrige	Sete-sangrias	21006 PEL	440g/kg
10	Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i> L.SNC	21007 PEL	600g/kg	
11	Menyanthaceae	<i>Nymphoides indica</i> (L.) O. Kze	Estrela-branca/ Soldanela-d'água	21008 PEL	510g/kg
12	Polygonaceae	<i>Polygonum punctatum</i> Elliot	Erva de bicho	21009 PEL	490g/kg
13	Pontederiaceae	<i>Pontederia lanceolata</i> Nutt.	Rainha dos lagos/ aguapé	21010 PEL	530g/kg

*SNC = sem nome comum.

De um total de 230 animais, que estavam em um pasto de 200 hectares, vizinho e similar ao pasto problema descrito no surto de mortes súbitas, foram utilizadas 20 fêmeas, todas da raça Hereford de 1 ano e meio a 2 anos de idade, com pesos que variaram de 185 a 370 kg. Estes animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Um grupo de 10 fêmeas foi suplementado com cobre mediante a aplicação, via subcutânea, de 4 ml de uma emulsão, de liberação prolongada, que continha 100 mg de Cu por ml (Glypodin Ô, produzida pelo Laboratório Köning S. A., Indústria Argentina). O outro grupo de 10 fêmeas permaneceu como controle. Os animais foram numerados de 1 a 20 e a identificação era feita mediante o número do brinco de cada animal. De 1 a 10 os animais controles e de 11 a 20 os animais suplementados com cobre.

Durante os 12 meses do experimento realizaram-se visitas ao estabelecimento em intervalos bimestrais nas seguintes datas: 16.6.1999, 3.8.1999, 13.10.1999, 21.12.1999, 13.3.2000, 22.5.2000, 18.7.2000. Nessas visitas foram coletadas amostras de soro dos 20 animais e amostras de forrageiras para determinação dos minerais. Em 18.7.2000, data na qual o pasto encontrava-se alagado, foram coletadas também amostras de água e forrageiras submersas em 6 pontos aleatórios.

Coleta de sangue e dosagem bioquímica de minerais e ceruloplasmina no soro. Para obtenção do soro, as amostras de sangue total foram coletadas em tubos de ensaio de fundo redondo de 20 ml de capacidade. As amostras de sangue permaneceram em repouso por uma hora e após foram deixadas em geladeira por 12 horas, à temperatura de aproximadamente 6°C. Em seguida foram colocadas em estufa a temperatura de 25° a 30°C, durante uma hora, para que ocorresse melhor separação do soro. As amostras contendo em média 8 ml de soro, foram centrifugadas a 3000 rpm durante 4 a 5 minutos, em tubos de fundo redondo com capacidade de 15 ml. Os tubos foram identificados de 1 a 20 conforme o respectivo número de identificação do brinco do animal.

As amostras foram posteriormente colocadas em congelador a temperatura de -2°C, permanecendo congeladas para posterior determinação dos teores de Cu, Mo, S, Fe e ceruloplasmina. Os níveis de ceruloplasmina foram determinados por espectrofotometria, utilizando-se espectrofotômetro da marca MicronalÔ, com posterior

leitura em absorvância de 540 nm, seguindo o método de Schosinsky et al. (1974). O sulfato foi determinado por espectrofotometria seguindo o método de Krijgheld et al. (1979) e sua leitura realizada em absorvância de 360 nm. Para a determinação do molibdênio utilizou-se o método de Quin & Woods (1979). O ferro e o cobre foram determinados segundo o método de Miles et al. (2001) em espectrofotometria de absorção atômica.

Coleta de plantas e dosagem química dos minerais e proteína bruta. No pasto, de aproximadamente 200 hectares, escolheram-se 7 locais representativos, levando-se em conta as variações topográficas do terreno e o pastejo dos animais. Esses locais de 2x2 metros foram demarcados com estacas e identificados com os números de 1 a 7. De cada um desses locais coletava-se uma amostra de forragem de aproximadamente 400 g. Todas as amostras eram cortadas manualmente em altura semelhante ao do corte realizado pelos animais, utilizando-se faca ou tesoura inoxidável e luvas de borracha para evitar contaminações com minerais. Em seguida, eram colocadas em sacos plásticos até a pesagem e posteriormente colocadas em sacos de papel para secagem em estufa à temperatura de 100°C por 24 horas. Quando secas, eram embaladas e enviadas para o Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas, Departamento de Clínica Médica do Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), para determinação dos teores de Cu, Mo, Fe e S e proteína bruta.

Nas plantas, a determinação dos teores de ferro e cobre foram realizadas segundo o método de Miles et al. (2001). Para isso, amostras de capim foram secas e submetidas à digestão ácida com solução de ácido nítrico e ácido perclórico (4:1) a 200°C. A leitura desses microelementos foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica com comprimento de onda apropriado. Para a determinação dos teores de enxofre utilizou-se o método de Quin & Woods (1976) e a leitura foi realizada por espectrofotometria com absorvância de 420 nm. Para os teores do molibdênio seguiu-se o método de Quin & Woods (1979) e a leitura foi realizada por espectrofotometria com absorvância de 360 nm. Para a determinação dos níveis de proteína bruta foi utilizado o método de Micro-Kjeldahl.

Coleta de amostras de água e pastos submersos e determinação dos minerais e proteína bruta. Em 18.7.2000, quando o campo se encontrava-se alagado após enchente, amostras de água foram coletadas em pontos utilizados para a amostragem das forrageiras. As amostras de água foram colocadas em tubos de ensaio esterilizados e posteriormente enviadas ao Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas no Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, para análises de Fe e S segundo os métodos descritos anteriormente. Nessa data realizou-se, também, a coleta de 6 amostras de pastos submersos, procedendo-se de forma semelhante às coletas das amostras de forragem efetuadas durante o período do experimento, sempre cuidando para não contaminar as amostras. Os métodos utilizado para as análises de Cu, Fe, Mo, S e proteína bruta foram os mesmos aos utilizados para as demais amostras de forrageiras.

Análise estatística. Os níveis sanguíneos de Cu, ceruloplasmina, Mo, Fe e S dos animais suplementados e não suplementados foram comparados por análise de variância com medidas repetidas. Foi utilizado o programa SAS e as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (LSD). Para comparar os níveis de Cu e ceruloplasmina dos dois grupos experimentais foi realizada análise de regressão linear utilizando também o programa SAS. Efetuou-se o teste de t para comparar as médias das forrageiras coletadas em 18.7.2000 com a média dos pastos submersos coletados na mesma data.

RESULTADOS

Descrição do surto

O surto ocorreu no dia 2 e 3 de junho de 1998 em um rebanho de 95 novilhas, de 1 ano e meio a 2 anos de idade, um novilho de 2 anos e meio e 64 vacas com 64 bezerras de 6 a 8 meses. Deste total morreram, no primeiro dia, 10 animais (9 novilhas e o novilho), após terem sido movimentados. O campo onde estavam os animais tinha pouca disponibilidade de forragem e o solo estava encharcado em consequência das enchentes. Durante a movimentação os animais apresentaram tremores musculares, seguidos de queda e decúbito lateral com movimentos de pedagem. O curso clínico desde o início dos sinais até a morte variou de alguns minutos a meia hora. No dia seguinte os animais foram novamente movimentados e morreram mais 6 vacas e 3 bezerras, da mesma forma que os anteriores. Na fazenda não era utilizada suplementação mineral e nos bovinos não foram observados sinais de acromotriquia ou outros sinais clínicos sugestivos de carência de cobre.

