



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**RESPUESTA FISIOLÓGICA DE ZINC Y COBRE
SUPLEMENTADOS EN UNA DIETA A BASE DE ALFALFA
PARA BORREGOS**

JOSÉ ALFREDO PÉREZ GÓMEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: **Respuesta fisiológica de zinc y cobre suplementados en una dieta a base de alfalfa para borregos**, realizada por el alumno: **C. José Alfredo Pérez Gómez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

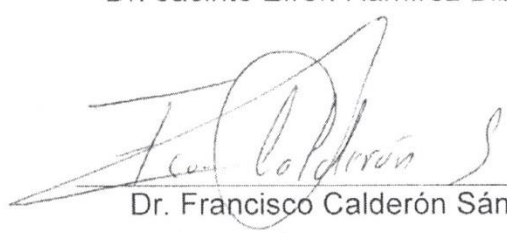
CONSEJO


Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR


Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bibriesca

ASESOR


Dr. Francisco Calderón Sánchez

Montecillos, Texcoco, Estado de México, julio de 2015.

DEDICATORIA

A mis padres: Myrna Gómez Coutiño y Artemio Pérez Rodríguez, por el hecho de darme la vida y el intenso amor que siempre he recibido, por todo el sacrificio que han realizado hasta la fecha y esa preocupación que solo quien es padre lo entendería. A ti mamá por tantas preocupaciones causadas por mí, por todos los ánimos y la comprensión que me das, por ese amor de madre tan lindo, gracias porque tú eres un pilar que sostiene mis éxitos. A ti papá, que me has enseñado como luchar para ser mejor cada día de mi vida, por todos los sabios consejos y por todo ese apoyo incondicional que me brindas, por ser un padre único, gracias.

A Dennise Brizeida Velasco Estrada, por soportarme en las buenas y malas, por toda la sinceridad y el cariño que me brindas en el día a día, por toda esa confianza y todos esos buenos momentos a tu lado, porque te amo con todo mi corazón.

A mi hermana: “liz” Lizbeth Pérez Gómez, por confiar en mí y darme su apoyo incondicional, gracias hermana por ser un ejemplo al progreso y profesionalismo.

A mis tíos León Rodríguez, Julia Hernández, “yuko” Julio Ernesto Rodríguez Hernández y “jhony” León Felipe Rodríguez Hernández, por todo ese apoyo incondicional y ser parte de mi inspiración en la decisión de mi formación, y por esa convivencia en familia, por ser parte del proceso de mi carrera, para ustedes con mucho cariño y respeto.

A mi abuelo José Pérez Uribe por todos los momentos buenos en familia y sus sabios consejos.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico que me otorgo para poder continuar mis estudios y así poder obtener el grado de Maestro en Ciencias. Al **Colegio de Postgraduados** por permitirme realizar mi estudio de maestría en esta institución. Así como también al **laboratorio de nutrición de rumiantes** por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. Del mismo modo al **laboratorio de fertilidad de suelos** del programa de Edafología quienes me brindaron todo el apoyo necesario para realizar parte de mis análisis.

Al **Dr. David Hernández Sánchez** por el apoyo, orientación, amistad y confianza que me brindo, durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados. Al **Dr. Efrén Ramírez Bribiesca** por todo el apoyo, consejos y orientación que me brindo para la realización exitosa de esta investigación, así como la amistad que me brindo. Al **Dr. Francisco Calderón Sánchez** por sus valiosas sugerencias hacia esta investigación. A la **Dra. María Magdalena Crosby Galván** por todas las facilidades que me otorgo para los análisis de laboratorio. A la **M.C. Juliana Padilla Cuevas** por las facilidades que me otorgo para algunos análisis de laboratorio.

A todos aquellos profesores que me brindaron su amistad y conocimientos durante la Maestría.

Al Sr. Anastasio jefe de laboratorio de Nutrición Animal y sus auxiliares Sr. José Luis de la Rosa y Sr. Jorge.

Al M.C. Edgar García Cruz auxiliar en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Química Ambiental

A mis amigos y compañeros que me brindaron ánimos y apoyo durante mi estancia en el postgrado: Carlos López, Oscar Ortiz, Juan Luis Gómez, Edgar Pliego, Margarito, Gemma, Alejandro García, Omar, José Leyver, Canuto, Emma Santillán, Karym, Felipe, José Cornejo, Martin Rodríguez, Pedro Topete, Diana Gutiérrez, Fernando, Adrián Cuautle, Adrián Gloria, Octavio, Danilo, Yuridia Bautista, Paola y Eva.

En especial a mis amigos Arely F. Gutiérrez Arenas y Bernardino Espinoza Velasco por todo su apoyo que me han brindado al pasar de casi 9 años, tanto apoyo no se puede expresar en tan pocas palabras, solo termino diciéndoles muchas gracias.

A todo el personal de apoyo del área de ganadería y biblioteca por su amistad y eficiencia en su trabajo: Verónica, Celsa, Guadalupe, Ana luisa, Leticia y Jacinto.

Contenido

LISTA DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1. Desnutrición mundial y en México.....	4
4.2. Situación de la ovinocultura en México	5
4.3. Función e importancia de los minerales en los animales	6
4.4. Perfil mineral en agua y forrajes	7
4.5. Características del cobre (Cu) y zinc (Zn)	8
4.6. Requerimientos de cobre (Cu)	11
4.7. Requerimientos de zinc (Zn).....	12
4.8. Fisiología y metabolismo del cobre (Cu)	12
4.9. Fisiología y metabolismo del zinc (Zn)	15
4.10. Interacción entre cobre (Cu) y zinc (Zn)	17
4.11. Toxicidad de cobre (Cu).....	19
4.12. Intoxicación de zinc (Zn).....	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1. Lugar de estudio.....	24
5.2. Animales y periodo experimental	24
5.3. Alimentación	24
5.4. Tratamientos experimentales	25

5.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....	26
5.6. Análisis de laboratorio.....	27
5.7. Variables evaluadas.....	27
5.7.1. Materia Seca (MS)	27
5.7.2. Materia orgánica (MO).....	27
5.7.3. Fibra detergente neutra (FDN).....	28
5.7.4. pH	28
5.7.5. Ácidos Grasos Volátiles (AGV)	28
5.7.6. Nitrógeno amoniacal (NH ₃)	28
5.7.7. Purinas.....	29
5.7.8. Determinación de minerales (Cr, Cu y Zn)	30
5.8. Determinación de la digestibilidad de nutrientes.....	32
VI. RESULTADOS.....	33
VII. DISCUSIÓN.....	38
VIII. CONCLUSIONES	44
IX. LITERATURA CITADA.....	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto del suplemento con cobre y zinc en las variables ruminales de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.	34
Cuadro 2. Efecto del suplemento de cobre y zinc en la digestibilidad ruminal y postruminal de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.	35
Cuadro 3. Efecto de suplemento de cobre y zinc en el flujo de componentes del alimento a duodeno de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.....	36
Cuadro 4. Efecto de suplemento de cobre y zinc en la digestibilidad total de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.	38

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE ZINC Y COBRE SUPLEMENTADOS EN UNA DIETA A BASE DE ALFALFA PARA BORREGOS

José Alfredo Pérez Gómez, MC

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes niveles de zinc y un nivel óptimo de cobre en una dieta basada en alfalfa henificada evaluada en borregos machos, con cruce de Rambouillet-criollo. Se utilizó un diseño en cuadro latino replicado, con tres periodos de evaluación y tres tratamientos (T) que fueron los siguientes: T1: 3 ppm de Cu y 0 ppm de Zn, T2: 3 ppm de Cu y 20 ppm de Zn y T3: 3 ppm de Cu y 40 ppm de Zn. Se evaluó la digestibilidad ruminal, el flujo duodenal, la digestibilidad total de la MS, MO, FDN y la utilización de compuestos nitrogenados. Asimismo, midió la absorción de zinc y cobre, el pH, N-amoniaco, la concentración de AGV (acético, propiónico, butírico) y la relación acético-propiónico) en líquido ruminal. No se observaron diferencias ($P>0.05$) atribuidas a un comportamiento similar entre tratamientos y donde el nivel único de Cu y los niveles de Zn en la dieta no afectaron el metabolismo ruminal, ni la absorción de los mismos minerales dentro del animal. La digestibilidad de la MS, MO, FDN, N, N microbiano, N amoniaco, eficiencia de N y Zn no presentó diferencias ($P>0.05$), solamente hubo un efecto cuadrático en la excreción de la MO. Esto se debe a que en concentraciones adecuadas de Cu y Zn en el rumen no interfieren en las actividades microbianas. Se registraron diferencias ($P<0.05$) de tipo lineal en el contenido de Zn en líquido ruminal atribuidas a la adición del mismo elemento; sin embargo, no se presentaron diferencias ($P>0.05$) en la absorción y el flujo a duodeno de las fracciones evaluadas. Un efecto lineal en Cu ($P<0.05$) fue observado en el mineral excretado y en la absorción total, el cual se atribuye al efecto en el incremento de Zn que provocó menor absorción del cobre por su efecto antagónico. La inclusión de cobre y zinc a las concentraciones evaluadas no afectó en la digestibilidad de nutrientes en general, ni la absorción total de los minerales evaluados.

Palabras clave: Cobre, zinc, absorción, borregos.

PHYSIOLOGICAL RESPONSE TO ZINC AND COPPER SUPPLEMENTED IN AN ALFALFA BASED DIET FOR RAMS

José Alfredo Pérez Gómez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate different levels of zinc and an optimum level of copper in a hay alfalfa based diet in Rambouillet-creole male sheep. A replicate Latin square design was used with three periods of evaluation and three treatments (T), which were as follows: T1: 3 ppm Cu and 0 ppm Zn; T2: 3 ppm Cu and 20 ppm Zn; and T3: 3 ppm Cu and 40 ppm Zn. Ruminal digestibility, duodenal flow, total digestibility of DM, OM, NDF, and use of nitrogen compounds were evaluated. Likewise, zinc and copper absorption, pH, ammonia-N, VFA (acetic, propionic, butyric, and the acetic-butyric ratio) in the ruminal liquid were measured. No differences ($P>0.05$) were observed, attributed to a similar behavior between treatments, where the only Cu level and the three Zn levels in the diet did not affect ruminal metabolism or the absorption of said minerals in the animal. The digestibility of DM, OM, NDF, N, microbial N, ammonia N, N efficiency, and Zn showed no differences ($P>0.05$), there was only increased fecal OM. This is because adequate concentrations of Cu and Zn in the rumen have no interference on microbial activity. There were lineal differences ($P<0.05$) in Zn content in the ruminal liquid attributed to its addition in the diet; however, there were no differences ($P>0.05$) in absorption and duodenal flow of the evaluated diet fractions. A lineal effect in Cu ($P<0.05$) was observed in the excreted mineral and in total absorption. This is attributed to the effect of adding Zn, which caused a lower absorption of copper given its antagonistic effect. Including copper and zinc in the evaluated concentrations did not affect nutrient digestibility, in general, nor total absorption of the evaluated minerals.

Key words: copper, zinc, absorption, sheep.

I. INTRODUCCIÓN

La producción pecuaria es una actividad primaria que satisface las necesidades de alimento y otros productos de origen animal a la sociedad. Dentro de los sistemas pecuarios se encuentra la producción ovina, que en la actualidad ha adquirido una importancia significativa en México.

La ovinocultura en México, depende en gran medida, de la utilización de los forrajes para obtener los nutrientes requeridos para mantenimiento, producción y reproducción. Sin embargo, en el país existen limitaciones climáticas y de suelo que imponen severas restricciones nutricionales a los animales que pastorean en ellos (Domínguez y Huerta, 2008).

El contenido mineral de las pasturas representa una limitante importante en los sistemas de producción de ovinos. El tipo de suelo, las deficientes prácticas de fertilización, la utilización de suplementos minerales de baja calidad y los aumentos de los requerimientos minerales en los animales determinan, en muchas explotaciones ovinas, deficiencias crónicas de minerales en los programas de alimentación.

Una deficiencia de zinc (bajos niveles en el suelo, las plantas y los animales) se ha reportado en la mayoría de los países latinoamericanos (McDowell *et al.*, 1983).

El zinc representa un mineral esencial que cumple diversas funciones en el organismo de los animales, ocasionando deficiencias o intoxicaciones, juega un rol importante en el crecimiento y la salud de todos los animales (NRC, 2007).

