

## Effect of different doses of an injectable compound of Cu, Zn and Mn on bio-productive indicators of milking cows

## Efecto de diferentes dosis de un compuesto inyectable de Cu, Zn y Mn en parámetros bioprodutivos de la vaca lechera

E. Noval<sup>1</sup>, J. Ramón<sup>1</sup>, R. García-López<sup>2</sup> and J. Jiménez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central de las Villas "Marta Abreu". Carretera a Camajuani, km 5,5. Santa Clara (54830), Villa Clara, Cuba

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque

<sup>3</sup>Unidad Básica de Producción Agropecuaria "Desembarco del Granma". Antón Díaz, Santa Clara. Villa Clara  
Email: ernestona@uclv.edu.cu

Different doses of an injectable compound of Cu, Zn and Mn on bio-productive indicators of milking cows. Four groups were formed, with seven cows each, belonging to Siboney de Cuba (5/8 Holstein 3/8 Zebu) breed genotype, with eight months of gestation. Each group was assigned with the following treatments: A) control; B) 25 mg of Cu, 50 mg of Zn and 25 of Mn; C) 50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn and D) 75 mg of Cu, 150 mg of Zn and 75 mg of Mn, provided every two months up to completing three applications. Serum concentrations of Cu and Zn and bio-productive indicators were evaluated. Two groups with five cows were formed: one of them received C treatment and the other, used as control, was destined to evaluate hepatic reserves of Cu, Zn and Mn. C and D treatments increased significantly ( $P < 0.05$ ) serum concentrations of Cu and Zn regarding the rest of them. C treatment increased significantly ( $P < 0.05$ ) the hepatic levels of Zn and Cu, and Mn ( $P < 0.001$ ). Reproductive indicators were better ( $P < 0.05$ ) in cows that received C and D treatments, showing the highest levels of milk production ( $P < 0.05$ ), after 60 d of lactation, regarding A and B groups. It can be concluded that C and D treatment were more effective to reestablish the organic levels of these microelements and favor productive and reproductive indicators of animals.

**Key words:** copper, zinc, manganese, doses, injectable, indicator, milking cows

Bovine milk production in Cuba is developed under grazing conditions, with climatic and management conditions that are negative and affect the intake of coarse food with low level of yield and quality. During dry period, nutritional deficit is intensified. Mineral supplementation is poor and lacking of trace minerals (García *et al.* 2010a).

Feeds for bovine cattle not always fulfill the requirements of milking cows for production and, many times, the contribution of trace minerals is unknown (Genther and Hansen 2014). Zn, Cu and Mn are affected due to the antagonism of Mo, Fe, S, and Ca concentrations, among other minerals supplied by feeds (Nayeri *et al.* 2014).

In Cuba, there are severe deficiencies of Cu and Zn in milking cows, in the western (Valera *et al.* 2011, Figueredo 2016), central (García *et al.* 2010a, Noval *et al.* 2014) and eastern (Fajardo *et al.* 2011, Galindo *et al.* 2014).

Se evaluaron diferentes dosis de un compuesto inyectable de Cu, Zn y Mn en los parámetros bioprodutivos de la vaca lechera. Se formaron cuatro grupos, de siete vacas cada uno, pertenecientes al genotipo racial Siboney de Cuba (5/8 Holstein 3/8 Cebú), con ocho meses de gestación. A cada grupo se le asignaron los tratamientos siguientes: A) control; B) 25 mg de Cu, 50 mg de Zn y 25 de Mn; C) 50 mg de Cu, 100 mg de Zn y 50 mg de Mn y D) 75 mg de Cu, 150 mg de Zn y 75 mg de Mn, administrados cada dos meses hasta completar tres aplicaciones. Se evaluaron las concentraciones séricas de Cu y Zn y los indicadores bioprodutivos. Se conformaron dos grupos de cinco vacas: uno recibió el tratamiento C y otro, utilizado como control, se destinó a evaluar las reservas hepáticas de Cu, Zn y Mn. Los tratamientos C y D aumentaron significativamente ( $P < 0.05$ ) las concentraciones séricas de Cu y Zn con respecto a los restantes. El tratamiento C incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) los niveles hepáticos de Zn y Cu y Mn ( $P < 0.001$ ). Los indicadores reproductivos fueron mejores ( $P < 0.05$ ) en las vacas que recibieron los tratamientos C y D, que mostraron mayores niveles de producción láctea ( $P < 0.05$ ), a partir de los 60 d de lactancia, con respecto a los grupos A y B. Se concluye que los tratamientos C y D resultaron más eficaces para restablecer los niveles orgánicos de estos microelementos y favorecer los indicadores reproductivos y productivos de los animales.