Nos animais necropsiados não foram observadas lesões significativas, tanto macroscópicas quanto histológicas. O exame histológico ficou parcialmente prejudicado pelo fato de os animais apresentarem diferentes graus de autólise.

O pasto onde os bovinos estavam possuía aproximadamente 200 hectares, tinha sido utilizado para a plantação de arroz havia 2 anos e a cobertura vegetal era basicamente composta por *Cynodon dactylon* e diversas gramíneas nativas. Nela havia plantas invasoras de pequeno porte, algumas das quais foram coletadas para testes toxicológicos (Quadro 1), e um bosque de eucalipto, de aproximadamente um hectare, onde não se encontrava praticamente nenhuma outra planta.

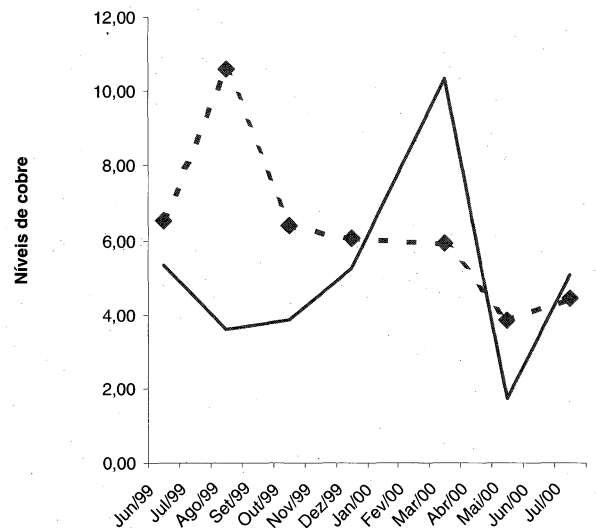
Os níveis de Cu e Mo das 10 amostras de fígado dos animais necropsiados durante o surto apresentam-se no Quadro 2. Os níveis de Cu, Fe, Mn e S das pastagens apresentam-

Quadro 2. Níveis de Cu e Mo de 10 amostras de fígado de bovinos necropsiados durante o surto de morte súbita

Amostras	Cu (ppm)	Mo (ppm)
1	5,0	7,2
2	4,6	6,7
3	5,9	9,9
4	2,4	6,1
5	4,8	5,8
6	2,5	7,3
7	0,8	5,3
8	4,0	5,3
9	4,4	6,1
10	4,7	5,9
X ± s	3,6 ± 1,6	6,5 ± 1,3

Quadro 3. Níveis de Cu, Fe, Mn e S em amostras de forragem coletadas no local do surto de morte súbita

Amostras	Cu (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	S (%)
1	9,2	355,7	348,6	0,19
2	8,9	455,7	541,2	0,20
3	7,1	661,2	559,7	0,17
4	8,3	613,6	535,1	0,26
5	8,8	524,0	479,4	0,25
X ± s	8,4 ± 0,8	522,0 ± 122,2	492,8 ± 85,9	0,2 ± 0,03



	16/06/1999	03/08/1999	13/10/1999	21/12/1999	13/03/2000	22/05/2000	18/07/2000
— COBRE (µmol/L) controles	5,35	3,59	3,88	5,25	10,34	1,76	5,07
- ♦ - COBRE (µmol/L) tratados	6,54	10,61	6,39	6,07	5,96	3,86	4,45

Fig. 1. Comparação das médias dos níveis séricos de cobre (µmol/l) nos bovinos controles e bovinos suplementados com cobre no período de 16.6.99 a 18.7.00. As concentrações de Cu diferem significativamente (P=0,0046) entre os animais suplementados e não suplementados.

Quadro 4. Concentrações de Cu, Mo, Fe, S e proteína bruta das amostras de forragens coletadas, no período de 16.06.99 a 18.07.00 nos sete pontos do campo onde ocorreu o surto

Coletas	Cu (ppm) X±s	Mo (ppm) X±s	Cu:Mo (ppm) X	Fe (ppm) X±s	S (%) X±s	Proteína Bruta (%) X±s
16.06.99	3,90 ± 0,20 ^{ab}	0,96 ± 0,47 ^c	4,33	399,45 ± 24,75 ^{ab}	0,22 ± 0,04 ^c	7,77 ± 2,60 ^c
3.08.99	4,30 ± 0,74 ^{ab}	0,18 ± 0,11 ^{bc}	23,89	437,24 ± 205,44 ^a	0,21 ± 0,04 ^c	11,10 ± 3,48 ^{ab}
13.10.99	3,36 ± 0,52 ^b	0,21 ± 0,17 ^{bc}	16,00	358,75 ± 205,69 ^{ab}	0,21 ± 0,04 ^c	12,01 ± 1,79 ^a
21.12.99	4,76 ± 1,15 ^{a*}	0,17 ± 0,06 ^{bc}	28,00	172,96 ± 62,64 ^c	0,50 ± 0,17 ^a	10,26 ± 2,20 ^{ab}
13.03.00	3,89 ± 0,55 ^{ab}	0,22 ± 0,08 ^b	17,7	180,48 ± 92,88 ^c	0,38 ± 0,09 ^b	11,15 ± 3,22 ^{ab}
22.05.00	4,69 ± 1,68 ^a	0,33 ± 0,09 ^a	14,2	249,23 ± 114,74 ^b	0,33 ± 0,07 ^b	13,16 ± 3,02 ^a
18.07.00	1,36 ± 0,56 ^c	0,24 ± 0,11 ^b	5,7	363,79 ± 221,74 ^{ab}	0,21 ± 0,06 ^c	12,53 ± 1,80 ^a

* Letras minúsculas diferentes sobrescritas nas colunas indicam diferença estatística significativa (P < 0,05).

Quadro 5. Concentrações de Cu, Mo, Fe, S e proteína bruta das amostras de pasto submerso, coletadas em seis pontos do campo onde ocorreu o surto, em 18.07.00 durante o período de enchente

Amostra	Cu (ppm)	Mo (ppm)	Fe (ppm)	S (%)	Proteína bruta (%)
1	2,11	1,15	553,6	0,14	7,51
2	1,44	0,76	737,2	0,15	10,78
3	1,58	0,37	185,7	0,23	12,64
4	1,53	0,57	235,2	0,24	8,99
5	2,86	0,18	479,8	0,20	9,09
6	1,73	0,74	624,3	0,18	8,25
X±s	1,87±0,54	0,63±0,34	469,3±218,3	0,19±0,05	9,54±1,87

se no Quadro 3.

Variações nos níveis de minerais em animais, pastagens e água no local onde ocorreu o surto

As concentrações de Cu, Mo, Fe, S e proteína bruta das

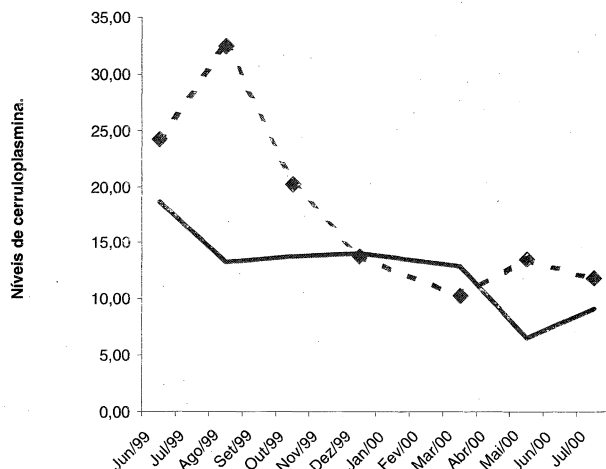


Fig. 2. Comparação das médias dos níveis séricos de ceruloplasmina (mg/l) nos bovinos suplementados com cobre e nos bovinos controles no período de 16.6.99 a 18.7.00. Os teores de ceruloplasmina diferem significativamente (P=0,0001) entre os animais suplementados e não suplementados.