Los efectos de la deficiencia de zinc incluyen la reducción en el consumo de alimento, la tasa de crecimiento y la conversión alimenticia. Signos visuales de una deficiencia severa incluyen piel seca, escamosa y partida. En los casos de una deficiencia marginal de zinc, la función reproductiva de animales machos y hembras se ve afectada (NRC, 2007). Por otro lado, el cobre es un mineral esencial que cumple diversas funciones en el organismo de los animales, ocasionando deficiencias o intoxicaciones, frecuentes observadas en borregos (Quiroz y Bouda, 2001). En tales circunstancias, los animales presentan desde índices productivos y reproductivos bajos, hasta la aparición de síntomas de enfermedades y alta mortalidad (Quiroz y Bouda, 2001).

Por ello es importante el abastecimiento de fuentes minerales para evitar en la medida de lo posible, diferentes niveles de deficiencias en el corral y los rebaños en pastoreo permanente.

Por lo anterior, se propone la evaluación de cobre y zinc en una prueba de comportamiento fisiológico, que permita determinar el nivel óptimo de estos minerales, sin afectar su absorción y actividad debido a un posible antagonismo.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar el comportamiento fisiológico de borregos alimentados con alfalfa para la determinación de la absorción de cobre y zinc.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar diferentes niveles de zinc y un nivel óptimo de cobre en una dieta a base de alfalfa para borregos y su efecto en el pH y concentración de ácidos grasos volátiles en rumen.
- Cuantificar la absorción de zinc y cobre utilizando diferentes niveles de zinc y un nivel de cobre en la dieta de borregos.
- Realizar un balance de absorción de cobre y zinc considerando los niveles de estos minerales en rumen, líquido duodenal y heces de borregos alimentados con alfalfa y diferentes niveles de zinc y un nivel de cobre.

III. HIPÓTESIS

La adición a diferentes niveles de zinc y un nivel óptimo de cobre en la dieta de borregos permitirá cubrir los requerimientos de zinc de los animales sin afectar la interacción negativa del cobre.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Desnutrición mundial y en México

En el año 2007 se reporta que alrededor de 2 mil millones de personas en el mundo están anémicas (30% de la población mundial), e involucra alrededor del 50% de los niños y 50% de las mujeres embarazadas (Thurnham y Northrop-Clewes, 2007). Por otra parte alrededor de 13.5 % de la población mundial padece desnutrición (OMS, 2014), de estos, aproximadamente 2 millones de niños en México presentan anemia (Comisión de Desarrollo Social, 2014) Las causas de anemia incluyen deficiencias de hierro, cobre, zinc, ácido fólico, vitamina B12, riboflavina, vitamina A, vitamina E, selenio y parasitosis. La deficiencia de cobre es común en el mundo y a excepción del fósforo, el cobre es la principal limitante en zonas tropicales (Thompson, 2007; del Mar *et al.*, 2008).

Hill *et al.* (2000) dentro de la conferencia internacional acerca del zinc en la salud pública, se dio a conocer que el 49% de la población mundial tiene riesgos de consumir cantidades insuficientes de este mineral, con base al contenido de zinc de los alimentos incluidos en la dieta. En México, la deficiencia de zinc afecta del 22 al 34% de niños menores de 12 años, y 30% de las mujeres en edad reproductiva. Esta situación se manifiesta en México porque la dieta está basada en ingredientes con alto contenido de fitatos (los cuales son inhibidores de la absorción de minerales) como maíz y frijol (del Mar *et al.*, 2008).

La deficiencia de zinc se manifiesta en retraso del crecimiento de los niños y se manifiesta en menor estatura (Rivera y Sepúlveda, 2003), particularmente en la población rural del sur de México (40%) en comparación con la población urbana del norte (6%). Otros problemas asociados a la deficiencia de zinc incluyen problemas en la piel, mayor incidencia de enfermedades debido a inmunidad limitada e hipogonadismo (del Mar *et al.*, 2008).

4.2. Situación de la ovinocultura en México

El SIAP (2015) reporta en el 2013 una población ovina en México de 8,497,347 cabezas aproximadamente, de las cuales el estado de México contaba con 1,385,487 cabezas con una producción nacional anual de 113,342 t y de las cuales se destinan 57,980 t al consumo de carne. En meses pasados el estado de México realizó la importación de más de 35 mil cabezas ovinas de tipo F1 con un estado fisiológico de gestantes provenientes de Nueva Zelanda, para promover la actividad y tratar de cubrir una parte de la deficiencia en la producción ovina de este estado y del país (Montaño, 2015). Siendo el estado de México uno de los principales consumidores de carne de cordero en el país.

En México existen diferentes sistemas de producción ovina que cuenta con diferentes condiciones orográficas que da como resultado una gran diversidad en climas y esto se considera una condición afortunada desde el punto de vista de los factores de producción, en especial en los alimentos (Ensminger, 1976). En ovinos uno de estos sistemas corresponde al intensivo, el cual se ubica

principalmente en la zona centro del país y su principal objetivo es la producción de carne de calidad con alto rendimiento en canal y en el menor tiempo posible, en esta situación se encuentra el estado de México (Huerta, 2008). Sin embargo, la mayor parte de los corderos que se engordan en este estado, provienen de regiones donde se les pastorea en praderas que no reciben fertilización, orillas de caminos y pastizales de pobre calidad, como es sabido la mayor parte de estos animales se producen en el altiplano Mexicano y de las zonas tropicales de México donde se reportan suelos con deficiencias como Cu, Zn, Se, entre otros (Huerta, 2008).

4.3. Función e importancia de los minerales en los animales

La importancia de los minerales reside en que más del 50% de las enzimas con estructura conocida, requieren de algún de estos para su funcionamiento (Waldron *et al.*, 2009); los elementos traza son esenciales para la salud, crecimiento, producción y reproducción, además de ser esenciales para el funcionamiento de componentes en el sistema inmune (Álvarez, 2001; Mohd, 2013).

Los minerales existen en las células y tejidos del organismo animal en diversas combinaciones funcionales, químicas y en concentraciones características dependientes del elemento y tejido (Suttle, 2010).

Cada uno de los minerales esenciales realiza funciones de naturaleza física, química o biológica, de acuerdo con la forma o combinación química del mineral y su estado en los tejidos y fluidos orgánicos (Arteaga, 2014).

4.4. Perfil mineral en agua y forrajes

Los forrajes representan una de las principales fuentes de agua para los herbívoros y el ganado en pastoreo y satisfacen esta demanda principalmente por el agua obtenida de la humedad presente en estos (Sun *et al.*, 2014). Las necesidades de agua de los rumiantes se cubren de tres fuentes: agua de bebida, agua presente en alimentos y agua metabólica (Olkowski, 2009).

Beede (2005) menciona al agua como uno de los nutrientes más importante para todas las formas de vida y el NRC (2005) indicó que en alimentos de origen animal puede encontrarse minerales tóxicos provenientes del agua y presentes en los tejidos del animal, que más tarde son consumidos por los humanos. Es por eso que en la identificación de desbalances minerales, se debe considerar el análisis del contenido mineral en el agua (NRC, 2005).

En el agua se realizan reacciones bioquímicas del metabolismo en el organismo y funciona como solvente al transportar los nutrientes semisólidos de la ingesta hacia el tubo digestivo, para varios solutos en sangre, células dentro del cuerpo, y excreción de desechos; actúa como factor de control de temperatura corporal, debido a su alto calor específico, alto calor latente de evaporación y alta conductividad térmica (McDonald *et al.*, 2011).

Con este antecedente, es de importancia considerar el aporte de minerales en la formulación de dietas y el manejo de las deyecciones de los animales para evitar la contaminación del medio donde se establecen las explotaciones pecuarias (Castillo *et al.*, 2007).

El agua contiene varios solutos y partículas que influyen en su olor, sabor, propiedades físicas y química; los animales a menudo reaccionan a tales impurezas del agua disminuyendo la ingesta de ésta y del consumo de alimento, afectando la productividad animal (Wright, 2007). Está documentado que altos niveles de hierro y sulfato al unirse, evitan la absorción de cobre y zinc (Smart *et al.*, 1986), interfiriendo en la absorción de los minerales y conduciendo a deficiencias de estos. Otro problema común son los niveles excesivos de algunos minerales que interfieren con la absorción normal de otros elementos y conducen a deficiencias (Wright 2007).

Es importante identificar los efectos del agua sobre el rendimiento de los animales (producción, la reproducción y la salud), en especial la de aguas contaminadas con minerales, por el incremento en la problemática de nutrición mineral (Arteaga, 2014).

La concentración de minerales traza como Cu y Zn reportadas en la mayoría de los forraje son deficientes (97.4 y 82.5%, respectivamente). El bajo contenido de estos minerales repercute en la concentración sérica de los animales que consumen forrajes con esas deficiencias (Arteaga, 2014).

4.5. Características del cobre (Cu) y zinc (Zn)

El cobre es requerido para la síntesis de hemoglobina, absorción y la movilización de hierro en el organismo. El cobre es componente de varios sistemas enzimáticos que actúan en el sistema nervioso central, participa en el metabolismo del tejido óseo y tejido conectivo, en la síntesis de melanina y el

funcionamiento del músculo cardíaco (Balbuena *et al.*, 2003). También previene trastornos fisiológicos como anemias, falta de crecimiento, pelo o lana hirsuta y anormal, y ataxia neonatal provocados por la deficiencia del mineral (Nikolić *et al.*, 1983).

El cobre es un agente oxidante fuerte, se une a las proteínas en las células del hígado y se almacena en los lisosomas dentro de los hepatocitos. Este mineral permanece almacenado en lisosomas y no causa daño a los tejidos; sin embargo, puede ser liberado en momentos de estrés como en la esquila, ante fenómenos meteorológicos extremos o en el transporte de forma espontánea (Merwe, 2008).

El cobre es esencial para los procesos vitales como un cofactor para cuproenzimas vitales, pero es tóxico en exceso (Horn y Tumer, 1999; Mercer, 2001). Debido a esta doble función, todos los organismos han desarrollado mecanismos homeostáticos altamente especializados para reclutar, entregar y eliminar cobre, y neutralizar los efectos tóxicos. La investigación en los últimos años ha identificado numerosas proteínas implicadas en el metabolismo de cobre (metalotioneína como Cu-unión (MT), y recientemente cofactores y Cu ATP-ASAS), así como la base molecular de algunos trastornos genéticos humanos con cobre en particular (Mercer, 2001), pero los mecanismos de homeostasis del cobre siguen siendo poco entendidos. Varias especies de animales tienen marcada variación en su tolerancia a mayores niveles de cobre en la dieta (Howell y Gooneratne, 1987). Sin duda, las ovejas son los más susceptibles a la toxicidad crónica de cobre, y por esta razón su metabolismo hepático en ovejas ha sido ampliamente estudiado.

El zinc es componente esencial de un número importante de más de 300 enzimas, denominadas metaloenzimas (Valle y Auld, 1990; Pechin, 1999) y es activador de procesos relacionados al metabolismo de carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos; también se lo requiere en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune normal. En el caso de deficiencia de zinc, está comprobado que se disminuye la función inmune, sobre todo en ganado estresado, y en el aspecto reproductivo, los machos son más afectados en sus funciones (Bauer *et al.*, 2009).

El zinc participa en el metabolismo de los ácidos nucleicos, consecuentemente en la reproducción celular, por ello, forma parte importante de las células con mayor desgaste (piel, pelo, cuernos, pesuñas, cornea del ojo, mucosa del tracto digestivo, entre otras). Es componente indispensable en más de 100 enzimas. La utilización de aminoácidos en la síntesis de proteínas es incompleta cuando hay deficiencia de zinc (Villanueva, 2011).

Datos nos demuestran que mientras las plantas maduran, la digestibilidad mineral disminuye y consecuentemente, da una disminución de las concentraciones de cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc (Bauer *et al.*, 2009). También ocurren interacciones entre minerales a lo largo del paso en el sistema digestivo, el exceso dietario de uno o más minerales puede interferir en la utilización o función de otro mineral (Bauer *et al.*, 2009). En el cuerpo del rumiante ocurren muchas interacciones complejas y es muy difícil determinar con exactitud el requerimiento de un único mineral en un determinado momento fisiológico. Por otra parte, si podemos medir un mineral particular en la dieta, no quiere decir que

es el 100% aprovechable por el animal o absorbido al torrente sanguíneo. Generalmente en forrajes y granos, es importante y en el caso de Zn un 40 a 70 % y para Cu un 50 a 60 % será disponible para uso animal, estos datos estimados se basan en animales que se alimentan con raciones donde los minerales están en un rango típico de concentración (Bauer *et al.*, 2009).

