

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
Diretor substituto: Prof. Dr. Fernando Andreasi

LEVANTAMENTO DOS ELEMENTOS MINERAIS EM PLANTAS
FORRAGEIRAS DE ÁREAS DELIMITADAS DO ESTADO DE
SÃO PAULO. IV — ZINCO *

(SURVEY ON THE MINERAL ELEMENTS IN PASTURE PLANTS
PRODUCED IN RESTRICTED AREAS OF SÃO PAULO STATE
BRAZIL. IV — ZINC)

FERNANDO ANDREASI
Prof. Associado

CÁSSIO XAVIER DE MENDONÇA JR.
Instrutor

JOÃO SILVA MARCONDES VEIGA
Instrutor

FLÁVIO PRADA
Instrutor

Relações inadequadas de zinco e outros micronutrientes, tem sido experimentalmente estudadas em animais de laboratório através da administração de dietas purificadas (11, 27).

UNDERWOOD (30), em 1956, prognosticou que, em razão do elevado conteúdo deste elemento existente nas plantas, pareceria bastante improvável a ocorrência desta deficiência em animais de interesse econômico, mantidos em condições naturais ou em estabulação.

De fato, segundo GLADSTONES & LONERAGAN (10), o efeito desta carência em algumas leguminosas e gramíneas se faz sentir mais pronunciadamente, sobre o rendimento da massa vegetal produzida, do que em relação à concentração do elemento na planta.

Entretanto, TUCKER & SALMON (29) haviam, já em 1955, diagnosticado, em suínos, uma deficiência deste micronutriente, determinando o síndrome paraqueratose condicionado por vários fatores, entre os quais: a) insuficiência do mesmo na ração; b) altos níveis de cálcio e fósforo nos alimentos; c) exigência elevada dessa espécie, pelo menos, em relação a esse elemento.

VALEE (31) apresentou excelente revisão sobre a paraqueratose em suínos, em crescimento, seguido por HOEFER et alii (14),

* Parte do presente trabalho foi realizada com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e da Fundação Rockefeller.
Trabalho apresentado no XII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária realizado em Porto Alegre (RGS), em 1970.

que abordaram o papel das interrelações de cálcio, zinco, ferro e cobre na produção da doença; OBERLEAS et alii (20), atribuíram o ácido fítico como sendo o fator responsável pela mais alta exigência em zinco nessa espécie; SMITH et alii (28) avaliaram o ganho, conversão e casos de paraqueratose em suínos submetidos a diferentes fontes de proteína e carboidratos com e sem adição do micronutriente; POND et alii (25) estudaram os efeitos dos níveis do mesmo relacionados aos teores de cálcio e concentração de milho na ração sobre o ganho de peso e ocorrência da doença; em publicação ulterior, POND et alii (24) verificaram a influência do óleo de milho, cádmio e diferentes níveis de zinco sobre o crescimento e incidência de paraqueratose em bácoros.

Contudo, somente em 1960, enquanto MILLER & MILLER (17), descreviam uma deficiência deste elemento, experimentalmente induzida, em bezerros holandeses, LEGG & SEARS (16), observaram, em bovinos mantidos em condições naturais, lesões semelhantes àquelas descritas em ratos que foram submetidos à dieta deficiente em zinco.

Contrariando a assertiva de UNDERWOOD (30), de que as plantas forrageiras são normalmente ricas nesse mineral, outros autores (7, 8, 13, 16) mostraram que algumas espécies podem apresentar níveis insuficientes do elemento.

D'outra parte, as relações entre cálcio, magnésio e zinco (12), e as exigências deste último, em função a diferentes teores de cálcio na ração (13), interrelações, cobre e zinco influenciadas pela presença do cálcio e molibdeno (8), foram focalizadas em bovinos mantidos em condições de pastejo.

MILLER & MILLER (18), induziram com dietas purificadas, a deficiência em bezerros e em seguida, recuperaram a saúde dos animais com diferentes níveis do mineral, enquanto MILLS et alii (19), chegaram à conclusão de que a suplementação de 0,2 mg Zn/kg peso por dia, ou de 10 a 15 p.p.m. na ração, proporcionou, curva de crescimento normal em bezerros e ovinos destacando ainda a incapacidade destas espécies em armazenar excessos deste elemento para ulterior utilização.

Por outro lado, níveis tão altos, como 100 p.p.m., foram assinalados por OTT et alii (21) que, utilizando dietas purificadas, obtiveram em ovelhas, adequado ritmo de crescimento e conversão alimentar. Posteriormente, OTT et alii (22) utilizando a mesma linha de investigação anterior (21), sugeriram que, em ovelhas, as exigências situam-se entre 18 e 33 p.p.m. após surpreender significativo efeito linear, do zinco da dieta sobre o ganho de peso e eficiência alimentar.