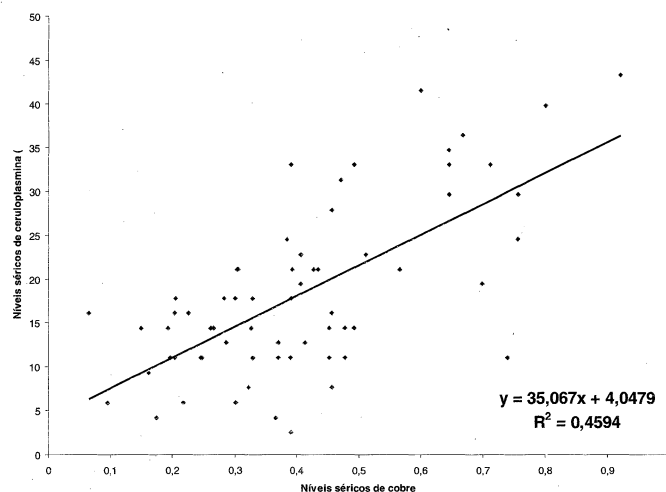


Fig. 3. Retas de regressão linear entre a ceruloplasmina (mg/l) e o Cu (ppm) no soro dos bovinos tratados, considerando o cobre como variável independente e a ceruloplasmina como variável dependente [y = 35,067x + 4,079; (P = 0,05); R² = 0,4594].

amostras de forragens coletadas nos sete pontos do campo no período de 16.6.1999 a 18.7.2000 encontram-se no Quadro 4.

O Quadro 5 demonstra as médias e desvios padrão das amostras de forragem submersa submersa, coletadas em 18/7/2000 em seis pontos do campo, durante o período de enchente. Não houve diferenças significativas (P>0,05) nos valores das amostras de pasto submerso e nas coletas dos pastos nos pontos previamente estabelecidos. Deve se observar, no entanto, que algumas das amostras coletadas nos pontos previamente estabelecidos estavam também submersas.

Nas Fig. 1 a 6 apresentam-se os níveis sanguíneos de Cu, ceruloplasmina, Mo, S e Fe, comparando o grupo suplementado com o não suplementado. Houve diferenças significativas nos teores de Cu (P=0,0046), ceruloplasmina (P=0,0001) e Mo (P=0,015) entre o grupo suplementado e o não suplementado. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos nos níveis sanguíneos de Fe (P=0,1829) e S (P=0,8770).

A Fig. 3 demonstra a retas de regressão linear considerando o cobre como variável independente e a ceruloplasmina como variável dependente [y = 35,067x + 4,079 (P = 0,05108) R² = 0,4594].

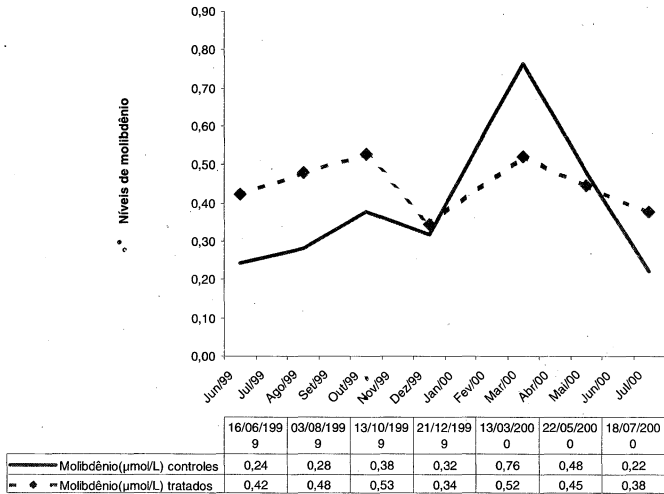


Fig. 4. Comparação das médias dos níveis séricos de molibdênio (µmol/l) nos bovinos suplementados com cobre e nos bovinos controles no período de 16.6.99 a 18.7.00. Concentrações de Mo diferem significativamente (P=0,015) entre os animais suplementados e não suplementados.

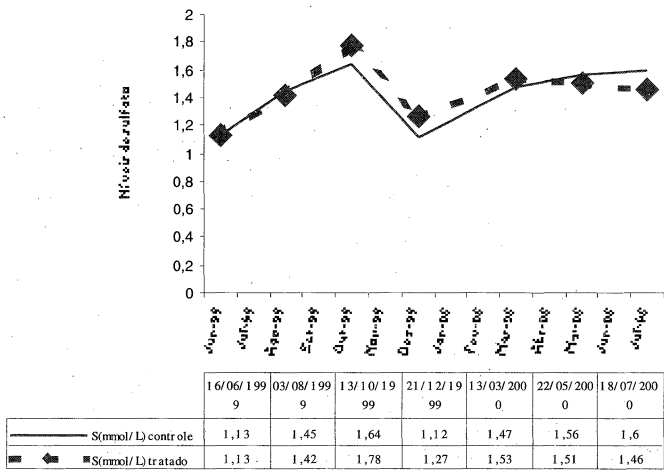


Fig. 5. Comparação das médias dos níveis séricos de sulfato (mmol/l) nos bovinos suplementados com cobre e nos bovinos controles no período de 16.6.99 a 18.7.00. Não houve diferença significativa entre os dois grupos (P=0,8770).

Quadro 6. Teores de Fe e S em amostras de água coletadas em 18.7.2000 em seis pontos alagados no pasto onde ocorreu o surto de morte súbita

Amostras	S (%)	Fe (ppm)
1	0,14	120,7
2	0,05	261,9
3	0,06	106,6
4	0,04	82,6
5	0,05	162,8
6	0,05	280,8
X±s	0,06±0,03	169,2±83,5

No Quadro 6 estão relacionados os resultados das amostras de água, coletadas em seis pontos alagados no pasto problema na data de 18.7.2000.

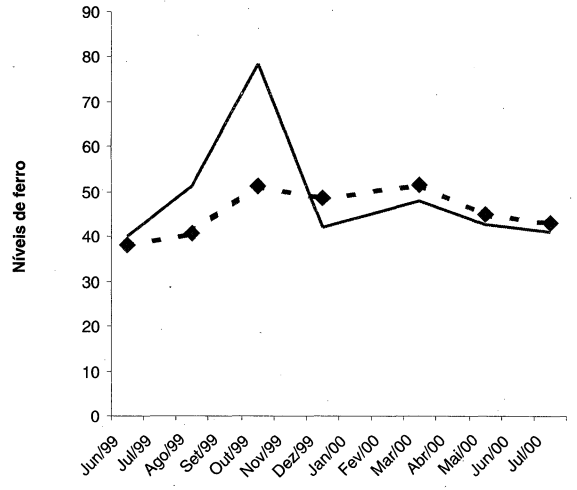


Fig. 6. Comparação das médias dos níveis séricos de ferro (µmol/l) nos bovinos suplementados com cobre e nos bovinos controles no período de 16.6.99 a 18.7.00. Não houve diferença significativa entre os dois grupos (P=0,1829).