**Palabras clave:** cobre, zinc, manganese, dosis, inyectable, parámetros, vaca lechera.

La producción de leche vacuna en Cuba se desarrolla en condiciones de pastoreo en circunstancias climáticas y de manejo que resultan adversas y afectan el consumo de alimentos voluminosos de bajo rendimiento y calidad. Durante el período poco lluvioso, el déficit nutricional se acentúa. La suplementación mineral es pobre y carente de minerales trazas (García *et al.* 2010a).

Los alimentos para el ganado vacuno no siempre satisfacen los requerimientos de la vaca lechera en producción y, en muchas ocasiones, se desconoce su aporte en minerales trazas (Genther y Hansen 2014). El Zn, el Cu y el Mn se afectan por el antagonismo de las concentraciones de Mo, Fe, S, Ca, entre otros minerales que aportan los alimentos (Nayeri *et al.* 2014).

En Cuba se conocen severas deficiencias de Cu y Zn en vacas lecheras, en la región occidental (Valera *et al.* 2011, Figueredo 2016), central (García *et al.* 2010a, Noval *et al.* 2014) y oriental (Fajardo *et al.* 2011, Galindo *et al.* 2014).

al. 2014) regions.

Mineral supplementation in milking cows have a beneficial effect on the immune condition of the animal, resistance to diseases, feed intake (McDowell and Arthington 2005), energy and oxidative metabolism (Spears and Weiss 2008) and reproduction (Nemec *et al.* 2012).

Zn, Cu and Mn have an important function on fertility of milking cows (Nayeri *et al.* 2014). In Cuba, a negative correlation was demonstrated ( $p < 0.05$ ) between cupremia and reproductive indicators, in a range of serum copper between  $9.8 \pm 1.0$  and  $14.0 \pm 0.9 \mu\text{mol/L}$ . It was also confirmed that deficiency of this microelement is a significant risk factor for the appearance of anestrus and repetition of service (García *et al.* 2010b).

Parental supplementation of minerals reduces the interactions occurring during its ingestion and absorption, avoids mineral antagonism and increases organic reserves of the animal (Pogge *et al.* 2012). Injectable supply of Cu every two months, up to completing three applications, increased cupremia and hepatic reserve, and benefited reproductive performance of bovine females (García *et al.* 2012a, b).

The objective of this study was to evaluate different doses of an injectable compound of Cu, Zn and Mn on bio-productive indicators of milking cows.

### Materials and Methods

This research was carried out during dry period (November-May) of 2011, in a milking herd from a Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) from the central region of Cuba, with a predominance of typical carbonated brown soils (Hernández *et al.* 2015).

Animals under study were grazing in a rotational system of natural grasses during the day. At night, they were grazing in areas of *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115, associated with *Neonotonia wightii* and *Teramnus labialis*.

Supplementation was accomplished according to DDGs productive level, at a rate of 2.4 kg DM and urea (0.08 kg DM). Cows were manually milked, at double milking and with a restrained suckling system.

*Experimental design.* The effect of supplementation with Cu, Zn and Mn on blood serum was evaluated, as well as the productive and reproductive response of cows. An amount of 28 crossbred Holstein x Zebu cows, with eight months of gestation, between six and seven years old, in the third and fourth gestation, was used. Body condition (BC) was between three and four at a scale of five points (Parker 1989), with  $11.8 \pm 1.2 \text{ L cow}^{-1} \text{ day}^{-1}$  as mean of previous milk production.

Four groups of seven animals were established, randomly distributed. Treatments consisted on a control group, which had no parenteral supplementation of the

La suplementación mineral en vacas lecheras tiene efecto beneficioso en la condición inmune del animal, la resistencia a enfermedades, el consumo de alimentos (McDowell y Arthington 2005), el metabolismo oxidativo y energético (Spears y Weiss 2008) y la reproducción (Nemec *et al.* 2012).

El Zn, Cu y Mn tienen una función importante en la fertilidad de la vaca lechera (Nayeri *et al.* 2014). En Cuba, se demostró correlación negativa ( $p < 0.05$ ) entre la cupremia y los indicadores reproductivos, en un rango de cobre sérico entre  $9.8 \pm 1.0$  y  $14.0 \pm 0.9 \mu\text{mol/L}$ . se comprobó además que la deficiencia de este microelemento es un factor de riesgo significativo para la presentación del anestro y la repetición de servicio (García *et al.* 2010b).

La suplementación parenteral de minerales reduce las interacciones que ocurren durante su digestión y absorción, evita el antagonismo mineral e incrementa las reservas orgánicas en el animal (Pogge *et al.* 2012). La administración de Cu inyectable cada dos meses, hasta completar tres aplicaciones, incrementó la cupremia y la reserva hepática, además de beneficiar el comportamiento reproductivo de las hembras bovinas (García *et al.* 2012a, b).