Na literatura compulsada, não nos foi dado encontrar referência de trabalhos realizados na América Latina, quer sobre a riqueza desse mineral em plantas forrageiras, quer em relação à identificação de deficiência de zinco nessa área.

A presente investigação tem por objetivo realizar um levantamento dos níveis desses elementos contidos em três plantas forrageiras mais comuns em zonas delimitadas do Estado de São Paulo e relacioná-los às exigências nutricionais dos animais de interesse econômico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas forrageiras — capim Colonião (*Panicum maximum*), Jaraguá [*Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf] e Gordura (*Melinis minutiflora*) — utilizadas neste estudo, provieram de diferentes municípios do Estado de São Paulo.

O critério adotado durante a colheita, observando quatro diferentes tipos de solos assim como duas estações bem definidas ao lado dos cuidados dispensados para evitar contaminações, remessa ao laboratório, moagem e preparo das amostras, está contido em trabalho anterior [ANDREASI et alii (1)].

O método empregado para determinação do zinco, descrito por LAZAR (15), é uma condensação, ligeiramente modificada, dos métodos da AOAC (4) e de COWLING & MILLER (5).

Dadas as dificuldades iniciais encontradas na preparação das soluções e cuidados especiais exigidos durante o desenvolvimento das diversas fases do método, pareceu-nos recomendável descrever, embora de forma concisa, parte do esquema de LAZAR (15), atinente aos sucessivos tratamentos prévios a que foram submetidas as amostras, visando a eliminação dos mais comuns interferentes, presentes em plantas, permitindo a determinação dos micro-nutrientes, entre os quais o zinco, objeto do presente trabalho.

I — Preparação da solução "A".

Para a preparação da solução "A", observamos o método de GIESEKING et alii (9), cuja seqüência foi adaptada ao esquema (Fig. 1) elaborado por LAZAR (15).

II — Preparação das soluções "B" e "C".

A — Reagentes:

- 1 — Ácido clorídrico 1:1, destilado.
- 2 — Citrato de amônio a 40%.

Dissolver 800 g de ácido cítrico p.a. em 600 ml de água destilada e, lentamente, sob agitação, juntar 900 ml de hidróxido de amônio p.a. Deixar resfriar e, ajustar o pH a 8,5 se necessário.

a) Diluir a 2.000 ml e extrair, várias vezes, com 25 ml de ditizona a 0,05%, já purificada, até a fase aquosa assumir cor alaranjada e a porção de tetracloreto de carbono permanecer, predominantemente, de cor verde.

b) Transferir para funil de separação de 3 litros de capacidade e remover a coloração alaranjada com repetidos tratamentos de tetracloreto de carbono (50 ml) sob agitação.

c) Acertar novamente o pH a 8,5 com hidróxido de amônio 1:1 e deixar a solução em geladeira durante 2 a 3 dias para a completa sedimentação do tetracloreto da porção aquosa.

3 — Hidróxido de amônio, 1:1, destilado.

4 — Fenolftaleína, 1% em etanol (95%) destilado.

5 — Hidróxido de amônio, 0,02 N, destilado.

6 — Ditizona, 0,05% (preparo e purificação).

a) Dissolver 0,5 g de ditizona em 700 ml de tetracloreto de carbono redestilado.

b) Filtrar para funil separador de 4 litros de capacidade, contendo 3.000 ml de hidróxido de amônio a 0,02 N.

c) Após agitação durante 5 minutos, descartar a fase de tetracloreto de carbono.

d) Agitar, repetidas vezes, com porções (50 ml) de tetracloreto de carbono até este, ao separar-se, apresentar coloração verde intensa.

e) Adicionar 1 litro de tetracloreto de carbono e acidificar, ligeiramente com ácido clorídrico, 1:1. Nesta fase, a solução aquosa mudará de alaranjado à púrpura escura, e o tetracloreto de carbono assumirá coloração verde intensa.

f) Agitar durante 5 minutos e transferir a fase tetracloreto de carbono para um recipiente "Pyrex", conservando-a em geladeira.

7 — Tetracloreto de carbono, bi-destilado.

8 — Ácido clorídrico, 0,02 N.

9 — Ácido clorídrico, 0,01 N.

B — *Tratamento da solução "A" com ditizona em meio alcalino.*

1 — Transferir 25 ml da solução "A" de cada amostra em funis separadores de 125 ml de capacidade, adaptados em um primeiro suporte para conter seis unidades.