DISCUSSÃO

Os baixos teores de Cu no fígado (0,8 a 5,0 ppm b.s.) dos bovinos mortos subitamente no surto descrito neste trabalho sugerem que as mortes foram causadas pela carência desse mineral. Esses teores de cobre são semelhantes aos encontrados em fígados de bovinos (1,3–8,4 ppm) em surtos anteriores de mortes súbitas que ocorreram na mesma região (Riet-Correa et al. 1993). As mortes súbitas observadas são semelhantes, também, às observadas na doença conhecida na Austrália como "falling disease", considerada uma manifestação terminal da carência de Cu. Nessa doença encontram-se níveis hepáticos muito baixos de Cu, entre 1 e 6 ppm b.s. (Bennets et al. 1948). Com teores hepáticos de Cu inferiores a 5 ppm, sinais clínicos da deficiência estão freqüentemente presentes (Smith & Coup 1973). Para alguns autores concentrações de Cu no tecido hepático variando de 20 a 25 ppm (b.s.) indicam deficiência (Hill et al. 1962, Ammerman 1970, Mills et al. 1976), enquanto que outros sugerem valores de 0 a 50 ppm como indicadores da deficiência de Cu (Underwood 1977, Tokarnia et al. 1999, Moraes et al. 1999).

No Rio Grande do Sul foram relatados outros cinco surtos de morte súbita associados à carência de Cu, entre os anos de 1986 e 1990 (Riet-Correa et al. 1993). Todos esses surtos ocorreram na mesma região em que ocorreu o surto descrito neste trabalho, em estabelecimentos localizados às margens das Lagoa Mirim e Lagoa dos Patos, em áreas de solos arenosos, de planícies costeiras e lacustres, muito semelhantes às descritas em outras regiões do mundo onde a carência de Cu é freqüente. Por outro lado, as mortes ocorreram em pastos destinados previamente para a plantação de arroz, sempre, no período do inverno ou início da pri-

mavera, época em que os alagamentos são frequentes na região.

No Brasil, as causas mais frequentes de mortes súbitas são as intoxicações por plantas, sendo que até o momento são conhecidas 12 espécies que causam esta síndrome: *Palicourea marcgravii* (Pacheco & Carneiro 1932, Döbereiner & Tokarnia 1959), *P. grandiflora* (Tokarnia et al. 1981), *P. juruana* (Tokarnia & Döbereiner 1982) e *P. aeneofusca* (Tokarnia et al. 1983) da família Rubiaceae; *Arrabidaea japurensis* (Tokarnia & Döbereiner 1981), *A. bilabiata* (Döbereiner et al. 1983) e *Pseudocalymma elegans* (Mello & Fernandes 1941, Tokarnia et al. 1969) da família Bignoniaceae; *Mascagnia rigida* (Tokarnia et al. 1961), *M. aff. rigida* (Tokarnia et al. 1985), *M. pubiflora* (Fernandes & Macruz 1964), *M. elegans* (Couceiro et al. 1976) e *Mascagnia* sp (Gava et al. 1998) da família Malpighiaceae. A *P. marcgravii* contém como princípio ativo o ácido fluoroacético (Oliveira 1963). Desconhece-se o princípio tóxico das demais espécies, mas é provável que contenham, também, ácido fluoroacético. Nas intoxicações por *Ateleia glazioviana* e *Tetrapterys* spp, que causam fibrose cardíaca, os animais podem, também, morrer subitamente (Tokarnia et al. 1989, Gava et al. 2001). No Rio Grande do Sul são conhecidas como causa de morte súbita *Mascagnia* sp. e *Ateleia glazioviana*. Nenhuma das espécies mencionadas anteriormente foi encontrada no local do surto. No entanto, para descartar a hipótese de que as mortes súbitas pudessem ser causadas por plantas tóxicas, realizamos experimentos com 13 espécies de plantas suspeitas de serem tóxicas (Quadro 1) as quais não manifestaram toxidez para os animais. Esses resultados sugerem fortemente que as mortes não foram causadas por plantas tóxicas, considerando que os coelhos são animais sensíveis à intoxicação por plantas que causam morte súbita. Por outro lado, em casos de mortes súbitas causadas por *Palicourea* spp, *Mascagnia* spp e *Arrabidaea* spp e por *Pseudocalymma elegans* observa-se, em muitos animais, vacuolização de células epiteliais dos túbulos renais (Tokarnia et al. 1990). No caso de morte súbita causada por *Ateleia glazioviana* e *Tetrapterys* spp observa-se fibrose cardíaca (Tokarnia et al. 1989, Gava et al. 2001). Nenhuma dessas lesões foi observada nos bovinos durante o surto, o que sugere, também, que as mortes não ocorreram pela ingestão de plantas tóxicas. Além disso, não foram encontradas as lesões histológicas descritas na carência de cobre. Bennets et al. (1948) descrevem fibrose cardíaca em bovinos que morreram subitamente. No entanto, essa lesão não foi constatada por Leigh (1975) na carência experimental de Cu, que observou, por microscopia eletrônica, lesões morfológicas extensas nas miofibrilas do músculo cardíaco, principalmente nas mitocôndrias, devido provavelmente a uma diminuição de citocromo oxidase, enzima que depende da presença de Cu para o seu funcionamento. Tokarnia et al. (1968, 1971, 1998) descrevem hemossiderose no fígado, baço e linfonodos de bovinos com deficiência de Cu. Essa lesão também não foi constatada nos fígados dos 10 bovinos que morreram durante o surto descrito neste trabalho.

A carência de Cu no local onde ocorreram as mortes súbitas é evidenciada, também, pelos baixos teores séricos desse

microelemento encontrados nos bovinos experimentais durante um ano após a ocorrência do surto (Fig. 1). Esses resultados demonstram que, tanto no grupo suplementado quanto no não suplementado, as médias dos teores de Cu sérico em 6 das 7 amostragens estiveram abaixo dos teores considerados normais, que variam de 7,5 a 15 $\mu\text{mol/l}$ (Underwood & Suttle 1999). Entretanto, houve diferenças significativas nos teores séricos de Cu ($P=0,0046$) entre o grupo suplementado e o não suplementado. A Fig. 1 revela que a suplementação foi eficiente durante os dois primeiros meses após a administração do Cu. A resposta à suplementação comprova a ocorrência da carência de Cu no estabelecimento estudado. Riet-Correa et al. (1993) suplementaram animais com Cu em áreas onde ocorreram mortes súbitas, observando uma resposta variável: em um rebanho o ganho de peso dos animais suplementados foi significativamente superior; enquanto que em outro não houve diferenças.

A carência de cobre e a resposta à suplementação são demonstradas também pelos teores séricos de ceruloplasmina (Fig. 2) que, apesar de encontrarem-se abaixo dos teores normais nos dois grupos durante todo o experimento, foram significativamente superiores nos bovinos suplementados ($P=0,0001$). Kincaid et al. (1986) consideram normais os teores de ceruloplasmina de 65 a 130 mg/l, enquanto que no Brasil, em bovinos suplementados com Cu, foram encontrados teores de 50 ± 15 mg/l, que são considerados adequados (Enrico L. Ortolani, 2001, Universidade de São Paulo, dados não publicados). A ceruloplasmina é um bom indicador do estado do Cu no organismo dos animais (Ward 1978, Suttle 1986a, Smart et al. 1992, Radostits et al. 1999), o que foi comprovado pelo índice de correlação encontrado entre os teores séricos de Cu e os dessa enzima ($r=0,67$; $P=0,05$).

Em muitos casos a deficiência de Cu pode ser primária, quando a ingestão dietética do elemento for insuficiente diante dos níveis requeridos pelo animal. Já a deficiência secundária de Cu ocorre quando, apesar da ingestão adequada, sua absorção e utilização pelos tecidos estão prejudicadas pela presença de antagonistas na dieta. Os principais minerais antagonistas do Cu são Mo, S e Fe (Homse 1981, Suttle 1991, Niederman et al. 1994, Gengelbach et al. 1994, Schonewille et al. 1995, Ramirez et al. 1998, Radostits et al. 1999).