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes dosis de un compuesto inyectable de Cu, Zn y Mn en los parámetros bioproductivos de la vaca lechera.

### Materiales y Métodos

La investigación se realizó durante el período poco lluvioso (noviembre-mayo) de 2011 en un rebaño lechero de una Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) de la región central de Cuba, con suelos predominantes pardos con carbonatos típicos (Hernández *et al.* 2015).

Los animales en estudio se encontraban en pastoreo, en un sistema rotacional de pastos naturales durante el día. En la noche pastaban en áreas de *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115, asociado a las leguminosas *Neonotonia wightii* y *Teramnus labialis*.

Se suplementó según el nivel productivo DDGs, a razón de 2.4 kg MS y urea (0.08 kg MS). Las vacas se ordeñaban de forma manual, a doble ordeño y con sistema amamantamiento restringido.

*Diseño experimental.* Se evaluó el efecto de la suplementación de Cu, Zn y Mn en suero sanguíneo y la respuesta reproductiva y productiva de las vacas. Se utilizaron 28 vacas mestizas de Holstein por Cebú, con ocho meses de gestación, entre seis y siete años de edad, en tercera y cuarta lactancia. La condición corporal (CC) era de tres a cuatro en la escala de cinco puntos (Parker 1989), con media de producción láctea previa de  $11.8 \pm 1.2 \text{ L vaca}^{-1} \text{ día}^{-1}$ .

Se conformaron cuatro grupos de siete animales, distribuidos aleatoriamente. Los tratamientos consistieron en un grupo control, al que no se le aplicó la suplementación parenteral de los elementos minerales en estudio. Los otros tres grupos recibieron

mineral elements of this study. The other three groups received a supplementation of 25, 50, 25; 50, 100, 50 and 75, 150, 75 mg of Cu, Zn and Mn, respectively.

All the animals showed serum deficiency of Cu and Zn (concentrations inferior to 11.77 and 12.62  $\mu\text{mol/L}$ , respectively). From a clinical point of view, they were healthy according to a previous diagnose (Sotolongo 2007). The lack of Mn, diagnosed in herds, was determined by its deficiency on soil and grass (Noval *et al.* 2014).

The first supply of micro-elements was performed at eight months of gestation and it was repeated every two months up to completing three applications (30 and 90 d after parturition). Every animal underwent a dynamics of cupremia and zinc supplementation, before and every 15 d after the supply of treatments for two months. The maximum serum concentration of Cu and Zn was determined, as well as the time of declination of these values. At 60 d, a final sampling was performed to determine the appearance or not of hypo-cupremia and hypo-zinc supplementation during this period.

From the results of this experiment, two experimental groups were established, with five cows each. One was used as control and the other was parenterally supplemented with C dose. Animal selection was performed according to previously described inclusion criteria, although they were animals destined to sacrifice due to their low milk production. The influence of the supply of these microelements on hepatic reserves was evaluated. Animals were slaughtered at 15 d after the application of the product, which coincided with the peak of cupremia and zinc supplementation, determined during the previous stage.

*Sample taking, used procedures and techniques.* Through jugular venipuncture, 10 mL of blood were taken, before and every fifteen days after treatment. These samples were located in sterilized and demineralized anticoagulant tubes. Later, they were centrifuged at 3,500 rpm for 10 min., obtaining the blood serum. Liver samples were taken during the 15 min. after the animal slaughter. Samples from the ventral edge of the right lobule (15  $\text{cm}^3$ ) were obtained, with a previous general inspection of this viscera in order to discard any alteration.

Samples of blood serum and hepatic tissue were preserved at  $-10^\circ\text{C}$  up to the analysis. Determinations of Cu, Zn and Mn were performed by atomic absorption spectrophotometry (Miles *et al.* 2001), with a SP-9 equipment, PYE UNICAM brand, according to procedures of manufacturer.

*Calculation of reproductive indicators.* The main reproductive indicators (parturition-first insemination period (PFIP), service period (SP), parturition-parturition period (PPP), insemination index (II) and percentage of gestation at first service) were determined according to procedures recommended by Brito (2010). In addition, milk production of each animal was determined during

la suplementación de 25, 25; 50, 100, 50 y 75, 150, 75 mg de Cu, Zn y Mn, respectivamente.

Todos los animales presentaban deficiencia sérica de Cu y Zn (concentraciones inferiores a 11.77 y 12.62  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente). Desde el punto de vista clínico, estaban sanos según diagnóstico previo (Sotolongo 2007). El estado carencial de Mn, diagnosticado en estos rebaños, se determinó por su deficiencia en el suelo y pasto (Noval *et al.* 2014).