4.6. Requerimientos de cobre (Cu)

Los requerimientos de cobre en ovinos varían de 4 a 15 ppm, dependiendo de la concentración de molibdeno y azufre (NRC, 2007). La concentración recomendada en la dieta es de 10 ppm, y es la concentración adecuada de cobre para mantener un 0.25% de azufre y 2 mg de Mo. Dietas con menos de 10 mg de Cu parecen cubrir los requerimientos del rebaño, y se ha observado que dietas concentradas poseen más cantidad de cobre que los forrajes; no obstante, los requerimientos de cobre podrían variar entre razas de la misma especie (Gutiérrez, 2007).

Los minerales traza reconocidos como esenciales en las dietas típicas de rumiantes y cuya concentración debe vigilarse para evitar deficiencias son: cobre, zinc, selenio, yodo, cobalto, manganeso, molibdeno y hierro (NRC, 2007). Cobalto en la forma de vitamina B12 está interrelacionado con el metabolismo del hierro y cobre en la hematopoyesis y, por tanto, indirectamente involucrado con molibdeno (Navarro, 1987). El metabolismo del cobre está influenciado por factores dietéticos como la inclusión de sulfato de azufre, molibdeno, zinc, nivel y fuente de proteína en la dieta (Olivares *et al.*, 2015). Debido a los factores que influyen en el metabolismo del cobre, es difícil determinar con precisión los requerimientos de

este mineral en la dieta y predecir niveles potencialmente tóxicos para rumiantes bajo diferentes programas de alimentación (Ammerman, 1969). El cobalto es menos tóxico que el cobre; las ovejas y los bovinos jóvenes son más susceptibles a la toxicidad por cobre que el ganado adulto, y pueden sufrir envenenamiento, aun cuando los niveles de cobre en la dieta se considera en el rango normal (Ammerman, 1969) Varias formas de cobalto suplementario y cobre son eficaces en asegurar la adecuada ingesta diaria en condiciones de deficiencia (Ammerman, 1969).

4.7. Requerimientos de zinc (Zn)

Los requerimientos de Zn de los ovinos, no están definidos con precisión (ARC, 1980), se recomienda entre 20 y 40 ppm de Zn en la dieta e incorporar 0.5% de Zn en las mezclas minerales, especialmente en regiones tropicales y subtropicales (McDowell *et al.*, 1993), cantidad suficiente para corregir cualquier probable deficiencia marginal.

Las formas de suplementar zinc son varias, como por ejemplo incorporar en la ración o en las mezclas minerales, algunas de las sales como óxido de zinc (OZn), sulfato, cloruro o carbonatos o una sustancia orgánica: meticona –zinc (Pal *et al.*, 2010).

4.8. Fisiología y metabolismo del cobre (Cu)

Se ha demostrado que las ovejas tienen una capacidad limitada para acumular Cu unido al MT en el hígado (Howell y Gooneratne, 1987; Bremner y Beattie, 1995), y una capacidad muy limitada para aumentar la excreción biliar de Cu en respuesta a un aumento en la ingesta de este mineral (Bremner, 1998).

Estudios de distribución subcelular hepáticas han demostrado que los gránulomas (que contiene lisosoma) de una fracción de células hepáticas en ovejas no responden a grandes dosis de Cu como sucede en otras especies, y sólo puede estar saturado con cargas bajas del elemento (Corbett *et al.*, 1978; López *et al.*, 2004), dando lugar a concentraciones tóxicas de Cu en el núcleo y el citosol en exposiciones más bajas del mineral que son tóxicos para otras especies animales. Los informes de intoxicación con Cu eran hasta hace poco algo raro.

Se han reportado episodios de toxicidad con Cu a concentraciones por debajo de los considerados como tóxicos en la literatura (Bidewell *et al.*, 2000; VLA, 2001). En la mayoría de los casos, la toxicidad en el ganado está asociado con la ingesta excesiva de Cu en la ración (Galey *et al.*, 1991; Livesey, 2002), aunque los episodios de toxicidad crónica de Cu también se ha observado en ganado alimentado con concentraciones dentro de niveles normal (Bradley, 1993). Se ha observado en el ganado suplementado con dietas que conducen a la acumulación de Cu en el hígado, que a concentraciones ligeramente más altos (alrededor de 125 mg kg^{-1} de peso húmedo) registraron efectos negativos en el rendimiento de los animales, al reducir de la ingesta de alimento y la ganancia peso (Engle y Spears, 2000).

La comprensión de la homeostasis del Cu en el ganado vacuno es cada vez más importante, ya que este metal puede estar implicado en la patogénesis de ciertos trastornos neurológicos y las enfermedades priónicas (Hanlon *et al.*, 2002; Mercer, 2001). Estudios previos con concentraciones de Cu por encima de los niveles normales indica que los bovinos y ovinos tienen capacidad limitada para acumular Cu-MT (Metalotioneína) en el hígado (López-Alonso *et al.*, 2004). La

excreción biliar de Cu en el ganado depende de la cantidad de este elemento ligado a MT como en el ganado ovino (Saylor y Leach, 1980), esto sugiere que, con los niveles más altos de exposición de Cu, que afecten al ganado, la capacidad de los lisosomas para secuestrar al elemento para la excreción en la bilis puede estar cerca de la saturación y los animales podrían estar en riesgo de toxicidad.

En los rumiantes, la absorción del cobre es baja (1.0 a 10%), este efecto es atribuido a la formación de complejos en el rumen (Spears, 2003). La disponibilidad del cobre en rumiantes depende de la cantidad de cobre consumida en la dieta, además de estar condicionada por variaciones en la microflora del rumen; otros factores que influyen en su absorción y aprovechamiento son la raza y edad del animal, la composición del suelo, composición de la ración, así como las variaciones en la absorción intestinal (Nederbragt *et al.*, 1984).

La absorción del cobre en el ganado se realiza en el duodeno, yeyuno y en menor proporción en íleon; mientras que en ovinos la mayor absorción ocurre en el intestino grueso. El cobre es absorbido por transporte activo (mecanismo saturable) y por difusión simple (mecanismo insaturable) (Chicco y Godoy, 2005). El paso del cobre a través del enterocito es por transporte activo y se ve influenciado por aminoácidos, ácido ascórbico y otros factores de la dieta; una vez que se encuentra dentro de las células de la mucosa, aproximadamente el 80% del cobre absorbido se liga y regula por concentraciones de metalotiónina (Baker y Amermann, 1995). Estas proteínas son de bajo peso molecular e intervienen en muchas funciones incluyendo la homeostasis, el almacenamiento, el transporte y

la desintoxicación de metales. Tras el paso por los enterocitos, el cobre entra en la circulación, se une a proteínas, péptidos o aminoácidos para su transporte al hígado y en menor proporción, al riñón (Fuentealba y Aburto, 2003).

La absorción intestinal máxima del cobre oscila entre 30 y 60%, y es un elemento esencial para la formación de hemoglobina (Prohaska, 1991).

4.9. Fisiología y metabolismo del zinc (Zn)

De la cantidad ingerida de Zn en ovinos, sólo se absorbe del 5 al 40%, una tercera parte en abomaso y el resto en intestino delgado; después es transportado al hígado en donde se metaboliza, se almacena por saturación intracelular; primero en músculos, después en hígado, páncreas y riñón, y es excretado principalmente por las secreciones del páncreas, en heces, y en el sudor (Villanueva, 2011).

Se sabe que afecta el crecimiento, la reproducción y el sistema inmunológico de los animales influyendo en la actividad enzimática y la expresión de genes de proteínas (Chesters, 1997) o por su influencia en las hormonas, la transducción de señales mitogénicas, la transcripción de genes y la síntesis de ARN (MacDonald, 2000). Un nivel de 33 mg de Zn kg^{-1} de materia seca es recomendable en la dieta para corderos en crecimiento (NRC, 1985) y también para los terneros (NRC, 2001). Sin embargo, Spears y Kegley (2002) observaron mejoras en el crecimiento de terneros suplementados con 25 mg Zn kg^{-1} MS, a través de una dieta basal que contiene 33 mg Zn kg^{-1} MS. Las principales fuentes de Zn en los suplementos minerales formulados para la alimentación animal han

sido sus sales inorgánicas, como sulfato de Zn (ZnSO_4), óxido de Zn (ZnO), cloruro de Zn (ZnCl_2), etc. (Garg *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos estudios muestran que el Zn complementado a través de fuentes orgánicas propicia mayor retención (Lardy *et al.*, 1992) y las concentraciones de tejido (Cao *et al.*, 2000) en relación con una fuente inorgánica (ZnSO_4 o ZnO). Hempe y Cousins (1989) reportaron que complejo Zn-metionina es transportado intacto a partir de la luz intestinal en las células de las mucosas, aumentar el suministro de tejido de Zn y mejorar así la productividad animal.

El porcentaje de zinc en la dieta que se absorbe disminuye a medida que el zinc aumenta en la dieta de rumiantes (Miller, 1970). Los requerimientos de zinc en rumiantes son afectados por factores de la dieta, sobre la base de la respuesta de los animales de variables que se observaron después de la administración de suplementos. Sin embargo, los factores de la dieta que afectan la biodisponibilidad del zinc en los rumiantes no están claramente definidos. El fitato puede ser degradado por la fitasa microbiana en el rumen y la adición de fitato a las dietas de corderos con rumen funcional no reduce el estado de zinc (Ott *et al.*, 1964). Niveles altos de calcio en la dieta reduce niveles séricos de zinc en rumiantes (Perry *et al.*, 1968; Pond y Wallace, 1986), pero la dieta elevada en calcio no aumentó requerimientos de zinc en los corderos (Pond, 1983; Pond y Wallace, 1986). La porción relativamente alta de zinc en los forrajes está asociada con la pared celular (Whitehead *et al.*, 1985), pero no se sabe si la asociación de zinc con la fibra reduce la absorción del mineral. El aprovechamiento de zinc de algunas fuentes orgánicas parece ser mayor que el inorgánico cuando se complementa con alto concentraciones. Corderos suplementados con 360 mg de

zinc kg^{-1} de MS de la dieta de lisina zinc tenían concentraciones mucho más altas de zinc en riñón, hígado y páncreas de corderos que recibieron sulfato de zinc, óxido de zinc o de zinc-metionina (Roja *et al.*, 1995). En hígado y plasma, las concentraciones fueron más altas en los terneros suplementados con 300 mg de zinc kg^{-1} en la dieta, al usar una combinación de lisina y metionina de zinc, en comparación con terneros suplementados con óxido de zinc (Kincaid *et al.*, 1997). Concentraciones tisulares de zinc más altas se observan en los terneros (Wright y Spear, 2001) y corderos (Cao *et al.*, 2000) alimentados con concentraciones elevadas de proteinato de zinc, en relación con las observadas en animales suplementados con sulfato de zinc.

Altos niveles de zinc en la dieta se relacionan con incrementos en la retención de zinc en órganos. Los aumentos lineales que se produce en la mayoría de tejidos sugieren que el zinc adicional se acumula, si los niveles dietéticos fueran mayores (Ott *et al.*, 1966). Sin embargo, niveles séricos de zinc fueron basales y esto sugiere que la absorción del 20% determinada en bovinos por Miller y Cragle (1965) no puede ocurrir en el intervalo de los niveles normales de zinc en la dieta. Esto podría explicarse por la reducción de la digestibilidad y que está altamente correlacionado con la absorción de zinc (Miller y Cragle, 1965).

4.10. Interacción entre cobre (Cu) y zinc (Zn)

La carencia de Cu y Zn en bovinos provoca atrofia del bazo y del timo, linfopenia, especialmente de los linfocitos B, monocitosis y disminución de la

capacidad fagocítica y lítica de los neutrófilos, afecta a las células T y B, los neutrófilos y los macrófagos y la producción de anticuerpos (Cerone *et al.*, 2000).