As exigências dietéticas de cobre para o gado de corte, de acordo com a maioria dos autores variam de 4 a 10 ppm (Underwood 1977, Sousa et al. 1980, Brum et al. 1987, Pott et al. 1989 a,b, NRC 1996, Radostits et al. 1999). Nossos resultados demonstraram (Quadro 3) que as concentrações de Cu nas pastagens, no momento do surto variaram de 7,1 a 9,2 ppm, sendo considerados adequados para ruminantes. Contrariamente, o Quadro 4 mostra que as concentrações de Cu no tecido vegetal, que variaram de 1,36 ppm a 4,76 ppm durante o período de um ano do experimento, estão abaixo dos níveis considerados adequados, revelando não atender às necessidades de Cu para os animais em pastejo. Esses resultados sugerem que a carência de Cu que ocorre no sul do Rio Grande do Sul é devida, pelo menos em parte, aos baixos níveis de cobre contidos nas forrageiras. Por outro lado, os

teores de Cu nas pastagens coletadas durante o surto foram adequados, evidenciando que outros minerais, antagonistas do Cu, podem estar causando carência secundária.

O principal antagonista de Cu que causa carência secundária é Mo. À medida que a concentração de Mo aumenta nas forragens, há decréscimo na concentração de Cu no organismo (Homse 1981, Suttle 1988, 1991, Underwood & Suttle 1999). As exigências nutricionais de Mo para bovinos ainda não foram perfeitamente estabelecidas, ocorrendo uma grande variação de limites, que depende dos teores de Cu e S presentes na dieta (Suttle 1975). Radostits et al. (1999) consideram seguros níveis de até 3 ppm de Mo na dieta. Por outro lado, trabalhos sugerem que concentrações maiores do que 0,5 ppm no pasto podem, em algumas ocasiões, estar associados a deficiência de Cu (Lee et al. 1999). No Brasil, Sousa et al. (1980) encontraram em forrageiras do Mato Grosso valores altos de Mo (9,2 ppm) e apontam esses valores como responsáveis pelos baixos teores de cobre nas pastagens (2,7 ppm). Todavia, Sousa et al. (1989) encontraram no Estado de Roraima níveis de Cu e Mo nas pastagens de 1,5 ppm a 3,6 ppm e 0,51 ppm a 0,54 ppm, respectivamente, concluindo que o Mo não oferece perigo de intoxicação por encontrar-se abaixo de 2 ppm. Gavillon & Quadros (1976) constataram em pastagens do Rio Grande do Sul níveis médios de Mo de 0,32 ppm na primavera e 0,25 ppm no verão; consideram esses teores baixos para o crescimento da pastagem, mas que não oferecem risco de provocar deficiência de cobre, cujos teores foram de 7,1 ppm na primavera e 5,7 ppm no verão. Moraes et al. (1994) verificaram que 9% de um grupo de amostras provenientes na sua maioria do Estado de Mato Grosso apresentaram níveis de Mo superiores a 6 ppm. Nesse mesmo trabalho os autores encontraram altos teores de S e Fe nas pastagens, sugerindo que a carência de cobre que ocorre na região estudada esteja de alguma forma associada aos níveis altos desses três minerais. Por outro lado, um dos principais fatores que determinam a interferência de Mo na absorção do cobre é a relação cobre:molibdênio. Suttle (1991) considera que essa relação é variável e as relações passíveis de causar problema diminuem de 5:1 para 2:1 na medida em que os teores de Mo aumentam de 2 para 10 ppm. Em nossos resultados, as concentrações médias de Mo variaram de 0,33 a 0,96 ppm, e a relação Cu:Mo variou entre 4,3 a 28,00 (Quadro 4), sugerindo que o Mo não interfere na absorção de Cu e, portanto, não é responsável pela carência deste último.

Outro elemento que pode interferir como antagonista do Cu é o enxofre. As concentrações adequadas de enxofre na dieta variam de 0,1% a 0,2% (NRC 1996, McDowell 1995, Ortolani 2001). Matioli et al. (1996) e Ramirez et al. (1998) consideraram que 0,3% de S nas pastagens podem causar hipocuprose, enquanto que o NRC (1996) menciona que 0,4% de S na alimentação resulta tóxico para bovinos. No Brasil, Gavillon & Quadros (1976) encontraram teores de 0,17% na primavera e 0,12% no verão em pastagens do Rio Grande do Sul. Moraes et al. (1994) encontraram valores acima de 0,4% no Estado do Mato Grosso. Nossos resultados, demonstrados nos Quadros 4 e 5, revelam que as concentrações médias de S no pasto no período em que ocorreu o surto foram de

$0,2 \pm 0,03\%$, enquanto que no período de um ano posterior ao surto as médias variaram de $0,21 \pm 0,04\%$ a $0,50 \pm 0,17\%$. Os valores encontrados nas amostras coletadas na época do surto podem ser considerados dentro dos requerimentos (0,1% a 0,2%). No entanto, as amostras coletadas ao longo de um ano encontram-se com valores acima dos níveis normais e inclusive em níveis considerados tóxicos, ou seja, acima de 0,4%. Todavia, os valores mais altos foram encontrados no final da primavera, portanto em época diferente à da ocorrência dos surtos. Por outro lado, os teores médios de enxofre na água foram altos, 0,06% ou 600 mg/l. Segundo Underwood & Suttle (1999), concentrações de 600 mg/l de enxofre na água acrescentam 3g de S por kg de matéria seca na alimentação, o que representa 0,3% a mais nas concentrações encontradas. Esses teores são bem mais altos que qualquer requerimento nutricional e podem induzir deficiência de cobre (Smart et al. 1986). Carência de cobre foi descrita no Canadá em bezerros consumindo água com 1900 mg/l de S (Smart et al. 1992). No presente trabalho os níveis de S encontrados em pastagens, associados aos altos teores encontrados nas amostras de água sugerem que a carência de cobre no sul do Rio Grande do Sul deve-se, em parte, às altas concentrações de S na dieta (pastagem mais água) às quais interferem na absorção de Cu.

Concentrações séricas normais de sulfato, segundo Barreto Júnior et al. (1996), variam de 0,6 até 1,5 mmol/l, enquanto que para Ortolani (2001) essas concentrações variam de 0,38 a 1,78 mmol/l. A Fig. 5 demonstra que os teores de S séricos estão dentro da faixa considerada como normal pelos dois autores.