La primera administración de los microelementos se efectuó a los ocho meses de gestación y se repitió cada dos meses hasta completar tres aplicaciones (30 y 90 d postparto). A todos los animales se les realizó una dinámica de cupremia y cinquemia, antes y cada 15 d posterior a la administración de los tratamientos durante dos meses. Se determinó la máxima concentración sérica de Cu y Zn, así como el tiempo de declinación de estos valores. A los 60 d se realizó un muestreo final para determinar la aparición o no de hipocupremia e hipocinquemia en este período.

A partir de los resultados del experimento se conformaron dos grupos experimentales, de cinco vacas cada uno. Se utilizó uno como control y otro suplementado parenteralmente con la dosis C. La selección de los animales se realizó según los criterios de inclusión antes descritos, aunque eran animales destinados al sacrificio por baja producción láctea. Se evaluó la influencia del suministro de estos microelementos en las reservas hepáticas. Los animales se sacrificaron a los 15 d de aplicado el producto, etapa que coincidió con el pico de cupremia y cinquemia determinado en la etapa anterior.

*Toma de muestras, técnicas y procedimientos utilizados.* Por venopunción de la yugular, se tomaron 10 mL de sangre, antes y cada quince días posteriores al tratamiento. Se depositaron en tubos sin anticoagulante, esterilizados y desmineralizados. Luego, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min. y se obtuvo el suero sanguíneo. Las muestras de hígado se tomaron durante los 15 min. posteriores al sacrificio de los animales. Se obtuvieron muestras del borde ventral del lóbulo derecho (15  $\text{cm}^3$ ), con previa inspección general de la viscera para descartar alguna alteración.

Las muestras de suero sanguíneo y tejido hepático se conservaron a  $-10^\circ\text{C}$  hasta el análisis. Se realizaron las determinaciones de Cu, Zn y Mn por espectrofotometría de absorción atómica (Miles *et al.* 2001) en un equipo SP-9 de la firma PYE UNICAM, según los procedimientos del fabricante.

*Cálculo de los indicadores reproductivos.* Se determinaron los principales indicadores reproductivos (intervalo parto-primera inseminación (IPPI), período de servicio (PS), intervalo parto-parto (IPP), índice de inseminación (II) y porcentaje de gestaciones al primer servicio según los procedimientos recomendados por Brito (2010). Además, se determinó la producción láctea de cada animal durante los primeros 240 d de lactancia.

*Pesaje de leche.* Se realizó pesaje de la producción

the first 240 d of lactation.

**Milk weighing.** Weighing of individual milk production per month was carried out by means of a certified scale, dynamometer type and graduated in kilograms.

**Statistical procedure.** In order to compare concentrations of Cu and Zn in blood serum among the different groups in each sampling, reproductive indicators (PFIP, SP, PPP and II) and milk production in each weighing, an analysis of variance of simple classification (ANOVA) was performed. Duncan (1955) test was used to compare means in the cases with significant differences, with a previous verification of variance homogeneity. Comparison of hepatic reserves of microelements was conducted through t-Student test for independent samples. Statgraphics Centurion (StatPoint Technologies 2010) program was used for each procedure.

### Results and Discussion

Table 1 shows results of parenteral supplementation of the different studied doses on Cu levels in blood. At the beginning of this research (day 0), there were no significant differences among the four groups. However, levels of cupremia were significantly superior ( $P < 0.001$ ) in treatments with 50, 100, 50 and 75, 150, 75 mg of Cu, Zn and Mn respectively, at 15, 30 and 45 d, regarding the control group and the treatment with 25, 50 and 25 mg of Cu, Zn and Mn, respectively. At 60 d, there were no differences ( $P > 0.05$ ) in cupremia among the groups supplemented with 25, 50, 25; 50, 100 and 50; 75, 150 and 75 mg of and Mn, respectively. The same happened between control and treatment with 25, 50 and 25 mg de Cu, Zn and Mn.

Cu blood levels, for C and D treatments, reached standard physiological patterns for bovine species (McDowell and Arthington 2005) and they maintained for 60 d, moment in which they began to decrease under the critical limit of deficiency, suggested by McDowell and Arthington (2005).

These results are similar to those obtained by García *et al.* (2012a), who increased cupremia and reached its peak at five days after treatment, when it is stabilized up to 15 d, and began to have a significant decrease and

individual de leche mensualmente mediante una pesa tipo dinamómetro graduada en kilogramos y certificada.