Durante la hipocuprosis disminuye la actividad de enzimas cúpricas dependientes como la citocromo oxidasa, necesaria para la actividad fagocítica y de la superóxido dismutasa (SOD), por lo que se reduce la vida media de los leucocitos y causa predisposición a enfermedades infecciosas y virales afectándose el sistema inmunológico del animal (Spears, 2003). El Zinc y el Cobre forman parte de enzimas responsables de la integridad de un tejido cutáneo, previene la presencia de paraqueratosis, mejoran la resistencia y elasticidad de la piel y aumentan el índice de protección del tejido dérmico en general.

Chicco y Godoy (2005) señalan al cobre como un micromineral con más antagonistas que otros microelementos, entre los principales están el molibdeno, zinc y calcio. Mientras Pott *et al.* (1999) mencionan que la acción antagónica del molibdeno con el cobre se ve potenciada cuando la concentración de azufre también es mayor. Se cree que reacciona con tiomolibdatos en el rumen formando compuestos insolubles de poca absorción, ya que éstos están relacionados con el cobre, uniéndose a la albúmina plasmática y formando un compuesto que es indisponible para funciones bioquímicas (Bauer *et al.*, 2009). También inhibe algunas enzimas cobre dependientes. El azufre reduce la absorción de cobre por la formación de sulfuro de cobre en el rumen. Altas concentraciones de hierro y zinc también reducen el uso de cobre (Bauer *et al.*, 2009). Además, altas concentraciones dietarias de molibdeno y concentraciones medias de azufre, reducen la absorción de cobre, lo que ocurre principalmente debido a la formación de tiomolibdatos en el rumen (Bauer *et al.*, 2009). En presencia de azufre y

ausencia de molibdeno, hay una inhibición en la absorción de cobre debido a la formación de sulfidos de cobre (Sprinkle *et al.*, 2006). La presencia de sulfatos en el agua consumida por el animal reduce la absorción de cobre. Por su parte, el hierro es otro elemento que interfiere con la absorción del cobre; en este sentido Baker y Ammerman (1995) y Spears *et al.* (2004) reportaron que los animales consumen hierro a través del agua, suelo o alimentos como se menciona con anterioridad (Beede, 2005; Wright, 2007).

4.11. Toxicidad de cobre (Cu)

Estudios realizados en Estados Unidos reportaron casos de toxicidad por cobre en ovinos resultando en animales enfermos y muertos. Muchos de estos casos, donde los niveles tóxicos del cobre son mayores a 25 ppm se han determinado en tejidos. En el animal los signos comunes son ictericia, orina con coloración rojiza o marrón, anorexia, palidez, debilidad y postración (Jones y Merwe, 2008). Sangre café o suero de color rosa puede observarse en la recopilación y procesamiento de sangre; anemia y, en algunos casos, la evidencia de regeneración de las células rojas de la sangre, estarán presente y donde se espera aumentos en los niveles de creatinina en animales con afecciones renales (Jones y Merwe, 2008). Lesión hepatocelular y oclusión del conducto biliar se producen con la liberación de cobre. Además el incremento de las enzimas AST y GGT (Aspartato aminotransferasa y Gamma-glutamil transpeptidasa) se observan alrededor de nueve semanas antes del desarrollo de los signos clínicos (Jones y Merwe, 2008).

Existen dos formas de toxicidad por cobre; aguda y crónica; la aguda, es el resultado de la ingestión de alimentos altos en este elemento, sales de cobre, pesticidas, cama de pollos y otras sustancias elevadas en cobre, pudiendo ocurrir en la ingesta de 20 a 100 mg kg⁻¹ en ovejas y terneros jóvenes, y en bovinos adultos de 200 a 800 mg kg⁻¹ (Jones y Merwe, 2008). La toxicidad crónica ocurre cuando los altos niveles se ingieren durante un período de tiempo considerable, pero a dosis por debajo del nivel tóxico agudo (Jones y Merwe, 2008).

En las ovejas la susceptibilidad a la toxicidad crónica de cobre, se debe a que las células del hígado tienen una alta afinidad por este componente, el cual se excreta en la bilis a una velocidad muy baja, lo que lleva a una acumulación de su concentración en el hígado con el tiempo (Todd, 1969). Una de las causas más comunes de toxicidad en ovejas es la alimentación accidental con productos destinados a otros animales (Jones y Merwe, 2008). El molibdeno reduce la acumulación de cobre en el hígado (Pott *et al.*, 1999). La proporción de cobre: molibdeno en la alimentación es un factor importante para determinar el riesgo de intoxicación por cobre (Pott *et al.*, 1999). La toxicidad de cobre crónica implica la ingestión de alimentos que tienen alto contenido de cobre: relación de molibdeno. Cualquier alimento con concentraciones mayores de 25 ppm y una relación de molibdeno de mayor de 10: 1 se considera potencialmente tóxica para ovinos (Jones y Merwe, 2008).

La intoxicación crónica de cobre es a menudo descrita como una enfermedad relacionada con el estrés. Cuando el cobre entra en la sangre la elevación de los niveles de cobre de glóbulos rojos aumenta 15-20 veces, mientras que los niveles de cobre en plasma sólo aumentan 2-3 veces (Jones y

Merwe, 2008). Esto causa la lesión oxidativa a la hemoglobina, al inducir la formación de cuerpos de Heinz y su conversión a metahemoglobina, la cual no se puede unir O₂ o el CO₂. Los grupos sulfhídrico de la membrana de glóbulos rojos también se someten a cambio oxidativo, dando como resultado hemólisis y anemia significativa. Por último, esta liberación masiva de hemoglobina puede resultar en nefrosis hemoglobinuria e insuficiencia renal (Winge y Mehra, 1990).

Los cerdos son los menos susceptibles a la intoxicación por cobre, sus raciones a menudo contienen cobre añadido (125-250 ppm) en cantidades que, de ser consumido por los ovinos, pueden causar envenenamiento agudo por cobre (Winge y Mehra, 1990). El cobre que se ingiere se almacena en el hígado del animal y si se repitió la ingestión de pequeñas cantidades de cobre encima de las necesidades del animal puede causar acumulación de lo que finalmente se convierte en una cantidad tóxica de cobre para el animal (Winge y Mehra, 1990).

La intoxicación crónica por cobre según Ammerman (1969) se divide en dos fases las cuales son:

1. Período de acumulación pasiva. Donde el cobre se fija lentamente en los tejidos (principalmente el hígado) durante el cual no se observa ningún síntoma de toxicidad.
2. Fase toxica, es una enfermedad aguda, normalmente se denomina la "crisis hemolítica", puede causar la muerte en pocas horas, pero de forma más general, resulta en muertes en 2 a 4 días. Ictericia, metahemoglobina y hemoglobinuria son evidentes durante esta fase. Dentro de esta fase, podemos encontrar otras dos fases: en la primera, hay una elevación

transitoria en cobre de glóbulos rojos. En la segunda, el nivel de cobre en la sangre entera duplica de los aumentos en el cobre de glóbulos rojos. En el caso del plasma cambió el color en presencia de bilirrubina, y hubo una reducción en el hematocrito. El exceso de cobre en $190\text{g } 100\text{ mL}^{-1}$ en la sangre durante la "crisis hemolítica" apareció en plasma al reaccionar con cobre y más tarde en las células rojas de la sangre.

El efecto tóxico agudo de cobre es considerado la causa inmediata de la muerte de algunos animales, con anemia y uremia considerado como factores que contribuyen a la muerte de otros (Todd y Thompson, 1963). Se ha informado de la distrofia y cirrosis del hígado y los niveles de cobre en el hígado a muerte entre 898 y 2091 ppm en una base de tejido seco (Weiss y Baur, 1968).

4.12. Intoxicación de zinc (Zn)

Los rumiantes tienen menos tolerancia a la alta ingesta de zinc que los no rumiantes. A niveles altos, la fermentación ruminal es perturbada y la producción ruminal de ácidos grasos volátiles y relación acético: propiónico se reducen (Ott *et al.*, 1966). El nivel máximo tolerable para el ganado ovino es de 300 mg Zn kg^{-1} de materia seca (NRC, 2005). Del mismo modo la tolerancia a la intoxicación depende de la presencia de Ca, P, Mg, Cu, Fe, Al, Cd y Pb, con los cuales el Zn interacciona en el proceso de absorción y utilización, por lo tanto el exceso de alguno(s) de estos minerales puede producir también una deficiencia de Zn (Villanueva, 2011).

La ingestión de niveles tóxicos de zinc ha demostrado que interfiere con el cobre y el metabolismo del hierro en los animales no rumiantes (Cox y Harris, 1960; Magee y Matrone, 1960) y corderos (Ott *et al.*, 1966), lo que resulta en anemia por los altos niveles acumulados de zinc en la sangre y el tejido. Estas alteraciones metabólicas resultan en la reducción del consumo de alimento y eficiencia alimenticia, efectos observados en la alimentación de ganado que consumían altos niveles de zinc (Ott *et al.*, 1966).

Se ha demostrado que los niveles de zinc en el páncreas, hígado, riñón, bazo y médula aumentan proporcionalmente con niveles de este elemento en la dieta (Cox y Harris, 1960) con una posterior reducción en la calcificación ósea y la actividad enzimática en los tejidos (Sadasivan, 1951; Van Reen y Pearson, 1953).

Menor tolerancia de los rumiantes al alto contenido de Zn dietético podría estar relacionada con cambios en el metabolismo ruminal originados por un efecto tóxico del zinc en la microflora (Ott, 1966). Puesto que la anemia producida por un exceso de Zn se previene por la administración de Cu y Fe, se ha sugerido que la anemia es una deficiencia inducida por Cu y Fe como resultado de la interferencia de la absorción de estos elementos en el conducto gastrointestinal en presencia de un nivel alto de Zn (Church *et al.*, 2010).

Muchos factores influyen en la toxicidad del Zn; las deficiencias de Pb y de Cu dietéticos, la ingestión de Se inferior a los niveles mínimos necesarios y la baja captación de Ca la aceleran, en tanto que las proteínas de la soya al parecer protegen contra un exceso de Zn en comparación con la caseína, quizá a causa de su contenido de fitatos (Church *et al.*, 2010).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de estudio

El experimento se realizó en la unidad metabólica de la granja experimental del Programa de Ganadería, Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, Campus Motecillos, ubicado en el km 36.5 de la carretera México- Texcoco, en Montecillos, Texcoco, estado de México.

5.2. Animales y periodo experimental

Se utilizaron seis borregos de cruce criollo x Rambouillet, sin castrar, con peso vivo inicial de 49.19 ± 4.03 kg y 1.5 años de edad en promedio. Todos los animales se fistularon en rumen e intestino delgado (duodeno). El estudio tuvo una duración de 60 días, previa adaptación a la dieta de 18 días y 42 días de aplicación de los tratamientos.

5.3. Alimentación

La alimentación fue restringida y se ofreció dos veces al día, aportando en cada ocasión $0.6 \text{ kg animal}^{-1}$ de alfalfa henificada molida con un tamaño de partícula de 2 cm. Se utilizó este forraje debido al aporte de la cantidad necesaria de cobre (8ppm) y zinc (20ppm) para ovinos establecida en las tablas de requerimientos nutricionales publicados por el NRC (2007).

5.4. Tratamientos experimentales

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos con dos animales en cada uno. Cada grupo recibió, en periodos distintos, cada uno de los tres tratamientos evaluados. Los tratamientos (T) fueron: T1= dieta base con 3 ppm de cobre y 0 ppm de zinc; T2= dieta base con 3 ppm de cobre y 20 ppm de zinc; T3= dieta base con 3 ppm de cobre y 40 ppm de zinc. La dieta base consistió en alfalfa henificada molida. El cobre y en zinc se administraron dos veces al día, por infusión intraruminal a través de la cánula, después de ofrecido el alimento (50% en cada alimentación).

Las soluciones utilizadas para suministrar las fuentes de cobre y zinc fueron las siguientes. Se utilizó un estándar de cobre (1000 ppm) en forma de sulfato de cobre (CuSO_4 PM=249, Sigma[®]) del cual se tomaron 3 mL con una jeringa (10 mL) y se dosificaron vía intraruminal a través de la cánula. Para el aporte de zinc se utilizó ZnSO_4 con una pureza de grado farmacéutico de 99.99%, el cual se diluyó en una proporción de $0.0009881 \text{ kg L}^{-1}$ de agua desionizada. A partir de esta solución se tomaron 0, 25 y 50 mL para aportar 0, 20 y 40 ppm, respectivamente, de acuerdo a cada tratamiento. El aporte de este mineral a los animales se realizó de forma similar al de cobre.