- 2 — Juntar 5 ml de citrato de amônio a 40%.
- 3 — Adicionar uma gota de fenolftaleína a 1%.
- 4 — Acertar o pH a 8,5 com hidróxido de amônio 1:1.
- 5 — Adicionar 10 ml de solução de ditizona e agitar durante 5 minutos.
- 6 — Transferir a ditizona em tetracloreto de carbono, para uma segunda série de funis separadores.
- 7 — Lavar com 2 a 3 ml de tetracloreto de carbono e proceder como item 6.
- 8 — Repetir os itens 5, 6 e 7 até a fase aquosa apresentar coloração alaranjada, e o tetracloreto predominantemente verde.
- 9 — Adicionar 15 ml de tetracloreto de carbono redestilado.
- 10 — Agitar durante 5 minutos.
- 11 — Transferir a fase tetracloreto de carbono para os funis separadores referidos no item 6.
- 12 — Desprezar a fase aquosa contida no primeiro funil separador.

C — Preparação da solução "B". (zinco).

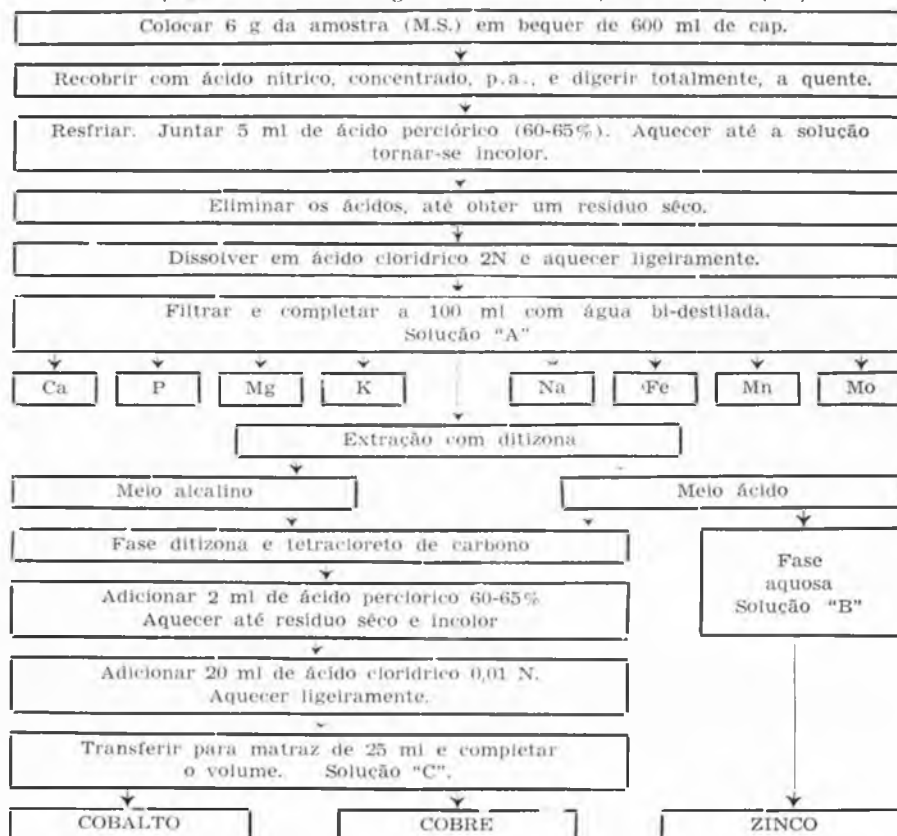
- 1 — Pipetar 50 ml de ácido clorídrico 0,02 N diretamente nos funis separadores mencionados na secção B, item 11.
- 2 — Agitar durante, exatamente, 10 minutos.
- 3 — Transferir a fase tetracloreto de carbono em bequer de 100 ml de capacidade.
- 4 — Adicionar 5 ml de tetracloreto de carbono ao funil separador. Não agitar.
- 5 — Transferir o tetracloreto de carbono para o bequer citado no item 3.
- 6 — Recolher a fase aquosa em recipientes de vidro ou plástico.

Esta será a solução "B" que contém o zinco.