**Procedimiento estadístico.** Para comparar las concentraciones de Cu y Zn en suero sanguíneo entre los diferentes grupos en cada muestreo, los indicadores reproductivos (IPPI, PS, IPP e II) y la producción láctea en cada pesaje se realizó un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA). Se utilizó la prueba de Duncan (1955) para comparar las medias en los casos con diferencias significativas, con previa verificación de la homogeneidad de varianza. La comparación de las reservas hepáticas de microelementos se realizó mediante una prueba de t-Student para muestras independientes. En todos los procesamientos se utilizó el programa Statgraphics Centurion (StatPoint Technologies 2010).

### Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra los resultados de la suplementación parenteral de las diferentes dosis en estudio en los niveles de Cu en sangre. Al comienzo de la investigación (día 0) no se apreciaron diferencias significativas entre los cuatro grupos. Sin embargo, los niveles de cupremia resultaron significativamente superiores ( $P < 0.001$ ) en los tratamientos con 50, 100, 50 y 75, 150, 75 mg de Cu, Zn y Mn respectivamente, a los 15, 30 y 45 d con respecto al grupo control y al tratamiento con 25, 50 y 25 mg de Cu, Zn y Mn, respectivamente. A los 60 d no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) en la cupremia entre los grupos suplementados con 25, 50, 25; 50, 100 y 50; 75, 150 y 75 mg de y Mn, respectivamente. Lo mismo ocurrió entre el control y el tratamiento con 25, 50 y 25 mg de Cu, Zn y Mn.

Los niveles sanguíneos de Cu, para los tratamientos C y D, alcanzaron los parámetros fisiológicos de referencia para la especie bovina (McDowell y Arthington 2005) y se mantuvieron así durante 60 d, momento en que descendieron por debajo del límite crítico de deficiencia sugerido por McDowell y Arthington (2005).

Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por García *et al.* (2012a), quienes incrementaron la cupremia y alcanzaron su pico a los cinco días posteriores al tratamiento, momento en el que se estabiliza hasta los 15 d, cuando comienza a descender significativamente y aparece la hipocupremia ( $< 11.77 \mu\text{mol/L}$ ) a los 60 d.

Table 1. Effect of parenteral supplementation of different concentrations of microelements over blood levels of Cu, expressed in  $\mu\text{mol/L}$

Treatment	Days after treatments				
	0	15	30	45	60
A	10.75	10.78 <sup>c</sup>	10.17 <sup>c</sup>	10.98 <sup>b</sup>	10.95 <sup>b</sup>
B	10.92	11.97 <sup>b</sup>	11.45 <sup>b</sup>	11.32 <sup>b</sup>	11.20 <sup>ab</sup>
C	11.03	13.90 <sup>a</sup>	13.51 <sup>a</sup>	12.34 <sup>a</sup>	11.53 <sup>a</sup>
D	10.75	14.26 <sup>a</sup>	13.37 <sup>a</sup>	12.42 <sup>a</sup>	11.57 <sup>a</sup>
± SE	0.17	0.20	0.27	0.20	0.11

<sup>a, b</sup> Different letters in superscripts within the same column indicate significant differences  $P < 0.05$  (Duncan 1955). A: Control. B: 25 mg of Cu, 50 mg of Zn and 25 of Mn. C: 50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn. D: 75 mg of Cu, 150 mg of Zn and 75 mg of Mn. SE: standard error

hypo-cupremia appears ( $< 11.77 \mu\text{mol/L}$ ) at 60 d.

García *et al.* (2012a) conducted determinations of serum Cu every five days, which may be the cause for the non-coincidence of cupremia peak regarding the results of this study. Another aspect that could have influenced is that those authors provided Cu alone, and this study supplemented it combined with Zn and Mn.

Table 2 shows blood levels of Zn at different moments, before and after the parenteral application of mineral compounds. Before the supplementation (day 0) and at 60 d, there were no differences ( $P > 0.05$ ) among treatments. However, treatments with 50, 100, 50 and 75, 150, 75 mg of Cu, Zn and Mn, respectively, were superior to control group and to the one of lowest concentration of minerals under study at 15, 30 and 45 d. Values of zinc supplementation were superior to standard ( $12.62 \mu\text{mol/L}$ ) physiological values (McDowell and Arthington 2005).

In Angus and Simental cattle, with parenteral supplementation of Cu, Zn, and Mn, cupremia tended to increase. Serum concentrations of Zn and Mn had a significant increase at 15 d after treatment regarding control, while Mn tended to be superior (Pogge *et al.* 2012).

Concentration of microelements on the hepatic tissue (table 3) had statistical differences on Zn ( $P < 0.05$ ), Cu and Mn ( $P < 0.001$ ) levels, favoring the animals treated with the injectable compound of these microelements. In all cases, their hepatic concentrations reached superior values to those of the physiological limits for bovine species, reported by García *et al.* (2012a), after studying Cu supplementation on milking cows.