5.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en Cuadro Latino replicado. El modelo fue el siguiente:

$$Y_{ij(k)} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ij(k)}$$

donde,

* Y_{ij} es el resultado del bloque i -ésimo, $i = 1, \dots, K$ del factor bloque $B\alpha$ y del bloque j -ésimo, $j = 1, \dots, J$ del factor-bloque $B\beta$, y del nivel k -ésimo del factor $F\gamma$. Se denota la k entre paréntesis para indicar que este índice no se elige sino que viene condicionado por el par ij .

* μ es el efecto global que mide el nivel medio de todos los resultados,

* α_i es el efecto (positivo o negativo) sobre la media global debido al bloque i de $B\alpha$. Se verifica que $\sum_{i=1}^K \alpha_i = 0$,

* β_j es el efecto (positivo o negativo) sobre la media global debido al bloque j de $B\beta$. Se verifica que $\sum_{j=1}^J \beta_j = 0$,

* γ_k es el efecto (positivo o negativo) sobre la media global debido al nivel k del factor $F\gamma$. Se verifica que $\sum_{k=1}^K \gamma_k = 0$,

* ε_{ij} es el error experimental, son variables aleatorias i.i.d. con distribución N

El análisis estadístico se realizó con la prueba de polinomios ortogonales, calculando los efectos lineal y cuadrático, utilizando el programa estadístico SAS (2002).

5.6. Análisis de laboratorio

Durante los tres periodos experimentales se recolectaron muestras de líquido ruminal y contenido duodenal a través de las cánulas respectivas, y muestras de heces. Las muestras de líquido ruminal (250 mL) se tomaron el día 14 de cada periodo experimental, y después de medir el pH, se filtraron y se congelaron hasta su análisis. Las muestras de contenido duodenal (150 mL) se recolectaron durante los días 11 al 14 de cada periodo experimental, se mezclaron para obtener una muestra compuesta y se congelaron para su posterior análisis. Adicionalmente, se tomaron muestra de heces vía rectal durante los días 11 al 14 de cada periodo experimental, las cuales se mezclaron.

5.7. Variables evaluadas

5.7.1. Materia Seca (MS)

Se determinó en las muestras de alfalfa, en contenido ruminal, duodenal y en heces con base a la técnica descrita por la AOAC (1990).

5.7.2. Materia orgánica (MO)

Se determinó en las muestras de alfalfa, en contenido ruminal, duodenal y en heces con base a la técnica descrita por la AOAC (1990).

5.7.3. Fibra detergente neutra (FDN)

Se determinó en las muestras de alfalfa, en contenido ruminal, duodenal y en heces con base a la técnica descrita por Van Soest (1969).

5.7.4. pH

Se determinó en líquido ruminal directamente, con un potenciómetro marca ORION, modelo 250^a, calibrado a pH 4 y 7.

5.7.5. Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

La concentración de AGV se determinó en muestras de líquido ruminal; de la muestra filtrada, se tomaron 4 mL, se mezclaron con 1 mL de ácido metafosfórico al 25% y se almacenó a 4 °C hasta su análisis. La determinación de AGV se realizó por cromatografía de acuerdo al método establecido en el Laboratorio de Microbiología Ruminal, en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, Modelo Clarus 500 con columna capilar Elite FFAP, utilizando hidrógeno como gas acarreador.

5.7.6. Nitrógeno amoniacal (NH₃)

Se determinó en el contenido ruminal con base al método propuesto por McCullough (1967). Se colocaron 4 mL de líquido ruminal medio de cultivo en tubos de ensaye de 13 X 100 mm, se agregó 1 mL de ácido metafosfórico (solución al 25%), la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Del sobrenadante se tomaron 20 µL y se depositaron en tubos de 10 mL, a los cuales se les adicionó 1 mL de fenol, 1 mL de hipoclorito de sodio, con NaOH (5 g de NaOH y 10 mL de hipoclorito de sodio), se incubó a 37 °C en baño maría durante 30 min y se les agregaron 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron leídas a 630 nm, en un espectrofotómetro Cary 1-E, UV-visible, Marca Varían.

5.7.7. Purinas

Se determinó en líquido duodenal del residuos remanentes de cada vial, por cada tratamiento se unieron para crear una mezcla compuesta; de los cuales se colectó 0.5 g y se colocaron en tubos con tapa de rosca por triplicado y en otro tubo se agregó 0.5 g del RNA para crear la curva estándar. Posteriormente se les añadieron 2.5 mL de ácido perclórico agitando con un vórtex, después se les colocó en baño María a 90 °C durante 60 minutos, agitando con un vórtex cada 8 minutos; inmediatamente se sacaron los tubos y se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos sin dejar de agitar, luego se añadieron 17.5 mL de fosfato de amonio al 0.0285 M y se colocaron nuevamente en baño María (90 °C) durante 15 minutos, después se sacaron y agitando en vórtex y se colocaron en un vibrador ultrasónico por 15 min a 90 °C, pasado el tiempo se filtró con papel filtro del No. 2 aproximadamente 1.5 mL. De este filtrado se tomó 0.5 mL, se depositaron en tubos para centrifuga, se agregó 0.5 mL de nitrato de plata al 0.4 M y 9 mL de fosfato de amonio al 0.2 M; finalmente los tubos se taparon y se refrigeraron a 4 °C durante 24 horas.

Pasadas las 24 hora de refrigeración, los tubos que contenían las muestras se centrifugaron a 3500 g durante 20 min a 5 °C, pasado el tiempo se decantó el líquido, evitando derramar el pellet, posteriormente se añadieron 10 mL a cada tubo de una mezcla elaborada con 0.0271 mL de ácido sulfhídrico al 0.01 N, 25 mL de nitrato de plata al 0.4 M y aforado a 2 L, con un pH ajustado a 2; posteriormente se agitó con vórtex, se volvió a centrifugar a 3500 g durante 30 minutos a 0 °C, se decantó el líquido y se agregaron 10 mL de ácido clorhídrico 0.5 N; las muestras se taparon y se agitaron hasta deshacer el pellet. Después, los

tubos se taparon con canicas y se colocaron a baño María a 90 °C durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se aspiraron los residuos flotantes en cada tubo y después se centrifugo a 3500 g durante 10 minutos a 21 °C. Las muestras con el RNA se diluyeron a 0.24, 0.5 y 0.75 mL en tubos de ensayo y se aforaron a 10 mL con ácido clorhídrico 0.5 N. Para realizar la lectura del contenido de purinas fue en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS, USA) se ajustó a cero con ácido clorhídrico y se calibró la curva con las diluciones del RNA; finalmente se leyeron las muestras a 260 nm.

5.7.8. Determinación de minerales (Cr, Cu y Zn)

Se determinó el contenido de cromo, cobre y zinc en alfalfa, contenido duodenal y heces.

5.7.8.1. Determinación de cromo (Cr)

Diez días después de cada periodo experimental finalizado, los compuestos del líquido duodenal se descongelaron y se depositaron en un refractario, se secaron por 72 horas a una temperatura de 60 °C. Al término del secado se molieron las muestras y se depositaron en frascos de vidrio de 100 mL con tapas de rosca y se identificaron perfectamente. Las muestras de materia fecal de cada cordero también se descongelaron, terminados los días de muestreo, se obtiene de cada bolsa una muestra homogénea de 100g, se secan a la misma temperatura que las muestras de líquido duodenal y se almacenaron en frascos de plástico.

Se pesaron 0.5 g de muestra en un crisol y se metió a la mufla a 600 °C esto se realizó subiendo la temperatura cronológicamente con la duración de 12

horas. Terminado este tiempo se sacaron las muestras de la mufla y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 3 mL de solución de ácido fosfórico-sulfato de manganeso y 4 mL de la solución de bromato de potasio. Posteriormente son colocados en una platina precalentada y se digieren las cenizas hasta la efervescencia de la solución, se dejaron enfriar los crisoles con la muestra y se diluyeron con agua desionizada, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL. Se añadió 10mL de la solución de cloruro de calcio de 5000 ppm a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con la dilución de las muestra aforando con agua desionizada y mezclando vigorosamente. Posteriormente se dejó reposar esta solución durante toda la noche con el objetivo que el material en suspensión se deposite en el fondo. Por último se tomaron las lecturas para la determinación del cromo al espectrofotómetro de absorción atómica SpectrAA 220 FS (Fast Sequential) VARIAN por flama.

5.7.8.2. Determinación de cobre (Cu) y zinc (Zn)

Se determinó las concentraciones de cobre y zinc a partir de las muestras secadas y molidas, conservadas de duodeno y heces.

Del mismo modo se terminó la concentración de los mismos elementos a partir de líquido ruminal, donde se tomó 5 mL de muestra se le adiciono 2 mL de ácido nítrico concentrado se colocó en bloque a 210 °C esta temperatura se fue incrementando gradualmente de 30 en 30 °C, llegado a esta temperatura se dejó reducir el volumen a aproximadamente 4 mL el digestado y nuevamente se adiciono 2 mL de ácido nítrico concentrado y se dejó reducir a 4 mL el digestado por último se adicionó 2 mL de ácido perclórico concentrado y se dejó reducir a un volumen de 1 mL además se dejó esperar hasta que desaparecieran todos los

vapores pardos o cafés y apareciera una condensación o vapores transparentes o blancos.

Por último para la determinación de cobre y zinc en líquido ruminal y muestras secas de duodeno y heces se procedió a la medición de la concentración de estos minerales en el espectrofotómetro de absorción atómica SpectrAA 220 FS (Fast Sequential) VARIAN por flama.

Procedimiento para la preparación de la curva.

Estándar de cobre de 1000 ppm. Se disuelven 1.0000 g de Cu metálico en una cantidad mínima de HNO₃ concentrado y 5 mL de HCl. Se evapora casi a sequedad y se diluye a 1 L con agua desionizada.

Estándar de zinc de 1000 ppm. Se disuelve 1.0000 g de Zn metálico puro, con 5 o 10 mL de HCl concentrado. Se evapora casi a sequedad y se diluye a 1 L con agua desionizada.

5.8. Determinación de la digestibilidad de nutrientes

La digestibilidad *in vivo* se determinó mediante la recolección parcial de contenido ruminal, duodenal y heces, para ello se utilizó óxido de cromo (Cr₂O₃) indicador externo al 0.4% de la dieta total (Fenton y Fenton, 1979), el cual se suministró vía cánula ruminal.

La digestibilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = \frac{\text{Nutriente consumido (g)} - \text{flujo de nutriente (g)}}{\text{Nutriente consumido (g)}} \times 100$$

El flujo de nutrientes se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Flujo de nutriente g/d} = \frac{\text{Nutriente consumido en BS (g d}^{-1}) \times \text{Indicador (\%)}}{\text{Indicador (\%) en contenido intestinal o heces}}$$

(Bondi, 1987)

VI. RESULTADOS

Los animales consumieron el total de alimento ofrecido 1.1kg de MS animal⁻¹ día⁻¹.

El Cuadro 1 presenta los resultados de los análisis de pH, nitrógeno amoniacal (NH₃) y ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de borregos alimentados con alfalfa y suplementados con zinc y cobre. No se presentaron diferencias (P>0.05) en las variables evaluadas, asociadas al nivel único de cobre y los diferentes niveles de zinc, ; sin embargo, existió una tendencia de tener un menor comportamiento biológico en el tratamiento con 10 ppm de Cu y 40 ppm de Zn adicionado.

Cuadro 1. Efecto del suplemento con cobre y zinc en las variables ruminales de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.

Variable	Cu-Zn, mg d ⁻¹			SEM	P =	
	3-0	3-20	3-40		Linear	Cuadrático
pH	6.59	6.68	6.45	0.20	0.2600	0.1356
N- amoniacal	20.42	16.81	18.27	3.91	0.3570	0.2152
Variable ruminales						
AGV totales	113.02	105.94	109.97	26.09	0.8425	0.6762
AGV mol 100 moles ⁻¹						
Acético	73.22	73.24	73.15	1.45	0.9309	0.9396
Propiónico	17.84	17.76	17.87	1.29	0.9679	0.8790
Butírico	8.92	8.99	8.96	0.55	0.8948	0.8761
Ac:Pr	4.12	4.14	4.11	0.38	0.9434	0.8922
Concentración iónica de cobre y zinc µg mL ⁻¹ de líquido ruminal						
Cobre	13.5	13.66	12.50	2.10	0.4230	0.5356
Zinc	67.33	97.83	105.50	12.88	0.0001	0.0968

El contenido de zinc en fluido ruminal (Cuadro 1) mostró un comportamiento lineal ($P < 0.0001$), implicando un aumento de este mineral en líquido ruminal en función del incremento en la dosis en cada tratamiento.