D — Preparação da solução "C". (cobalto e cobre)

- 1 — Ao bequer mencionado na secção "C", item 5, adicionar 2 ml de ácido perclórico, 60% — 65%.
 - 2 — Evaporar, lentamente em chaga elétrica, após cobri-los com vidro de relógio.
 - 3 — Adicionar, se necessário, 1 a 2 ml de ácido perclórico 60%, até obter solução incolor. Evaporar o ácido após retirar o vidro de relógio.
 - 4 — Dissolver o residuo em 10 ml de ácido clorídrico 0,01 N, cobrir com vidro de relógio e aquecer ligeiramente.
 - 5 — Transferir para frascos volumétricos de 25 ml, lavar o bequer com água redestilada e completar o volume.
- Esta será a solução "C" que encerra o cobre e cobalto.

Figura 1 — Representação esquemática das diversas fases para a separação do zinco, cobalto e cobre (segundo LAZAR (15), com modificações)



III — *Determinação do zinco* [segundo LAZAR (15)], A.O.A.C. (4) e COWLING & MILLER (5).

A — Reagentes

1 — Solução "tampão" para zinco.

Tomar 500 ml de solução a 0,1% de dietilditiocarbamato de sódio, 400 ml de citrato de amônio a 40%, 15 ml de hidróxido de amônio 1:1 e completar o volume a um litro com água bidestilada. Acertar o pH a 8,5.

2 — Ditizona diluída.

Diluir 30 partes de ditizona purificada a 100 partes com tetracloreto de carbono, bi-distilado.

3 — Tetracloreto de carbono, redistilado.

4 — Solução de zinco (1.000 $\mu\text{g Zn/ml}$).

Dissolver 1 grama do metal zinco p.a., em 20 ml de ácido clorídrico 1:1 e diluir a um litro com água bi-destilada.

5 — Solução de uso (10 μg Zn/ml).

Diluir 10 ml da solução padrão a 1.000 ml com água bi-destilada.

B — *Curva padrão.*

Pipetar 0, 1, 2, 3, 4 e 5 ml da solução de uso (10 μg Zn/ml), juntar adequados volumes de ácido clorídrico 0,01 N para obter um volume total igual de 25 ml e seguir o processo a partir do item "2" do método.

C — *Método.*

1 — Pipetar 25 ml da solução "B" em funil de separação de 125 ml de capacidade.

2 — Adicionar 25 ml da solução "tampão" para zinco.

3 — Juntar 1 gota de fenolftaleína a 1% e verificar o pH.

Se necessário, acrescentar gotas de hidróxido de amônio 1:1 até coloração rósea pálida.

4 — Pipetar 10 ml da solução de ditizona diluída.

5 — Agitar durante exatamente 5 minutos.

6 — Transferir a fase ditizona para tubo de ensaio de 15 ml de capacidade.

7 — Pipetar 3 ml da solução (item 6), transferindo-os para frasco volumétrico de 50 ml e diluir ao volume com tetracloreto de carbono, redestilado.

8 — Proceder a leitura — por cento de transmissão — em espectrofotômetro a 540 $m\mu$ e, usando como solução de referência tetracloreto de carbono redestilado.

D — *Cálculos.*

Multiplicar os microgramas de zinco, após deduzido o "blank", pela constante 1,333 para obter a concentração de zinco em p.p.m.

A matéria sêca foi obtida segundo método clássico do A. O. A. C. (4).

O número total de amostras (96), foi distribuído para fins estatísticos, por três gramíneas, quatro tipos de solos e duas colheitas — nas épocas de sêca e águas — sendo igualado a quatro o valor de cada classe.

A interpretação estatística seguiu modelo de PIMENTEL GOMES (23).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os conteúdos de zinco encontrados nas plantas forrageiras, estão representados na figura 2 e os dados essenciais resultantes da análise estatística são vistos na tabela I.

TABELA I — Análise de variância referente aos níveis de zinco determinados nas três gramíneas, colhidas em duas estações e em quatro tipos de solo

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Quadrados médios
Forragens	2	599
Épocas	1	14.628 **
Solos	3	1.510
Forragens x solos	6	363
Solos x épocas	3	136
Forragens x épocas	2	534
Resíduo	78	564

** $P < 0,01$

Os resultados revelaram que os níveis médios de zinco, observados nas três plantas forrageiras estudadas, não diferiram significativamente. D'outro lado, acentuada e significativa discrepância foi assinalada entre épocas, nas quais, à semelhança do observado para o cálcio, magnésio (1), sódio (2), ferro e manganês (3), os teores de zinco superaram, na seca, os encontrados na estação chuvosa, parecendo ainda não haver relação entre taxas do elemento na forragem e tipos de solo.

Em razão da escassez de observações feitas em relação ao teor de micronutrientes em espécies vegetais, mormente, em plantas forrageiras aqui estudadas, não nos é dada oportunidade de estabelecer cotejos, máxime se lembramos que GLADSTONES & LONERAGAN (10) afirmaram quase inexistir comparações críticas entre espécies de vegetais no atinente à sua capacidade de retirar do solo esses elementos para incorporá-los à parte aérea das plantas.