Liver Zn and Cu concentrations of this research are similar to other publications, pointing out that hepatic Zn ranges between 100 and 400 mg/kg on dry basis, and Cu varies from 200 to 300 mg/kg. Concentrations become toxic when their levels on this organ are superior to 900 mg/kg on dry basis (McDowell and Arthington 2005).

In this study, hepatic levels of Mn are similar to those reported by NRC (2001), and range between 10 and 24 mg/kg on dry basis. In addition, liver Mn concentrations

García *et al.* (2012a) realizaron las determinaciones de Cu séricos cada cinco días, lo que puede ser la causa de la no coincidencia del pico de cupremia con respecto a lo obtenido en este trabajo. Otro aspecto que pudo influir es que esos autores administraron el Cu solo y, en este estudio, se suplementó combinado con Zn y Mn.

La tabla 2 muestra los niveles sanguíneos de Zn en los diferentes momentos, antes y luego de la aplicación parenteral del compuesto de minerales. Antes de la suplementación (día cero) y a los 60 d no difirieron ( $P > 0.05$ ) entre los cuatro tratamientos. En cambio, los tratamientos con 50, 100, 50 y 75, 150, 75 mg de Cu, Zn y Mn respectivamente fueron superiores ( $P < 0.001$ ) al grupo control y al de menor concentración de los minerales en estudio a los 15, 30 y 45 d. Los valores de zinquemia fueron superiores a los valores fisiológicos ( $12.62 \mu\text{mol/L}$ ) de referencia (McDowell y Arthington 2005).

En ganado Angus y Simental, con la suplementación parenteral de Cu, Zn, Mn, la cupremia tuvo tendencia al incremento. Las concentraciones séricas de Zn y Mn aumentaron significativamente a los 15 d posteriores al tratamiento con respecto al control, mientras que el Mn hubo tendencia a ser superiores (Pogge *et al.* 2012).

Las concentraciones de microelementos en tejido hepático (tabla 3) tuvieron diferencias estadísticas en los niveles de Zn ( $P < 0.05$ ), Cu y Mn ( $P < 0.001$ ), a favor de los animales tratados con el compuesto inyectable de estos microelementos. En todos los casos, sus concentraciones hepáticas alcanzaron valores superiores a los de los límites fisiológicos de la especie bovina, informados por García *et al.* (2012a) al estudiar la suplementación con Cu en vacas lecheras.

Las concentraciones de Zn y Cu en hígado en esta investigación están en correspondencia con otras publicaciones que señalan que el Zn hepático fluctúa entre 100 a 400 mg/kg en base seca, y el Cu entre 200 y 300 mg/kg. Las concentraciones se hacen tóxicas, cuando los niveles en ese órgano exceden los 900 mg/kg sobre base seca (McDowell y Arthington 2005).

En este estudio, los niveles hepáticos de Mn están en correspondencia con los informados por NRC (2001), y oscilan entre 10 a 24 mg/kg en base seca. Además, las concentraciones de Mn en el hígado son directamente

TABLE 2. Effect of parenteral supplementation of different concentrations of microelements over blood levels of Zn, expressed in  $\mu\text{mol/L}$

Treatment	Days after treatments				
	0	15	30	45	60
A	12.22	12.22 <sup>b</sup>	11.69 <sup>b</sup>	11.75 <sup>b</sup>	11.77
B	12.19	12.45 <sup>b</sup>	12.99 <sup>b</sup>	12.45 <sup>b</sup>	12.19
C	12.38	14.84 <sup>a</sup>	15.15 <sup>a</sup>	13.14 <sup>a</sup>	12.09
D	12.44	15.15 <sup>a</sup>	15.05 <sup>a</sup>	13.33 <sup>a</sup>	12.31
± SE	0.17	0.21	0.16	0.21	0.19

<sup>a, b</sup> Different letters in superscripts within the same column indicate significant differences  $P < 0.05$  (Duncan 1955). A: Control. B: 25 mg of Cu, 50 mg of Zn and 25 of Mn. C: 50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn. D: 75 mg of Cu, 150 mg of Zn and 75 mg of Mn. SE: standard error

TABLE 3. Performance of Cu, Zn and Mn concentrations in hepatic tissues of animals parenterally treated with 50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn.

Variables	Groups			± EE
	CL	Control± DE	Treated± DE	
Cu (ppm)	75	57.55	202.93	12.67***
Zn (ppm)	160	165.7	253.72	19.48*
Mn (ppm)	6	5.17	10.97	0.27*

<sup>a,b</sup>Different letters in the same row indicate significant statistical differences, \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 according to (t-Student), SE: standard error, CL: critical limit

are directly proportional to those of this mineral on the consumed feed.