Cuadro 2. Efecto del suplemento de cobre y zinc en la digestibilidad ruminal y postruminal de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.

	Cu-Zn, mg d ⁻¹			SD	P=	
	3-0	3-20	3-40		Linear	Cuadrático
Peso vivo promedio, kg	49.19	49.19	49.19			
N	6	6	6			
Composición del Alimento, g/d						
MS	1107.27	1107.27	1107.27			
MO	971.49	971.49	971.49			
FDN	496.08	496.08	496.08			
N	37.56	37.56	37.56			
Cu	0.0072	0.0072	0.0072			
Zn	0.036	0.036	0.036			
Digestion ruminal, %						
MS	50.4128	49.7087	47.8026	10.6550	0.6774	0.9117
MO	57.0928	57.1455	55.5018	8.8249	0.7591	0.8501
FDN	49.3912	49.6442	47.5533	10.9269	0.7748	0.8330
N	47.3592	44.7236	42.8468	12.1790	0.5308	0.9511
Digestión ruminal, % de consumo						
MO	11.2	11.1	10.9	0.044	1.0596	0.1206
FDN	32.58	33.53	30.29	0.1189	0.1106	0.1240
N de alimento	54.96	51.76	49.65	0.8662	1.1270	0.1567
Eficiencia de N microbiano	15.55	14.22	15.47	5.5818	0.5897	0.2150
Eficiencia de N	0.6460	0.6741	0.6988	0.1225	0.5569	0.8088
Zn	53.79	44.74	45.99	0.1156	1.3639	0.7938

La digestibilidad ruminal y total para las fracciones de material seca, materia orgánica, fibra detergente neutro y nitrógeno (Cuadro 2) no presentaron diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos evaluados.

Cuadro 3. Efecto de suplemento de cobre y zinc en el flujo de componentes del alimento a duodeno de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.

	Cu-Zn, mg d ⁻¹			SD	P=	
	3-0	3-20	3-40		Linear	Cuadrático
Flujo a duodeno, g d ⁻¹						
MO	559.34	551.51	584.47	93.96	0.2145	0.1884
FDN	308.52	304.16	318.98	54.45	0.1106	0.1240
N	24.29	25.29	26.32	4.64	0.5726	0.5239
N no amoniacal	22.38	23.36	24.21	4.2460	0.5569	0.8088
N microbiano	6.77	6.64	6.76	1.28	0.1903	0.3966
N del alimento	15.60	16.71	17.4451	3.0015	0.1270	0.1567
Cu	0.01027	0.01034	0.0100	0.2203	0.1489	0.1268
Zn	0.04951	0.0714	0.0817	0.2269	13.280	0.5716

En la digestibilidad de nutrientes que se presenta en el flujo a duodeno, las variables de materia orgánica, fibra detergente neutro presentan tendencias a valores más altos en los tratamientos 1 y 3 sin existir diferencia estadística. En cuanto a nitrógeno y nitrógeno no amoniacal se presentó una tendencia creciente a favor de la inclusión de zinc; el nitrógeno microbiano el tratamiento 1 y 3 se presentaron valores más altos que el tratamiento 2, el nitrógeno del alimento tuvo un comportamiento creciente a favor del incremento de Zn dado por la adición del

mismo tratamiento. El zinc presenta diferencias asociadas a la adición del mismo tratamiento.

En la digestión ruminal (g d^{-1}) se observa que en la variable de materia orgánica tendió hacia una menor presencia de la misma conforme se incrementó la cantidad de zinc en la dieta. La fibra detergente neutro la mejor digestibilidad se observa en el tratamiento 1 y 3 siendo este último el que presentó el valor más pequeño; en el tratamiento 2 se obtuvo un valor alto. El nitrógeno del alimento presentó una mayor proporción en los tratamientos 1 y 3; a consecuencia de esto se presenta una eficiencia de N microbiano mayor dentro de los mismos tratamientos.

El Cuadro 4 presenta las variables evaluadas en la producción fecal. No se observaron cambios ($P > 0.05$) en los niveles determinados de MS, MO, FDN, N y Zn en heces y en la digestión total en tubo digestivo; sin embargo, se determinó un efecto lineal ($P < 0,05$) en los niveles de cobre detectados en heces y en la digestión total en tubo digestivo.

Cuadro 4. Efecto de suplemento de cobre y zinc en la digestibilidad total de borregos alimentados con una dieta a base de alfalfa.

Variable	Cu-Zn, mg d ⁻¹			SD	P=	
	3-0	3-20	3-40		Linear	Cuadrático
Excreción fecal, g d ⁻¹						
MS	433.40	437.86	435.27	0.1297	0.3294	0.1556
MO	365.01	370.85	366.85	0.1315	0.4389	0.0414
FDN	261.96	262.82	261.91	0.1283	0.6750	0.2780
N	8.95	8.92	8.14	1.0387	1.8483	0.5291
Cu	0.0089	0.0093	0.0090	0.1754	0.0056	0.2159
Zn	0.0624	0.0866	0.0935	0.1509	12.791	1.3027
Digestión total en tubo digestivo, % de consumo						
MO	0.1979	0.1840	0.2216	0.4713	0.1876	0.2957
FDN	0.1017	0.0903	0.1247	1.1280	0.1115	0.1477
N	44.26	47.23	52.47	0.1104	1.6565	0.4249
Cu	9.95	5.86	9.25	0.1607	0.0056	0.2159
Zn	41.75	33.01	38.20	00.1109	0.3068	0.1.5773

VII. DISCUSIÓN

Las variables de pH y N-amoniaco no presentaron diferencias significativas (P=0.26). Mc Dowell (1992) menciona que la alta concentración de Zn en la dieta (300 ppm) puede interferir con la absorción y el metabolismo de algunos minerales, como el Cu y el Fe, y agravar una deficiencia de los mismos. Los ovinos tienen una tolerancia de hasta 300 ppm de Zn, por lo que se podría

suponer que con 0, 20 y 40 ppm de este mineral no representó ningún cambio metabólico importante en las bacterias celulíticas, éstas mantuvieron una actividad adecuada y no interfirió con la actividad de algunas cepas de bacterias que requieren cobre, ya que con 10 ppm de este mineral en la dieta se cubre los requerimientos establecidos en las tablas del NRC (2007). Lo anterior se pudo relacionar con la falta de cambios en la digestibilidad de las diferentes fracciones del alimento usando como suplemento cobre y zinc bajo el esquema de los tratamientos evaluados.

El Zn a altas concentraciones, pero por debajo del nivel de toxicidad, impacta sobre las proporciones relativas de AGV, aunque esto parece depender de la dieta. En bovinos que recibieron un forraje de baja calidad suplementado con urea, con el suministro de 250 y 470 ppm de Zn (Cl_2Zn) se incrementó la concentración de propionato (Arelovich *et al.*, 2000). En dicho experimento 250 ppm de Zn resultaron suficientes para generar ese efecto, y concentraciones mayores disminuyen la degradación de fibra. En una dieta de alfalfa y grano de maíz, la adición de 500 ppm de Zn (SO_4Zn) también incrementó la concentración ruminal de propionato (Bateman II *et al.*, 2004).

La concentración de AGV no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos evaluados. Cervantes (2012) reporta una concentración de 10 ppm de Cu en su experimento realizado en líquido ruminal y teniendo como sustrato heno de alfalfa, después de haberlo incubado por más de 72 h se obtuvo 55.78 mM mL^{-1} de AGV totales lo que resultó similar a los observado en este trabajo. Con esta misma concentración de Cu y el mismo sustrato, el ácido acético, propiónico y butírico tuvieron una concentración de 37.8,

14.01 y 3.97 respectivamente, los cuales se encontraron por debajo de la concentración obtenida en este trabajo *in situ*, con un promedio para acético, propiónico y butírico de 80.14, 19.61 y 9.87, respectivamente. Sin embargo, lo reportado por Cobos (2007) como concentraciones normales en rumen para acético, propiónico y butírico fue de 66-70, 23 a 25 y 15 a 20, respectivamente, los cuales se aproximan a los resultados obtenidos en este estudio. Otra investigación similar desarrollada por Nava y Díaz (2001) reportan que el porcentaje de acético, propiónico y butírico en forrajes es de 65, 25, 10, respectivamente, lo cual se aproxima a los datos obtenidos en este experimento.

La concentración promedio de nitrógeno amoniacal fue de 18.5 mL L⁻¹ entre los tratamientos evaluados. Varios estudios han demostrado una variación numérica para un máximo desarrollo de la microflora y esta va de 14 mg L⁻¹ hasta 294 mg L⁻¹ en bovinos, además esta variable se asocia con la calidad y tipo de forraje (Hess *et al.*, 1999) más que con las concentraciones de minerales en el alimento.

El Zinc presentó un efecto lineal de acuerdo a los niveles suplementado de este mineral (P<0.01). Gooneratne y Christensen (1997) lo atribuyeron a una disminución en la excreción biliar de este, a niveles más altos en la dieta, así como disminución en la excreción urinaria (Gooneratne y Christensen, 1997).

En caso de la digestibilidad de nutrientes, materia seca, materia orgánica, fibra detergente neutro y nitrógeno no presentaron diferencias estadísticas (P>0.05). En un estudio realizado en venado cola blanca se suplementó Cu y Zn con las concentraciones de 24.6 ppm Cu y 117 ppm Zn vs 236 ppm Cu y 1135 ppm Zn, y determinaron mayor digestibilidad de la materia seca en animales que

recibieron la menor dosis de Cu y Zn, en la disponibilidad de energía no existió diferencias, pero el N excretado fue mayor en animales suplementados con la dosis más alta de Cu y Zn (Bartoskewitz *et al.*, 2007). Existe muy pocos estudios que analicen la digestibilidad de nutrientes basados en la adición de Cu y Zn en las dietas de ovinos, que permita explicar estos aspectos; sin embargo, se puede asociar la falta de diferencia estadística a la concentración óptima de Cu y al rango de Zn adicionado en este estudio ya que existe una tolerancia máxima de hasta 300 ppm (NRC, 2007).

Kreuzer y Kirchgessner (1990) realizaron una prueba con Merinos adultos evaluando proporciones de Zn a Cu de (52:1 a 66:1, las cuales generaron una respuesta similar a la proporción de 60:1 evaluada por Campbell y Mills (1979) resultando aceptable, sin efectos adversos sobre el metabolismo de Cu en ovejas. Con esto se demuestra que la concentración de Cu y Zn no fue lo suficiente para afectar negativamente el comportamiento de la microflora ruminal y al animal.

No se presentan diferencias en la digestibilidad ruminal de las fracciones evaluadas, esto puede deberse a que la dieta no vario entre tratamientos, a pesar de ello las variables de materia seca y materia orgánica y nitrógeno presentan una tendencia de incremento, opuesto a la de FDN. Los resultados observados para FDN coincide con lo reportado por Stritzler *et al.* (2015) quienes determinaron una digestibilidad de 53.3% en una dieta similar, indicando la falta de efecto por adición de zinc. Cabe señalar que los estudios que demuestren relación de zinc en la dieta con la digestibilidad de los nutrientes son escasos en la literatura consultada, para el caso de materia seca no coincide con el valor reportado por

Avendaño *et al.* (2004) donde indican una digestibilidad de 59.9% lo cual resulta más alto que lo reportado en este trabajo.

Los resultados relacionados con la evaluación de N en rumen coinciden con lo establecido por la FEDNA (2004) donde se establecen valores de digestibilidad de nitrógeno que van del 65 a 80% dependiendo de su calidad.