Adiantam, todavia, que há acentuadas diferenças entre espécies, no que tange à riqueza desses elementos, as quais parecem exercer considerável influência não só na nutrição da planta como ainda no grau de adaptação da mesma a determinados tipos de solo (10). Como decorrência do variável estado de nutrição da planta, grandes oscilações são observadas no que concerne aos níveis de ingestão dos elementos por parte dos animais, mantidos

em condições de pastejo. Segundo esses autores (10), a concentração de zinco no caule e folhas das espécies, objetos de seus estudos, declinou com a idade, embora em diferentes graus de intensidade.

Esses dados conflitam com os obtidos na presente investigação, pois com o progredir da idade da planta, os conteúdos de zinco foram, para as três gramíneas, significativamente, mais elevados em relação aos registrados nas plantas mais novas. Os diferentes estágios de desenvolvimento das sementes observados nas plantas adultas, na época de seca, parecem explicar essas diferenças pois, de acordo com GLADSTONES & LONERAGAN (10), as sementes abrigam a mais elevada concentração desse micronutriente em relação à planta total, na maturidade. De fato, as três gramíneas aqui estudadas, apresentaram conteúdos em zinco da ordem de 65 e 40 p.p.m., respectivamente, na seca e águas (tabela II), enquanto GLADSTONES & LONERAGAN (10), trabalhando com quatro espécies de gramíneas, em estágio anterior à produção de sementes e, oriundas de solo não tratado pelo óxido de zinco, obtiveram, em três colheitas com intervalo de um mês, médias de 26, 15 e 13 p.p.m., consoante a ordem de amostragem.

TABELA II — Zinco, expresso em partes por milhão sobre matéria seca, de três gramíneas, colhidas em diferentes tipos de solo e épocas do ano.

Tipo de solo	Época de seca		Época das águas	
	Média	Intervalo	Média	Intervalo
Capim Colônião				
S ₁	47	32 — 71	28	20 — 37
S ₂	55	12 — 124	50	31 — 98
S ₃	55	26 — 87	23	17 — 28
S ₄	82	45 — 118	47	27 — 59
Capim Jaraguá				
S ₁	70	41 — 123	24	15 — 34
S ₂	82	60 — 104	43	26 — 60
S ₃	57	27 — 91	41	17 — 69
S ₄	69	48 — 121	36	30 — 52
Capim Gordura				
S ₁	46	29 — 67	44	29 — 56
S ₂	71	62 — 96	54	46 — 69
S ₃	73	47 — 107	47	29 — 65
S ₄	74	43 — 103	48	24 — 72

S₁ — Série Passa-Dois

S₂ — Série São Bento

S₃ — Série Itararé-Tubarão

S₄ — Série São Roque

O Colônião apresentou, na seca e águas, as médias de 60 e 37 p.p.m., respectivamente, enquanto o Jaraguá mostrou 69 p.p.m. na seca e 36 p.p.m. nas águas, portanto, com amplitude de variação, a mais pronunciada. Situando-se nos níveis, dos anteriores,

o Gordura, revelou a média de 66 p.p.m. na estação da sêca e 48 p.p.m., nas águas (tabela II e figura 2).