Outro mineral considerado um potente antagonista do metabolismo do cobre é o ferro (Humphries et al. 1983, Suttle 1988, 1991, Schonewille et al. 1995). Os requerimentos de Fe, na dieta do gado de corte são de aproximadamente 50 ppm (NRC 1996) e concentrações de 250 a 500 ppm de Fe na alimentação causam depleção dos níveis de Cu em bovinos (Bremner et al. 1987, Phillipppo et al. 1987a). Durante o surto (Quadro 3) as concentrações de Fe no tecido vegetal variaram de 355,7 a 661,2 ppm e no experimento a variação foi de 172,96 a 437,24 ppm (Quadro 4). Ramirez et al. (1998) relatam carência de cobre em pastagens com concentrações de 5,2 ppm de Cu, 0,38% de S e 251 ppm de Fe, concluindo que a hipocuprose era causada pelos baixos níveis de Cu associados a altos níveis de Fe e S, principalmente durante o outono, quando as pastagens estão alagadas. Essa situação é muito semelhante à encontrada em nosso experimento, já que as maiores concentrações de Fe nas pastagens foram encontradas no inverno (Quadro 4), o que sugere que existe uma relação entre o nível de Fe nas gramíneas e o alagamento das pastagens. Cavalheiro & Trindade (1992) ressaltam que no Rio Grande do Sul a umidade do solo durante o inverno e primavera é elevada, provocando a redução de Fe^{+3} para Fe^{+2} que é assimilável pelas plantas, que podem conter níveis tóxicos de Fe para bovinos. Em lavouras de arroz irrigado a alta disponibilidade de Fe pode causar toxicidade para este cereal, problema que ocorre frequentemente nas lavouras da região em consequência do processo de redução do Fe, re-

sultante da formação de uma lâmina de água sobre o solo. (Vahl et al. 1999, Sousa et al. 2000). Durante a inundação da cultura de arroz, os teores de Fe variam de 10 a 30 ppm até maiores que 500 ppm na solução do solo (Ponnamperuma 1972, Sousa 1991, Vahl 1991). Solos arenosos, moderadamente ácidos e mal drenados, como os da região onde ocorrem surtos de morte súbita, estão entre o grupo de solos mais propensos à ocorrência de intoxicação do arroz por ferro (Sousa et al. 2000). Pott et al. (1989a) sugerem existir uma relação entre o nível de Fe nas gramíneas e o alagamento das pastagens no Pantanal Mato-Grossense, condição que favorece a solubilização e o transporte de Fe em solos extremamente arenosos. Na região do Pantanal Mato-Grossense a toxicidade por Fe nas forrageiras é mais evidenciada nos períodos de alta umidade e tem sido associada a baixos teores de Cu no pasto (Sousa et al. 1980, Brum et al. 1987, Pott et al. 1989 a,b,c).

Além dos altos teores de Fe nas pastagens devemos considerar que essa não é a única fonte do mineral para os animais. Altos teores de Fe foram encontrados, também, na água examinada durante a inundação das pastagens (Quadro 6). Na Nova Zelândia baixa performance produtiva em gado de leite foi atribuída a hipocuprose associada a altos níveis de Fe na água (Coup & Campell 1964, Campell et al. 1974). Na região de Nhecolândia, Mato Grosso, concentrações de Fe nas lagoas de água doce podem representar até 50% das necessidades diárias de Fe para bovinos de corte da região (Brum & Sousa 1985, Pott et al. 1989a). Em um animal que esteja ingerindo 3% do peso vivo de matéria seca e 10% do peso vivo de água, a presença de 150 ppm de Fe na água significa um acréscimo de 500 ppm na matéria seca. Por outro lado, outra fonte muito importante de Fe é o consumo de solo, que em algumas ocasiões, em bovinos, pode chegar a 600 kg por ano (Healy 1974). O maior consumo de solo ocorre quando há pouca disponibilidade de pastagens, o que é freqüente durante o inverno, na época em que se registram os surtos de morte súbita. Esses fatos sugerem que o alto consumo de Fe por parte dos animais talvez seja o fator mais importante na carência de Cu que ocorre na região.

As concentrações de Fe no soro sanguíneo (Fig. 6) evidenciam, também, valores acima da faixa considerada normal por Radostits et al. (1999) que citam teores de 17,9 a 35,8 $\mu\text{mol/l}$ e por Underwood & Suttle (1999), que citam valores de 18,9 a 32,2 $\mu\text{mol/l}$. A ingestão de altas doses de Fe relaciona-se com altas concentrações de Fe no sangue, e leva ao decréscimo das concentrações de Cu e ceruloplasmina no sangue (Phillippo et al. 1987a,b, Suttle 1988, Schonewille et al. 1995). Portanto, parece evidente que a ingestão excessiva de Fe é a principal responsável pelos baixos teores de cobre e ceruloplasmina encontrados no soro dos animais experimentais.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho comprovam a ocorrência de carência de cobre nas regiões onde ocorrem surtos de morte súbita. Os baixos teores de Cu encontrados no fígado dos animais afetados sugerem que as mortes foram causadas pela

carência deste mineral. A ausência de toxicidade, constatada em 13 plantas invasoras encontradas no pasto onde ocorreu o surto, indica que as mortes súbitas não foram causadas por plantas. A principal causa da carência de Cu no presente estudo parece ser os altos teores de Fe nas pastagens e na água. No entanto, é provável que os teores baixos ou marginais de Cu encontrados nas pastagens participem, também, na etiologia da enfermidade. Por outro lado, é possível que esteja ocorrendo concomitantemente interferência do S com o cobre, o que é evidenciado pelos teores ocasionalmente altos de S encontrados nas pastagens, assim como pelos altos teores desse elemento encontrados na água.

Agradecimentos.— Os autores gostariam de externar o seu reconhecimento ao Dr. Thomas Lucia Júnior pela contribuição nos métodos estatísticos e à bioquímica Clara Satsuki Mori que realizou as determinações químicas dos minerais.

REFERÊNCIAS

- Ammerman C.B. 1970. Recent developments in cobalt and copper in ruminant nutrition. A review. *J. Dairy Sci.* 53(8):1097-107.
- Barreto Junior R.A. 1996. Influência de algumas variáveis sobre a concentração de sulfato inorgânico sanguíneo de bovinos. Estudos da relação das concentrações de enxofre em capins e sulfato inorgânico sérico de bovinos criados no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, FMVZ-USP, São Paulo. 53p.
- Barros N.N., Teixeira L.B., Moraes E., Canto A.C. & Italiano E.C. 1981. Teores de minerais no complexo solo-planta-animal de áreas firmes do Amazonas. Comunicado Técnico nº 16, Embrapa-UEPAE, Manaus. 3 p.
- Bauer A.G., Santos A.G. & Mancuso P.C. 1964. Algumas observações sobre uma doença de bovinos no município de Santa Vitória do Palmar. III Reunião da Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.153-161.
- Bennets H.W., Beck A.B. & Harley R. 1948. The pathogenesis of "falling disease". *Aust. Vet. J.* 24:237-244.
- Bondan E.F., Riet-Correa, F. & Giesta S. 1991. Níveis hepáticos de cobre em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 11(3/4):75-80.
- Bremner I., Humphries W.R., Phillippo M., Walker J.M. & Morrice P.C. 1987. Iron-induced copper deficiency in calves: dose-response relationships and interactions with molybdenum and sulphur. *Anim. Prod.* 45:403-414.
- Brum P.A.R. & Sousa J.C. 1985. Níveis de nutrientes minerais para gado, em lagoas (baías e salinas) no Pantanal sul Mato-grossense. *Pesq. Agropec. Bras.* 20(12):1451-1454.
- Brum P.A.R., Sousa J.C., Comastri Filho J.A. & Almeida I.L. 1987. Deficiências minerais de bovinos na sub-região dos Paiaguás, no Pantanal Mato-grossense. II. Cobre, zinco, manganês e ferro. *Pesq. Agropec. Bras.* 22(9/10):1049-1060.
- Campbell A.G., Coup M.R., Bishop W.H. & Wright D.E. 1974. Effect of elevated iron intake on the copper status of grazing cattle. *J. Agric. Res.* 17:393-399.
- Cavalheiro A.C.L. & Trindade D.S. 1992. Os minerais para bovinos e ovinos criados em pastejo. Sagra-DC Luzzatto, Porto Alegre. 142p.
- Couceiro J.E.M., Silva A.C.C. & Silva J.A. 1976. Observações e ensaios sobre a alegada intoxicação de bovinos por plantas, no Estado de Pernambuco. XV Congr. Bras. Med. Veterinária, Rio de Janeiro, p. 45-46.
- Coup M.R. & Campbell A.G. 1964. The effect of excessive iron intake upon the health and production of dairy cows. *J. Agric. Res.* 7:624-38.
- Döbereiner J. & Tokarnia C.H. 1959. Intoxicação de bovinos pela "erva de rato" (*Palicourea macgravi*) no Vale do Itapicuru, Maranhão. *Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J.*, 2:83-91.
- Döbereiner J., Tokarnia C.H. & Silva M.F. 1983. Intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em bovinos na região Amazônica do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 3(1):17-24.