No se determinaron diferencias ($P > 0.05$) en el flujo de materia orgánica, fibra detergente neutro, nitrógeno, N no amoniacal, N microbiano y N del alimento al duodeno (Cuadro 3), tampoco hubo cambios en el flujo a duodeno de Cu y Zn. Algunos autores mencionan que la absorción de estos nutrientes se da en una fracción mínima en abomaso y el resto en intestino delgado en el caso de ovinos (Mc Dowell, 1992), aunque existe evidencias en ovinos acerca de que la absorción del Zn en el rumen puede ser aún mayor que en el intestino delgado (Arora *et al.*, 1969).

En el caso general de la absorción de N se presenta una tendencia clara. La influencia de algunos minerales sobre la degradación de N no proteico (NNP) en el rumen resulta un aspecto de relevancia, tanto en cuanto a los requerimientos específicos de los microorganismos como a los efectos de inhibición, de esta manera, la ureasa ruminal requiere de Ni para optimizar su actividad (Spears *et al.*, 1977), pero con adición *in vitro* de Cu, Zn, Cd; Sr, Ca, Co, Mn, Ba y Mg decrece la producción de NH_3 (Spears y Hatfield, 1978). Esto puede deberse a una disminución en la tasa de ureolisis ruminal o bien a un incremento en la utilización microbiana del NH_3 . Efectos depresores de la actividad ureásica ruminal *in vitro* fueron observados con la combinación de concentraciones elevadas de Zn o Zn con Mn (Rodríguez, 1995; Rodríguez *et al.*, 1996).

En un estudio *in vivo* (Arelovich *et al.*, 2000), concentraciones de Zn por debajo de los niveles tóxicos, pero superiores a los requerimientos, atenuaron el pico de NH_3 ruminal. Además, la concentración NH_3 permaneció sobre niveles críticos para un óptimo crecimiento bacteriano por un periodo de tiempo prolongado. Con esto podemos suponer que a través de esta situación la degradación de la fibra también se vio beneficiada.

En una menor cantidad de información hay disponible acerca de la influencia de algunos minerales sobre la degradación de la proteína verdadera ingerida. Además algunos estudios parecen contradictorios. Bateman II *et al.* (2004) reportó que 500 mg de Zn (SO_4Zn) disminuyen sensiblemente la degradación de la proteína en el rumen. Por otra parte, el suministro de 430 ppm de Zn (Cl_2Zn) no afectó significativamente la degradabilidad de la proteína (Arelovich *et al.*, 2008). El Cu, Cd y Zn pueden unirse a grupos SH interfiriendo con la actividad enzimática (Faixová y Faix 2005).

Cabe señalar que en el caso de cobre la digestibilidad coincide con lo reportado por Spears (2003) donde señala que en los rumiantes, la absorción del cobre es baja (1.0 a 10%), atribuido a la formación de complejos en rumen. De manera similar zinc no se presentan diferencias; sin embargo, coincide con los resultados que indican de la ingestión de Zn se absorbe solo del 5 al 40%, un tercio en abomaso y el resto en intestino delgado.

VIII. CONCLUSIONES

El nivel evaluado de Cu y los niveles de Zn más allá del nivel óptimo no afectó la digestibilidad de nutrientes. Del mismo modo no se afecta a la absorción de estos minerales uno con la presencia del otro; sin embargo, la excreción de Zn es elevada en la medida que se aumenta la dosis del mineral en la dieta por lo que existe una contaminación con el elemento al medio.

IX. LITERATURA CITADA

- Agricultural Research Council (ARC), 1980. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. The Gresham Press, Surrey.
- Álvarez C., J. L., 2001. Bioquímica Nutricional y Metabólica del Bovino en el Trópico. Editorial Universidad de Antioquia, primera Ed. Colombia. 201 p.
- Ammerman C. B., 1969. Recent Developments in Cobalt and Copper in Ruminant Nutrition, A Review, simposium. pp. 1097 – 1107.
- A.O.A.C., 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists. U.S.A.
- Arelovich, H.M., Laborde, H.E., Amela, M.I., Torrea, M.B. and Martínez, M.F., 2008. Effects of dietary addition of zinc and (or) monensin on performance, rumen fermentation and digesta kinetics in beef cattle. Span J. Agric. Res. 6(3), 362-372.
- Arelovich, H.M., Owens, F.N., Horn, G.W. and Vizcarra, J.A., 2000. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake and digestion by cattle fed prairie hay and urea. J. Anim. Sci. 78, 2972-2979.
- Arora, S. P., Hatfield, E.E., Garrigus, U.S., Lohman, T.G., and Doane, B.B., 1969. Zinc 65 uptake by rumen tissue. J. Nutr. 97, 25 – 28.

- Arteaga C. V., 2014. Estado nutricional del ganado y acumulación de forraje en una unidad de producción de becerros. Tesis, 2014, Universidad Autónoma Chapingo.
- Avendaño, J.R., Fernández E.F., Ovalle M.C., y Blu L.F., 2004. Ovinos alimentados con raciones que incluyen tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* subsp. *palmensis*) en reemplazo de heno de alfalfa. ii. digestibilidad y consumo de nutrientes. Agricultura Técnica. Chile. 64(3),271-279.
- Baker D. H., Ammerman, C. B., Lewis, A. J., 1995. Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals, and Vitamins. Academic Press, San Diego, CA, pp. 5–33.
- Balbuena O., McDowell, L. R., Luciani, C. A., Conrad, J. H., Wilkinso, N. N., Martin, F. G., 2003. Estudios de la Nutrición Mineral de los Bovinos para carne del Este de las Provincias de Chaco y Formosa (Argentina). Cobre, Molibdeno y Azufre. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 1-8.
- Bartoskewitz, ML, Hewitt G, Laurenz JC, Pitts JS, Bryant FC., 2007. Effect of dietary copper and zinc concentration on White-tailed deer antler growth, body size, and immune system function. Small Rumin. Res. 73, 77-86.
- Bateman, H.G. II, Williams, C.C., Gantt, D.T., Chung, Y.H., Beem, A.E., Stanley, C.C., Goodier, G.E., Hoyt, P.G. Ward, J.D. and Bunting, L.D., 2004. Effects of zinc and sodium monensin on ruminal degradation of Lysine-HCl and liquid 2-hydroxy-4-methylthiobutaoic acid. J. Dairy Sci. 87,2571-2577.

- Bauer D., Rush I., Rasby, R., 2009. Minerales y vitaminas en bovinos de carne. Sitio Argentino de Producción Animal.
- Beede, D. K., 2005. Assessment of water quality and nutrition for dairy cattle. In: Proceeding: Mid-South Ruminant Nutrition Conference. Arlington, Texas. April 27-28. 19 p.
- Beede, D. K., 2009. Solving bad water problems for thirsty cows. In: Proceeding Western Dairy Management Conference. Reno, Nevada. March 9, 11-13.
- Bidewell, C.A., David, G.P., Livesey, C.T., 2000. Copper toxicity in cattle. The Vet Rec 147, 399 – 400.
- Bondi, A. A., 1987. Animal nutrition. Wiley–interscience Publication. New York. P. 540
- Bradley, C.H., 1993. Copper poisoning in a dairy herd fed a mineral supplement. Can Vet J 34, 287 – 292.
- Bremner, I., 1998. Manifestations of copper excess. Am. J. of Clin. Nutr. 67, 1069 – 1073.
- Bremner, I., Beattie, J.H., 1995. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. Proceedings of the Nutrition Society 54, 489 –499.
- Campbell, J.K. y Mills C.F., 1979. The toxicity of zinc to pregnant sheep. Environ. Res. 20,1-13.

- Cao, J., Henry, P. R., Guo, R., Holwerda, R. A., Toth, J. P., Littell, R. C., 2000. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J. Anim. Sci.* 78, 2039 – 54.
- Castillo, R. A., E. P. Santos, Tabone T. J., 2007. Mineral balances, including in drinking water, estimated for Merced County dairy herds. *California Agriculture.* 61, 90-95.
- Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberg SA, García MC, Auza NJ., 2000. Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency. *Gen Phy Biophys.* 19, 49-58.
- Cervantes, G.D., 2012. Concentración óptima y tóxica de cobre para el crecimiento de bacterias ruminales. Tesis, 2012. Colegio de Postgraduados.
- Chesters, J.K., 1997. Zinc. In: *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements.* Marcel Dekker Inc., New York, p. 185.
- Chicco, F.C., Godoy, L. S., 2005. Deficiencias minerales y condiciones asociadas en la ganadería de carne de las sabanas de Venezuela. *Primer Curso Internacional Sobre Avances en la Nutrición de los Rumiantes.* pp. 101-128.
- Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Teboul L., 2010. Over expression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* 42, 1086–1092

- Cobos, P.M., Ferrera, C.R., Alarcon, A., 2007. Interacciones entre microorganismos ruminales, en: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Editorial Trillas. México. pp. 498-516
- Corbett, W.S., Saylor, W.W., Long, T.A., Leach, R.M., 1978. Intracellular distribution of hepatic copper in normal and copper- loaded sheep. J. Anim. Sci. 47, 1174–1179.
- Cox, D.H., Harris, D.L., 1960. Effect of excess dietary zinc on iron and copper in the rat. J.Nutr. 70, 514-520.
- del Mar, C M., Olleta, J L., Sañudo, C., 2008. Características de la carne de cordero con especial atención al ternasco de Aragón. En Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. España.
- Domínguez V.I.A., Huerta B.M., 2008. Concentración e interrelación mineral en suelo, forraje y suero de ovinos durante dos épocas en el valle de Toluca, México. Agrocienca. 42, 173-183.
- Engle, T.E., Spears, J.W., 2000. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. J. Anim. Sci. 78, 2446–2451.
- Ensminger, M. E., 1976. Producción Ovina. 2da Edición. Ed. El Ateneo. Argentina.

Evans, G.W., 1973. Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol. Rev.* 53, 535–570.

Faixová, Z., Faix, S., 2005. Manipulation of rumen nitrogen metabolism (a review). *Folia Vet.* 49, 215 - 219.

Fenton, T.W.; Fenton, M., 1979. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *J. Anim. Sci.* 59, 631-634.

FEDNA., 2004. Alfalfa en rama. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. Citado en: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/alfalfa-en-rama

Fuentealba, C. I., Aburto, M.E., 2003. Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology.BioMed. Central.* Pp.1-12.

Galey, F.D., Maas, J., Tronstad, R.J., Woods, L.W., Jonson, B.J., Littlefield, E.S., Wallstrum, R., Dorius, L.C., 1991. Copper toxicosis in two herds of beef calves following injection withcopper disodium edetate. *J. Vet. Diag. Inv.* 3, 260–263.

Garg, A. K., Vishal, M., Dass, R.S., 2008. Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144, 82 – 96.

- Gooneratne, S.R., Christensen, D.A., 1997. Effect of Chelating Agents on the Excretion of Copper, Zinc and Iron in the Bile and Urine of Sheep. *Vet. J.* 153: 171-178.
- Gutiérrez, A.B.A., 2007. Efecto de la raza sobre la acumulación de cobre en terneros de cebo. Tesis, 2007
- Hanlon, J., Monks, E., Hughes, C., Weavers, E., Rogers, M., 2002. Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy. *J. Comp. Pathol.* 127, 290–299.
- Hempe, J.M., Cousins, R.J., 1989. Effect of EDTA and Zinc Methionine complex on zinc absorption by rat intestine. *J. Nutr.* 119, 1179–1187.
- Hess, H.D., Florez, H., González, Avila, M., 1999. Efecto del nivel de nitrógeno amoniacal en el rumen sobre el consumo volumétrico y la digestibilidad in situ de forrajes tropicales. *Pasturas Tropicales.* 21, 1.
- Hill, R., Nilén, H., Hotz, C., Brown, K. (Eds.), 2000. Zinc and human health: recent Scientific Advances and implications for public health programs. Consultado en www.zinc-health.org.
- Horn, N., Tumer, Z., 1999. Molecular genetics of intracellular copper transport. *J. Trace Elemen. Exp. Med.* 12, 297–313.
- Howell, J.M.C., Gooneratne, R.S., 1987. The pathology of copper toxicity in animals. In: Howell, J. McC., Gawthorne, J.M. (Eds.), *Copper in Animals and Man*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 53–78.