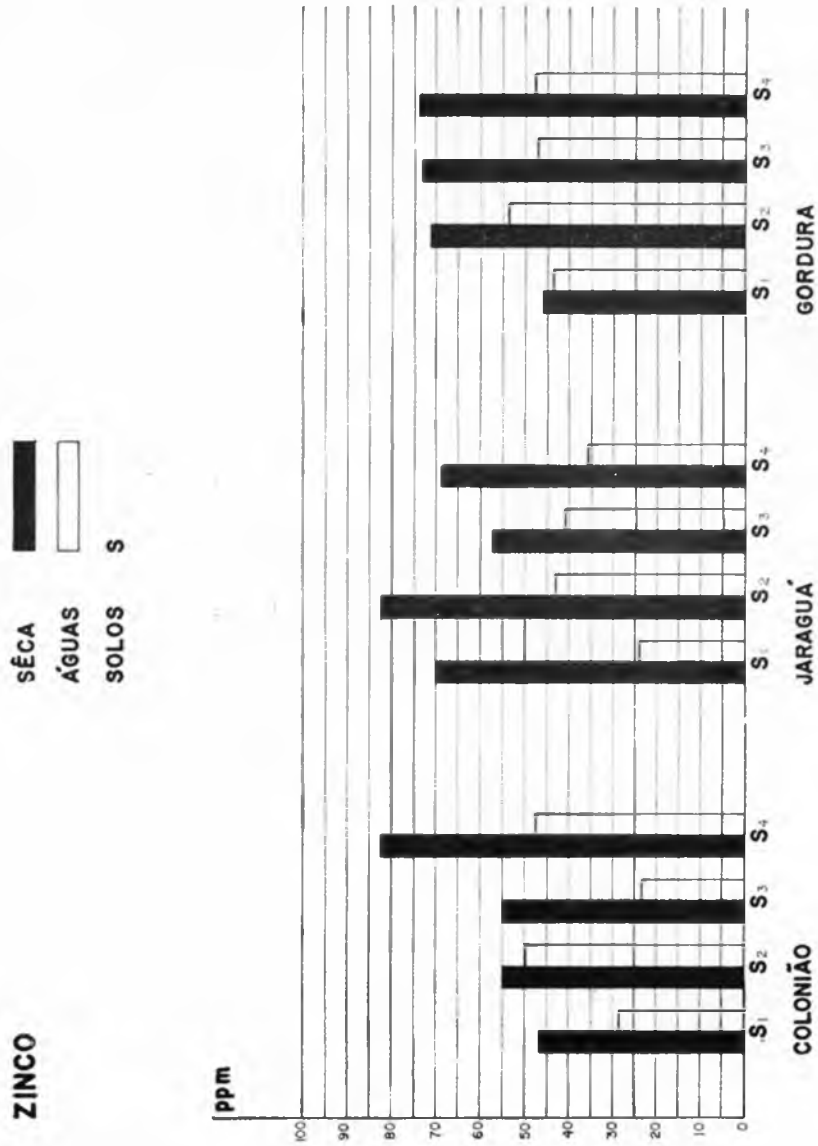


FIG. 2 - TEORES MÉDIOS DO ELEMENTO ZINCO EM PARTES POR MILHÃO, SOBRE A MATÉRIA SÊCA

Transportando-nos para a área da nutrição animal, os resultados consignados na presente investigação parecem fornecer subsídios para orientar eventuais possibilidades de identificação de zonas carenciais envolvendo insuficiência pura e simples de zinco,

observada por diversos autores (16, 17, 18, 19) em bovinos, (21, 22) em ovinos, ou ainda devidas a desequilíbrio das relações cálcio e zinco, descritas em bovinos (8, 12, 13) e suínos (14, 25, 29, 31). D'outra parte, DYNNA & HAVRE (8) identificaram a doença em bovinos jovens provocada por inadequada relação cobre e zinco. As suplementações apenas de molibdeno ou da mistura zinco e molibdeno, agravaram o quadro clínico com acentuada repercussão sobre o ganho de peso. A administração da mistura zinco e cobre recuperava a saúde dos animais.

Isto posto e baseados nos níveis deste elemento, empregados com sucesso nos experimentos em bovinos, — MILLER & MILLER (18), 40 p.p.m. e 260 p.p.m., CUNHA et alii (6), 100 p.p.m., DYNNA & HAVRE (8), 53 p.p.m. de zinco e 10 p.p.m. de cobre — e, em ovinos OTT et alii (21), 100 p.p.m., e OTT et alii (22), 18 a 33 p.p.m. e 48 p.p.m. — parece lícito conjecturar que os teores do elemento encontrados no presente trabalho não atenderiam às reais exigências dos animais, principalmente na estação chuvosa e em determinados municípios (tabela III).

TABELA III — Zinco, expresso em partes por milhão sobre matéria seca, de três gramíneas, colhidas em diferentes municípios e épocas do ano.

Tipo de solo	Município	Colonião		Jaraguá		Gordura	
		Sêca	Aguas	Sêca	Aguas	Sêca	Aguas
Série Passa-Dois (S ₁)	Pirassununga	32	37	123	34	44	53
	Piracicaba	52	26	42	22	29	29
	Rio Claro	—	—	72	17	67	39
Série São Bento (S ₂)	Descalvado	—	—	81	26	96	49
	São Pedro	13	64	60	52	63	56
	Botucatu	97	35	94	47	—	—
Série Itararé Tubarão (S ₃)	Araras	49	23	—	—	—	—
	S. Cruz das Palmeiras	—	—	66	48	—	—
	Limelra	26	25	46	17	—	—
	Itú	87	17	27	69	74	48
	Tietê	58	28	91	30	72	46
Série São Roque (S ₄)	S. J. da Boa Vista	89	52	121	52	101	72
	Pinhal	77	27	53	30	49	54
	S. J. do Rio Pardo	45	59	48	31	—	—
	Cabreúva	118	52	—	—	73	33

Confirmando os achados obtidos por outros autores (7, 8, 13, 16), os resultados consignados no presente trabalho, sugerem a adoção de suplemento dêste micronutriente incorporado à mistura mineral destinada aos animais explorados em condições extensivas ou em regime de estabulação.