C treatment (50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn) was used for evaluating concentration of those mineral on hepatic tissue because serum concentrations of Cu and Zn of animals supplemented with this treatment differed significantly from the group of cows treated with D dose. In addition, in C treatment, a lower concentration of microelements under study was used, so it was more economic.

Determination of hepatic concentrations is the most precise method for evaluating organic reserves of these minerals, especially Cu and Zn, and also for determining the efficiency of the supplementation because the liver is the reserve organ and it is the accurate indicator of the state of these minerals in the organism (Rosa *et al.* 2008).

Reproductive performance of these animals was favored by treatments with 50, 100, 50; 75, 150, 75 mg of Cu, Zn and Mn, respectively (table 4). In these treatments, there was a significant (P<0.001) reduction of the PFIP, SP, PPP and II, regarding the group control and that of lowest concentration.

proporcionales a las de ese mineral en el alimento consumido.

Se utilizó el tratamiento C (50 mg de Cu, 100 mg de Zn y 50 mg de Mn) para evaluar las concentraciones de esos minerales en tejido hepático, ya que las concentraciones séricas de Cu y Zn de los animales suplementados con este tratamiento difirieron significativamente del grupo de vacas tratadas con la dosis D. Además, en el tratamiento C, se empleó una concentración menor de los micro elementos en estudio y por tanto, más económica.

La determinación de las concentraciones hepáticas es el método más preciso para evaluar las reservas orgánicas de estos minerales, especialmente de Cu y Zn, y también para determinar la eficacia de la suplementación efectuada, pues es el hígado el órgano de reserva y verdadero indicador del estado de estos minerales en el organismo (Rosa *et al.* 2008).

El comportamiento reproductivo de los animales se favoreció por los tratamientos con 50, 100, 50; 75, 150, 75 mg de Cu, Zn y Mn, respectivamente (tabla 4). En estos tratamientos se redujo significativamente (P<0.001) el IPPI, PS, IPP y el II, con respecto al grupo

Table 4. Effect of parenteral supplementation of different concentrations of microelements over the main reproductive indicators

Reproductive indexes	Treatments				± SE
	A	B	C	D	
PFIP (days)	179.00 <sup>b</sup>	168.00 <sup>b</sup>	128.6 <sup>a</sup>	114.42 <sup>a</sup>	8.89
SP (days)	211.00 <sup>b</sup>	201.00 <sup>b</sup>	139.50 <sup>a</sup>	136.00 <sup>a</sup>	11.31
PPP (days)	490.60 <sup>b</sup>	484.62 <sup>b</sup>	420.62 <sup>a</sup>	417.00 <sup>a</sup>	11.26
II (U)	2.00	1.75	1.50	1.42	0.29

<sup>a,b</sup>Different letters in superscripts within the same column indicate significant differences P<0.05 (Duncan 1955). A: Control. B: 25 mg of Cu, 50 mg of Zn and 25 of Mn. C: 50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn. D: 75 mg of Cu, 150 mg of Zn and 75 mg of Mn. SE: standard error

Supplementation of a mineral compound of Zn, Cu, Mn and Co glucoheptonate reduced parturition-first insemination periods and parturition-gestation in 12 and 62 d, respectively, in milking cows, compared with the group that received no treatment. In the supplemented animals, conception services were 1.80 and, in control group, 2.60, as reported by Uchida *et al.* (2001).

According to reports of Campbell *et al.* (1999), in an experiment in which inorganic and organic

control y el de menor concentración.

La administración de un compuesto mineral de Zn, Cu, Mn y glucoheptonato de Co en vacas lecheras redujo los intervalos parto primer servicio y parto gestación en 12 y 62 d, respectivamente, en comparación con el grupo que no recibió tratamiento. En los animales suplementados, los servicios por concepción fueron de 1.80 y en grupo control, de 2.60 según refirieron Uchida *et al.* (2001).

De acuerdo con informes de Campbell *et al.* (1999),

minerals were supplemented to cows with voluntary waiting periods of 60 d, there were no differences in days at the first service, parturition-conception periods and first service to gestation, and services per gestation among animals, according to the mineral source.

In Cuba, injectable Cu supplementation favored reproductive performance of animals with hypocupremic and normal-cupremic animals, with cupremia next to 14  $\mu\text{mol/L}$  / L (García *et al.* 2012b). Parenteral supply of 50 mg Cu in female bovines at eight months of gestation, without knowing the state of serum Cu, favored postpartum reproductive performance (Figueredo 2016).