- Huerta, B. M., 2008. Sistema intensivo del engorde de corderos: una experiencia de México. *Tecnol. and Ciên. Agropec.*, João Pessoa. 2, p.43-48.
- Jones M. y Merwe D. V.D., 2008. Copper Toxicity in Sheep is on the Rise in Kansas and Nebraska. Pp. 1-5.
- Kincaid, R.L., Chew, B.P., Cronrath, J.D., 1997. Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: effect on uptake and immunity. *J. Dairy Sci.* 80, 1381–1388.
- Kreuzer, M., Kirchgessner, M., 1989. Effect of rumen protozoa on metabolism and retention in ruminants with special reference to diet characteristics. En Nolan, J.V., Leng, R.A. and Demeyer, D.I. (editors), *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminants Digestion*, Penambul Books, Armidale, Australia. pp. 189-197
- Lardy, G., Kerley, M.S., Patterson, J.A., 1992. Retention of metal proteinates by lambs. *J. Anim. Sci.* 70, 314.
- Littell, R.C., Lewis A.J., Henry P.R., 1995. Statistical evaluation of bioavailability assays. In: Ammerman CB, Baker DH, Lewis AJ, editors. *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals, and Vitamins*. San Diego, CA: Academic Press; p. 5–33
- Livesey, C.T., 2002. Investigation of copper poisoning in adult cows by veterinary laboratories agency. *Cattle Practice* 10, 289–294.

- López-Alonso M., Prieto F., Miranda M., Castillo C., Hernández J.R., Benedito J.L., 2004. Intracellular distribution of copper and zinc in the liver of copper-exposed cattle from northwest Spain. *The Vet. J.* 170, pp. 332–338.
- MacDonald, R.S., 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J. Nutr.* 130, 1500–1508
- Magee, A.C., Matrone G., 1960. Studies on growth, copper metabolism and iron metabolism on rats fed high levels of zinc, *J. Nutr.* 72:233.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., 2011. *Animal Nutrition. Seventh Edition.* Harlow, England: Pearson. p. 692.
- McDowell, L. R., 1992. *Minerals in Animal and Human Nutrition.* Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, San Diego, CA.
- McDowell, L.R., Conrad, J., Hembey, F. G., Rojas,L., Valle, G., Vélasquez, J.,1993. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales.* 2da. Ed. Boletín. Departamento de Zootecnia. Universidad de Florida. Gainesville.
- McDowell, L.R., Conrad, J.H., Ellis, G.L., Loosli, J.K., 1983. *Minerals for grazing ruminants in tropical regions.* University of Florida, Gainesville, Florida.
- Mercer, J.F.B., 2001. The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* 7, 64–69.

- Miller, J.K., Cragle R.G., 1965. Gastrointestinal sites of absorption and endogenous secretion of zinc in dairy cattle. *J. Dairy Sc.* 48, 370-373.
- Miller, W. J., Blackmon, D. M., Gentry, R. P., Pate, F. M., 1970. Effects of high but nontoxic levels of zinc in practical diets on Zn and zinc metabolism in Holstein calves. *J. Nutr.* 100, 893.
- Mohd, I. Y., S. Archana, M. D. Padinjare, P. H. Biju, D. Sarita, S. J. Ranbir, and D. Umesh., 2013. Role of trace elements in animals: a review. *Vet. World* 6(12), 963-967.
- Montaño, M.T., 2015, Importación Edomex 35 mil ovejas. *El universal*. 4 de julio de 2015.
- National Research Council, N.R.C., 1985. *Nutrient Requirements of Sheep*, sixth ed. National Academy Press, Washington, DC.
- National Research Council, N.R.C., 2001. *Nutrient requirements of Dairy Animals*, 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Nava, C.C., Díaz, C.A., 2001. Introducción a la digestión ruminal. Dpto. de Nut. Anim. www.produccion-animal.com.ar 04 de marzo de 2015.
- Navarro, D.L., 1987. Los ovinos pueden mejorar su eficiencia productiva y reproductiva, si son adecuadamente suplementados en su alimentación con sales minerales que contengan calcio, fósforo, magnesio, cobalto y otros

minerales necesarios para su normal crecimiento y desarrollo. Revista FONAIAP. 25

Nederbragt, H., van den Ingh, T.S.G.A.M., Wensvoort, P., 1984. Pathobiology of copper toxicity. Vet. Q. 6: 179-235.

Nikolić, J. A., Jovanović, M., Andrić, R., Djordjević, D., Krsmanović, J., 1983. Examination of the effect of copper and molybdenum on microbial protein synthesis in rumen contents using ³⁵S. J. Appl. Radiat. Lost. 34(5) 809-812.

NRC (National Research Council), 2005. Mineral Tolerance of Animals. 2nd Edition. The National Academies Press. Washington, DC. USA. p.511.

NRC, 2007. National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids of National Research Council. Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants. US. pp. 362.

Olivarez, G.M., Castillo, D.C., Arredondo, O.M., Uauy, D.R., 2015. Cobre y zinc en la nutrición humana. En: http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Gil%20Hernandez/Cu%20Zn.pdf

Olkowski, A. A., 2009. Livestock Water Quality: A Field Guide for Cattle, Horses, Poultry, and Swine. Her Majesty the Queen in Right of Canada. Minister and Department of Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC). 180 p.

OMS (Organización Mundial de la Salud), 2014. Prevalencia mundial de la anemia y número de personas afectadas http://www.who.int/vmnis/database/anaemia/anaemia_data_status_/es/.

Ott, E. A., Smith, W. H., Stob, M., Beeson, W. M., 1964. Zinc deficiency syndrome in the young lamb. *J. Nutr.* 82, 41.

Ott, E.A., Smith, W.H., Harrington, R.B., Beeson, W.M., 1966. Zinc toxicity in ruminants. I. Effects of high levels of dietary zinc on gains, feed consumption and feed efficiency of lambs. *J. Anim. Sci.* 25, 414–418.

Pal, D.T., Gowda, N.K.S., Prasad, C.S., Amarnath R., Bharadwaj U., Suresh, B.G., Sampath, K.T., 2010. Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. *J Trace Elemen. Med. Biol.* 24, 89-94.

Pechin, G H., 1999. El zinc en la nutrición de rumiantes. *J. Ciencias Veterinarias.* Universidad Nacional de La Pampa. Pp. 50-79.

Pechín, G. H., Idiart, J. L., Cseh, S., Corbellini, C. N., Moralejo, R. H., Cesán, R.O., Sánchez, L. O. 1999. Respuesta a la suplementación con cobre inyectable en distintos rangos de deficiencia en bovinos de carne. *Rev. Arg. Prod. Anim,* 19, 347-358.

Perry, T. W., Beeson, W.M., Smith, W.H., Mohler, M.T., 1968. Value of zinc supplementation of natural rations for fattening beef cattle. *J. Anim. Sci.* 27, 1674.

- Pond, W.G., 1983. Effect of dietary calcium and zinc levels on weight gain and blood and tissue mineral concentrations of growing Columbia-and Suffolk-sired lambs. *J. Anim. Sci.* 56, 952-959.
- Pond, W.G., Wallace M.H., 1986. Effect of gestation-lactation diet calcium and zinc levels and of parenteral vitamin A, D and E during gestation on ewe body weight and on lamb weight and survival. *J. Anim. Sci.* 63: 1019-1025.
- Pott, E.B., P.R. Henry, M.A. Zanetti, P.V. Raob, E.J. Hinderberger Jr., Ammermana, C.B., 1999. Effects of high dietary molybdenum concentration and duration of feeding time on molybdenum and copper metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79, 93-105
- Prohaska, J.R., 1991. Changes in Cu, Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *J. Nutr.* 121, 355–363.
- Quiroz-Rocha, G.F., Bouda, J., 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Rev. Vet. Méx.* 32, 4.
- Rivera, J. A., Sepúlveda, J., 2003. Conclusions from the Mexican National Survey 1999: translating results into nutrition policy. *Salud Pública de México* 45, 565- 575.
- Rodríguez, B.T., 1995. Factores de la dieta que afecta la actividad ureásica ruminal en ovinos alimentados con forrajes de baja calidad. Tesis de Maestría. Dto. Agronomía, Universidad Nacional del Sur. pp. 83

- Rodríguez, B.T., Arelovich, H.M., Villalba, J.J., Laborde, H.E., 1996. Dietary supplementation with zinc and manganese improves the efficiency of nitrogen utilization by lambs. *J. Anim. Sci.* 37, 1233.
- Rojas, L.X., McDowell, L.R., Cousins, R.J., Martin F.G., Wilkerson, N.S., Johnson A.B., 1995. Relative bioavailability of two organic and two inorganic sources fed to sheep. *J Anim Sci.* 73, 1202.
- Sadasivan, V., 1951. Studies on the biochemistry of zinc. I. Effect of feeding zinc on the liver and bones of rats. *Biochem J.* 48, 527–530.
- Saylor, W.W., Leach, R.M., 1980. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. *J. Nutr.* 110, 448–459.
- SIAP, 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&layout=full&id=369. 26 de junio de 2015.
- Smart, M. E., Cohen, R., Christensen, D.A., Williams, D., 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.
- Spears, J. W., Smith C.J., Hatfield, E.E., 1977. Rumen bacterial urease requirement for nickel. *J. Dairy Sci.* 60, 1073 - 1076.

- Spears, J.W., 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr.* 133, 1506–1509.
- Spears, J.W., Hatfield, E.E., 1978. Nickel for ruminants. Influence of dietary nickel on rumen urease activity. *J. Anim. Sci.* 47, 1345 – 1350.
- Spears, J.W., Kegley, E.B., 2002. Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 80, 2747–2752.
- Spears, J.W., Schlegel, P., Seal M.C., Lloyd, A.F., 2004. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions livestock. *Prod. Sci.* 90, 211-217.
- Sprinkle, J.E., Cuneo, S.P., Frederick, H.M., Enns, R.M., Schafer, D.W., Carstens, G.E., Daugherty, S.B., Noon, T.H., Rickert, B.M., Reggiardo, C., 2006. Effects of a long-acting, trace mineral, reticulorumen bolus on range cow productivity and trace mineral profiles. *J. Anim. Sci.* 84, 1439-1453.
- Sun, K. L. Z., Auerswald, R. Wenzel, R.A., Schnyder, H., 2014. Drinking water intake of grazing steers: The role of environmental factors controlling canopy wetness. *J. Anim. Sci.* 92, 282-291.
- Suttle, N. F., 2010. *Mineral Nutrition of Livestock*. 4th Ed. CABI Publishing, UK. p. 595

- Thompson, B., 2007. Food-based approaches for combating iron deficiency anemia. In: J. Badham, M. B. Zimmermann and K. Kraemer (Ed.). The Guidebook Nutritional Anemia. p. 43-45.
- Thurnham, D., Northrop-Clewes, C., 2007. Infection and the ethiology of anemia. In: J. Badham, M. B. Zimmermann and K. Kraemer (Ed.). The Guidebook Nutritional Anemia. pp. 31-33.
- Todd, J. R., 1969. Chronic copper toxicity of ruminants. Proc. Nutrition Soc. 28, 189.
- Todd, J. R., Thompson, R.H., 1963. Studies on chronic copper poisoning: II. Biochemical studies on the blood of sheep during the haemolytic crisis. British Vet. J., 119, 161.
- Valle, B.L.; Auld D.S. 1990. Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins. Biochem. 29: 5647-5659.
- Van Reen R., Pearson, P.B., 1953. Magnesium deficiency in the duck. J. Nutr. 55, 225.
- Villanueva, G.J.C., 2011. NUTRICIÓN DEL GANADO: ZINC Sitio Argentino de Producción Animal
- VLA Surveillance Report, 2001. July sees an increased incidence of copper poisoning in cattle. The Vet. Rec 149, 257–260.

- Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., Robinson, N. J., 2009. Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 460, 823-830.
- Weiss, E., Baur, P., 1968. Experimental studies on chronic copper poisoning in the calf. *Biol. Abstr.* 15, 156.
- Whitehead, M.C., Beeman, C.S., Kinsella, B.A., 1985. Distribution of taste and general sensory nerve endings in fungiform papillae of the hamster. *Am. J. Anat.*, 173, 185–201.
- Winge, D.R., Mehra, R.K., 1990. Host defenses against copper toxicity. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 31, 47-83.
- Wright C. L. 2007. Management of water quality for beef cattle. *Veterinary Clinic North America Food Animal Practices* 23, 91-103.
- Wright C.L., Spears J.W., 2001. Effects of zinc source and dietary level on zinc metabolism in Holstein bull calves. *J. Anim. Sci.* 79, 86–92.