Em outro sentido, as informações sôbre a influência de vários fatores dietéticos (20, 24, 25, 26, 28), comuns nos alimentos destinados aos suínos e responsáveis pelo desencadeamento da doença, fazem prever a possibilidade de ocorrência de deficiências nessa espécie, em nosso meio. Embora consumindo grande quantidade de alimentos de base e tendo ainda livre acesso a piquetes de gramíneas mais tenras, os suínos ingerem teores insuficientes do elemento determinando efeitos danosos à sua saúde e produtividade.

Estudos, em andamento, ligados à riqueza em zinco e outros micronutrientes nas forragens adequadas aos suínos devem acrescentar informações de interêsse prático.

SUMMARY

The present experiment was undertaken to compare zinc concentrations in the tops of the pasture plants — Colônião (*Panicum maximum*), Jaraguá [*Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf] and Gordura (*Melinis minutiflora*) — three of the main forage species grown on restrict areas at the hinterland of São Paulo State, Brazil.

The samples were collected according with four types of soil, in dry and wet seasons in July and January, respectively, in order to find out the concentrations of this element.

An analysis of the variance of zinc contents in the whole tops showed that the three grasses differed no significantly but there were significant differences between dry season (65 p.p.m.) and damp season (40 p.p.m.).

As the seeds have a high amount of zinc, it seems that this fact has had the greatest influence in determining these wide differences between seasons, once the pasture plants presented different stages of development of their seeds at the harvest.

The mean zinc concentrations in dry season — 60 p.p.m. (*Panicum maximum*), 69 p.p.m. [*Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf] and 66 p.p.m. (*Melinis minutiflora*) — and in wet season — 37 p.p.m. (*Panicum maximum*), 36 p.p.m. [*Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf] and finally, 48 p.p.m. (*Melinis minutiflora*) — emphasized the very low variation in zinc levels among grass species.

The very important role of this element in forage pastures and its relationships with calcium, copper, molybdenum and other dietetic factors, in order to avoid a nutritional disease in cattle, sheep and also in swine were discussed and the necessity to supply this micronutrient in mineral mixture, due to the reduced amounts encountered in the pasture plants was accentuated.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREASI, F.; VEIGA, J. S. M.; MENDONÇA JR., C. X.; PRADA, F.; BARNABÉ, R. C. — Levantamento dos elementos minerais em plantas forrageiras de áreas delimitadas do Estado de São Paulo. I — Cálcio, fósforo e magnésio. *Rev. Fac. Med. vet.*, São Paulo, 7(3):583-604, 1966-67.
2. ANDREASI, F.; MENDONÇA JR., C. X.; VEIGA, J. S. M.; PRADA, F.; MASOTTI, N. — Levantamento dos elementos minerais em plantas forrageiras de áreas delimitadas do Estado de São Paulo. II — Sódio e potássio. *Rev. Fac. Med. vet.*, São Paulo, 7(3):605-614, 1966-67.
3. ANDREASI, F.; VEIGA, J. S. M.; PRADA, F.; MENDONÇA JR., C. X. — Levantamento dos elementos minerais em plantas forrageiras de áreas delimitadas do Estado de São Paulo. III — Ferro e manganês. *Rev. Fac. Med. vet.*, São Paulo, 7(4): 857-870, 1968.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS — Official methods of analysis. 7.^o ed. Washington, Association of Official Agricultural Chemists, 1950.
5. COWLING, H.; MILLER, E. J. — Determination of small amounts of zinc in plant materials: A photometric dithizone method. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 13:145-149, 1941.
6. CUNHA, T. J.; SHIRLEY, R. L.; CHAPMAN, H. L.; AMMERMAN, C. B.; DAVIS, G. K.; KIRK, W. G.; HENTGES JR., J. F. — Mineral for beef cattle in Florida. *Florida Agric. Exp. Sta.*, Gainesville, Bul. 683: 21, 1964.
7. DYNNA, O.; HAVRE, G. N. — Interrelationship of zinc and copper in the nutrition of cattle. A complex zinc-copper deficiency. *Acta Vet. Scand.* 4(3):197-208, 1963.
8. DYNNA, O.; HAVRE, G. N. — Some observations of a complex zinc-copper deficiency in cattle. *Anais IX Congr. Int. Pastagens*, São Paulo, 1:717-721, 1965.
9. GIESEKING, J. E.; SNIDER, H. J.; GETZ, C. A. — Destruction of organic matter in plant material by the use of nitric and perchloric acids. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 7:185-186, 1935.
10. GLADSTONES, J. S.; LONERAGAN, J. F. — Mineral elements in temperate crop and pasture plants. I — Zinc. *Aust. J. Agric. Res.* 18 (3):427-446, 1967.
11. GRAY, L. F.; ELLIS, G. H. — Some interrelationships of copper, molybdenum, zinc and lead in the nutrition of the rat. *J. Nut.* 40(3): 441-452, 1950.
12. HAARANEN, S. — The effect of zinc on itching tail root eczema in cattle. *Nord. Vet. Med.*, 14(4):265-269, 1962.
13. HAARANEN, S. — Some observations on the zinc requirement of cattle for the prevention of itch and hair licking at different calcium levels in the feed. *Nord. Vet. Med.*, 15(7-8):536-542, 1963.
14. HOEFER, J. A.; MILLER, E. R.; ULLREY, D. E.; RITCHE, H. D.; LUECKE, R. W. — Interrelationships between calcium, zinc, iron and copper in swine feeding. *J. Anim. Sci.*, 19(1):249-259, 1960.