- Fernandes N.S. & Santiago A.M.H. 1972. Níveis de cobre em pastagens do Estado do Mato Grosso. *Biológico*, São Paulo, 38(10):358-60.
- Fernandes N.S. & Macruz R. 1964. Toxicidade da "corona", *Mascagnia pubiflora* (Juss.) Griseb. (Malpighiaceae). *Arqs Inst. Biol. Animal*, São Paulo, 31:1-4.
- Gava A., Cristani J., Branco J., Neves D.S., Mondadori A.J. & Sousa R.S. 1998. Mortes súbitas em bovinos causadas pela intoxicação de *Mascagnia* sp (Malpighiaceae), no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 18(1):16-20.
- Gava A., Barros C. S. L., Pilati C., Barros S.S. & Mori A. M. 2001. Intoxicação por *Atelesia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 21(2):49-59.
- Gavillon O. & Quadros A.T. 1976. O cobre, o molibdênio e o sulfato inorgânico em pastagens nativas do Rio Grande do Sul. *Anu. Tec. IPZFO, Porto Alegre*, 3: 423-453.
- Gengelbach G.P., Ward J.D. & Spears J.W. 1994. Effect of dietary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *J. Anim. Sci.* 72:2722-2727.
- Guimarães A.M., Saliba E.O.S., Rodriguez N.M. & Moreira P.K. 1992. Variação sazonal de vitamina A, macro e micronutrientes no capim, plasma e fígado de novilhas Nelore, criadas em pastagens de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 44(1):57-66.
- Healy W.B. 1974. Ingested soil as a source of elements to grazing animals, p. 448-450. In: *Trace Elements Metabolism in Animals*. University Park Press, Baltimore. Cit. Conrad et al. 1984. (Cit. Tokarnia et al. 2000)
- Hill R., Thambyah R., Wan S.P. & Shanta C.S. 1962. The copper status of cattle and buffalo in Malaya. *J. Agric. Sci.* 59:409-414.
- Homse A.C. 1981. Hipocupremia experimental em bovinos: su efecto sobre parámetros reproductivos y bioquímicos. *Revta Med. Vet.*, Buenos Aires, 62(5):369-384.
- Humphries W.R., Phillippo M., Young B.W. & Bremner I. 1983. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *Brit. J. Nutr.* 49:77-86.
- Kincaid R.L., Clay C.C. & Krieger R.I. 1986. Relationship of serum and plasma copper and ceruloplasmin of cattle and the effects of whole blood sample storage. *Am. J. Vet. Res.* 47(5):1157-1159.
- Krijgsheld K.R., Frankena H., Scholtens E., Zweens J. & Mulder G.J. 1979. Absorption, serum levels and urinary excretion of inorganic sulfate after oral administration of sodium sulfate in the conscious rat. *Bioch. Bioph. Acta* 586:492-500.
- Lee J., Masters D.G., White C.L., Grace N.D. & Judson G.J. 1999. Current issues in trace element nutrition of grazing livestock in Australia and New Zealand. *Aust. J. Agric. Res.* 50(8):1341-1364.
- Leigh L.H. 1975. Changes in the ultrastructure of cardiac muscle in steers deprived of copper. *Res. Vet. Sci.* 18: 282-287.
- Lisbôa J.A.N., Kuchembuck M.R.G., Kohayagawa A., Bomfim S.R.M., Santiago A.M.H. & Dutra I.S. 1996. Resultados de patologia clínica e dosagem de elementos minerais em bovinos acometidos pelo botulismo epizootico no Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 16(4):91-97.
- Lopes H.O.S., Fichtner S.S., Jardim E.C., Costa C.P. & Martins Junior W. 1980. Teores de cobre e zinco em amostras de solo, forrageiras e tecido animal da micro-região Mato Grosso de Goiás. *Arqs Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte*, 32(2):151-59.
- Matioli G.A., Ramírez C.E., Giuliodori M.J., Tittarelli C.M., Yano H. & Matsui T. 1996. Characterization of cattle copper deficiency in the Magdalena district. *Livestock Product. Sci.* 47:7-10.
- McDowell L.R. 1995. *Nutrition of Grazing Ruminants in Warm Climates*. Academic Press, New York. 306 p.
- Mello E.M.M. & Fernandes J.S. 1941. Contribuição ao estudo de plantas tóxicas brasileiras. *Serv. Inf. Agrícola, Min. Agricultura*, Rio de J. 106p.
- Miles P.H., Wilkinson N.S. & McDowell L.R. 2001. *Analysis of Mineral for Animal Nutrition Research*. 3rd ed. Animal Sciences, University of Florida. 117 p.
- Mills C.F., Dalgarno A.C. & Wenham G. 1976. Biochemical and pathological changes in tissues on Friesian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Brit. J. Nutr.* 35:309-331.
- Moraes S.S., Silva G.N. & Döbereiner, J. 1994. Microelementos minerais e "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 14(1):25-33.
- Moraes S.S., Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1999. Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 19(1):19-33.
- Niedermaier C.N., Blodgett D., Eversole D., Schurig G.G. & Thatcher C.D. 1994. Effect of copper and iron on neutrophil function and humoral immunity of gestating beef cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204(11):1796-800.
- NRC 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th ed. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- Oliveira M.M. 1963. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea macgravii*. *St. Hil. Experimentia* 19:586.
- Ortolani E.L. 2001. Sulphur deficiency in dairy calves reared on pasture of *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural, Santa Maria*, 31(2): 257-261.
- Pacheco G. & Carneiro V. 1932. Estudos experimentais sobre plantas tóxicas. 1. Intoxicação dos animais pela "erva de rato da mata" *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Revta Soc. Paulista Med. Vet.* 2(2/3):23-46.
- Phillippo M., Humphries W.R. & Garthwaite P.H. 1987a. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status and growth in the cattle. *J. Agric. Sci.* 109:315-320.
- Phillippo M., Humphries W.R. & Garthwaite P.H. 1987b. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrous cycle in the cattle. *J. Agric. Sci.* 109:321-336.
- Ponnamperuma F.N. 1972. The Chemistry of submerged soil. *Advances in Agronomy*, New York, 24: 29-96.
- Pott E.B., Almeida I.L., Brum P.A.R., Comastri Filho J.A., Pott A. & Dynia J.E. 1989a. Nutrição mineral de bovinos de corte no Pantanal Mato-grossense. 2. Micronutrientes na Nhecolândia (parte central). *Pesq. Agropec. Bras.* 24(1):109-126.
- Pott E.B., Brum P.A.R., Pott A., Almeida I.L., Comastri Filho J.A. & Tullio R.R. 1989b. Nutrição mineral de bovinos de corte no Pantanal Mato-grossense. IV. Levantamento de micronutrientes no Baixo Piquiri. *Pesq. Agropec. Bras.* 24(11):1369-1380.
- Pott E.B., Comastri Filho J.A., Almeida I.L., Brum P.A.R. & Pott, A. 1989c. Nutrição mineral de bovinos de corte no Pantanal Mato-grossense. V. Levantamento de micronutrientes na sub-região de Aquidauana. *Pesq. Agropec. Bras.* 24(1):109-126.
- Quin B.F., Woods P.H. 1976. Rapid manual determination of sulfur and phosphorus in plant material. *Soil Sci. Plant Analysis* 7(4):426-451.
- Quin B.F. & Woods P.H. 1979. Automated catalytic method for the routine determination of molybdenum in plant materials. *Analyst* 194:552-559.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 1999. *Veterinary Medicine*. 9th ed. W Saunders, London, p.1477-502.
- Ramírez C.E., Mattioli G.A., Tittarelli C.M., Giuliodori M.J. & Yano H. 1998. Cattle hypocuprosis in Argentina associated with periodically flooded soils. *Livestock Product. Sci.* 55:47-52.
- Riet-Correa F., Bondan E.F., Mendez M.C., Moraes S.S. & Concepción M.R. 1993. Efeito da suplementação com cobre e doenças associadas à carência de cobre em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4)45-49.
- Sanders D.E. 1980. Bovine neonatal ataxia associated with hypocupremia in pregnant cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176:728-29.
- Schonewille J.T., Yu S. & Beynen, A.C. 1995. High iron intake depresses hepatic copper content in goats. *Veterinary Quarterly* 17:14-17.
- Schosinsky K.H., Lehmann H.P. & Beeler M.F. 1974. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of *o*-dianisidine dihydrochloride. *Clin. Chem.* 20(12):1556-1563.
- Smart M.E., Cohen R., Christense A.D. & Williams C.M. 1986. The effects of sulphate removal from the drinking water on the plasma and liver copper and zinc concentrations of beef cows and their calves. *Can. J. Anim. Sci.* 66:669-680.

- Smart M.E., Cumbaluk N.F. & Christense A.D. 1992. A review of copper status of cattle in Canada and recommendations for supplementation. *Can. Vet. J.* 33:163-170.
- Smith B.P. & Coup M.R. 1973. Hypocuprosis: a clinical investigation of dairy herds in Northland. *N. Z. Vet. J.* 21:252-258.
- Sousa R.O. 1991. Alternativas tecnológicas que visam minimizar o efeito da toxidez por ferro em arroz irrigado (*Oryza Sativa* L.). Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 96p.
- Sousa J.C., Conrad J.H., McDowell L.R., Ammerman C.B. & Blue W.G. 1980. Inter-relações entre minerais no solo, forrageiras e tecido animal. 2. Cobre e molibdênio. *Pesq. Agropec. Bras.* 15(3):335-341.
- Sousa J.C., Nicodemo M.L.F. & Darsie G. 1989. Deficiências minerais em bovinos de Roraima, Brasil. V. Cobre e molibdênio. *Pesq. Agropec. Bras.* 24(12):1547-1554.
- Sousa R., Camargo F.A.O. & Vahl L.C. 2000. Solos alagados, p.127-149. In: Fundamentos da Química do Solo. Meurer E.J.(ed.) Gênese, Porto Alegre.
- Suttle N.F. 1975. The role of organic sulphur in the copper-molybdenum-S interrelationship in ruminant nutrition. *Brit. J. Nutr.* 34:411-420.
- Suttle N.F. 1986a. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet. Rec.* 119:148-152.
- Suttle N.F. 1986b. Copper deficiency in ruminants: recent developments. *Vet. Rec.* 119:519-522.
- Suttle N.F. 1988. The role of comparative pathology in the study of copper and cobalt deficiencies in ruminants. *J. Comp. Path.* 99:241-257.
- Suttle N.F. 1991. The interactions between copper, molybdenum, and sulphur in ruminant nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 11:121-140.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1981. Intoxicação por *Arrabidaea japurensis* (Bignoniaceae) em bovinos em Roraima. *Pesq. Vet. Bras.* 1(1):7-17.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1982. Intoxicação experimental por *Palicourea juruana* (Rubiaceae) em bovinos e coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 2(1):17-26.
- Tokarnia C.H. & Döbereiner J. 1998. Sobre o "ronca", doença de etiologia obscura em bovinos, caracterizada por respiração ruidosa. *Pesq. Vet. Bras.* 18(3/4):93-98.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1960. Deficiência de cobre em bovinos no Delta do Rio Parnaíba, nos Estados do Piauí e Maranhão. *Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J.*, 3:25-37.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1961. Intoxicação por um "tingui" (*Mascagnia rigida*) em bovinos no Nordeste do Brasil. *Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J.*, 4:203-215.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Canella C.F.C. & Guimarães J.A. 1966. Ataxia enzoótica em cordeiros no Piauí. *Pesq. Agropec. Bras.* 1:375-382.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C., Guimarães J.A. & Döbereiner J. 1968. Deficiência de cobre e cobalto em bovinos e ovinos no Nordeste e Norte do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 3:351-360.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Canella C.F.C. & Guimarães J.D. 1969. Intoxicação experimental por *Pseudocalymma elegans* (Vell.) Kuhl. em bovinos. *Pesq. Agropec. Bras.* 4:195-204.
- Tokarnia C.H., Guimarães J.A., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1971. Deficiência de cobre e cobalto em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 6:61-77.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Silva M.F. 1981. Intoxicação por *Palicourea grandiflora* (Rubiaceae) em bovinos no Território de Rondônia. *Pesq. Vet. Bras.* 1(3):85-94.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Couceiro J.E.M. & Silva A.C.C. 1983. Intoxicação por *Palicourea aeneofusca* (Rubiaceae), a causa de "mortes súbitas" em bovinos na Zona da Mata de Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 3(3):75-79.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1985. Intoxicação experimental por *Mascagnia* aff. *rigida* (Malpighiaceae) em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 5(4):121-128.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V., Döbereiner J., Consorte A. & Gava A. 1989. *Tetrapteryx* spp (Malpighiaceae), a causa de mortalidade em bovinos caracterizadas por alterações cardíacas. *Pesq. Vet. Bras.* 9(1/2):23-44.
- Tokarnia C.H., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 1990. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 10(1/2):1-10.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Moraes S.S. & Peixoto P.V. 1999. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos- revisão dos estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. *Pesq. Vet. Bras.* 19(2):47-62.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. 2000. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):127-138.
- Trindade D.S., Cavalheiro A.C.L. & Arnt L.M. 1990. Concentrações de cobre, zinco e enxofre em pastagens do Rio Grande do Sul. *Revta Soc. Bras. Zootec.* 19:489-497.
- Underwood E.J. 1977. Trace Elements in Human and Animals Nutrition. 4th ed. Academic Press, New York. 545 p.
- Underwood E.J. & Suttle N.F. 1999. The Mineral Nutrition of Livestock. 3rd ed. CABI Publ. Wallingford. 614 p.
- Vahl L.C. 1991. Toxidez de ferro em genótipos de arroz irrigado por alagamento. Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 167 p.
- Vahl L.C., Guidotti R.M.M. & Fabres R.T. 1999. Análise química de solo para a estimativa da acumulação de Fe²⁺ e Mn²⁺ durante o alagamento. 1^o Cong. Bras. Arroz Irrigado, Pelotas, p.369-371.
- Valli V.E.O. 1985. The hematopoietic system, p.125-130. In: Jubb K.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) Pathology of Domestic Animals. Vol. 3. 3rd ed. Academic Press, New York.
- Ward G.M. 1978. Molybdenum toxicity and hypocuprosis in ruminants: a review. *J. Anim. Sci.* 46(4):1078-1085.