15. LAZAR, V. A., *comp.*, — Methods for the determination of mineral elements in plant tissue. *U. S. Plant, Soil and Nutrition Laboratory*: 1-32, s.d.
16. LEGG, S. P.; SEARS, L. — Zinc sulphate treatment of parakeratosis in cattle. *Nature*, London, 186:1061-1062, 1960.
17. MILLER, J. K.; MILLER, W. J. — Development of zinc deficiency in Holstein calves fed a purified diet. *J. Dairy Sci.* 43(2):1854-1856, 1960.
18. MILLER, J. K.; MILLER, W. J. — Experimental zinc deficiency and recovery of calves. *J. Nut.* 76(4):467-474, 1962.
19. MILLS, C. F.; DALGARNO, A. C.; WILLIAMS, R. B.; QUARTMAN, J. — Zinc deficiency and zinc requirements of calves and lambs. *Brit. J. Nut.* 21(3):751-768, 1967.
20. OBERLEAS, D.; MUHRER, M. E.; O'DELL, B. L. — Effects of phytic acid on zinc availability and parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.* 21(1):57-61, 1962.
21. OTT, E. A.; SMITH, W. H.; STOB, M.; BEESON, W. M. — Zinc deficiency syndrome in the young lamb. *J. Nut.* 82(1):41-50, 1964.
22. OTT, E. A.; SMITH, W. H.; STOB, M.; PARKER, H. E.; HARRINGTON, R. B.; BEESON, W. M. — Zinc requirements of the growing lamb fed a purified diet. *J. Nut.* 87(4):458-463, 1965.
23. PIMENTEL GOMES, F. — Curso de Estatística Experimental. 2.^a ed. Piracicaba, Edições Didáticas, 1963.
24. POND, W. G.; CHAPMAN, Ph.; WALKER, E. JR. — Influence of dietary zinc, corn oil and cadmium on certain blood components, weight gain and parakeratosis in young pigs. *J. Anim. Sci.* 25(1):122-127, 1966.
25. POND, W. G.; JONES, J. R.; KROENING, G. H. — Effect of level of dietary zinc and source and level of corn on performance and incidence of parakeratosis in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 23(1):16-20, 1964.
26. SHANKLIN, S. H.; MILLER, E. R.; ULLREY, D. E.; HOEFER, J. A.; LUECKE, R. W. — Zinc requirement of baby pigs on casein diets. *J. Nut.* 96(1):101-108, 1968.
27. SMITH, S. E.; LARSON, E. — Zinc toxicity in rats. Antagonistic effects of copper and liver. *J. Biol. Chem.* 163:29-38, 1946.
28. SMITH, W. H.; PLUMLEE, M. P.; BEESON, W. M. — Effect of source of protein on zinc requirement of the growing pig. *J. Anim. Sci.*, 21(3):399-405, 1962.
29. TUCKER, H. F.; SALMON, W. D. — Parakeratosis or zinc deficiency disease in the pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88:613-616, 1955.
30. UNDERWOOD, E. J. — Trace elements in Human and Animal Nutrition. New York, Academic Press Inc., 1956.
31. VALEE, B. L. — Biochemistry, physiology and pathology of zinc. *Physiol. Rev.* 39:443-490, 1959.