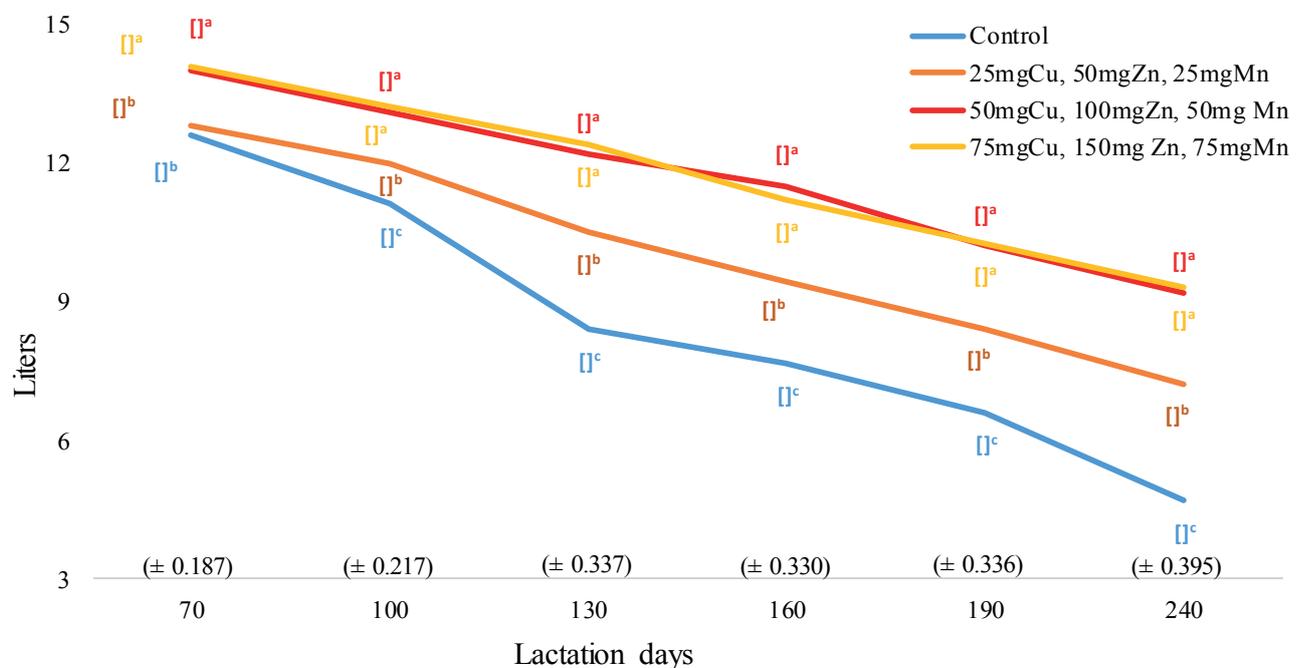
Milk production means of groups supplemented with 50, 100, 50; 75, 150, 75 mg of Cu, Zn and Mn, respectively, had no significant differences. However, there were differences regarding control group and that of lower concentration of Cu, Zn and Mn (figure 1).

en un experimento en el que se suplementaron minerales inorgánicos y orgánicos a vacas con período de espera voluntario de 60 d no hubo diferencias en días al primer servicio, intervalos parto concepción y primer servicio a la gestación, y servicios por gestación entre los animales, según la fuente mineral.

En Cuba, la suplementación de Cu inyectable favoreció el comportamiento reproductivo de los animales hipo y normocupremicos, con cupremias próximas a 14  $\mu\text{mol/L}$  (García *et al.* 2012b). La administración parenteral de 50 mg de Cu en las hembras bovinas a los ocho meses de gestación, sin conocerse el estado del Cu sérico favoreció el comportamiento reproductivo posparto (Figueredo 2016).

Las medias de producción de leche de los grupos suplementados con 50, 100, 50; 75, 150, 75 mg de Cu, Zn y Mn, respectivamente no difirieron de manera significativa, pero sí con respecto al grupo control y al de menor concentración de Cu, Zn y Mn (figura 1).

El aumento significativo en la producción láctea de



<sup>a, b</sup>Means with superscript have statistical differences among lactation times at  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

Figure 1. Effect of different doses of mineral supplement on milk production (SE)

Significant increase of milk production of groups supplemented with 50, 100, 50; 75, 150, 75 mg of Cu, Zn and Mn, respectively, regarding control group and that of the lowest applied doses, could be favored by the significant increase provoked by supplementation to blood and hepatic concentrations of Cu (table 1) and Zn (table 2).

Rises of milk production increased mineral requirements and marginal deficiencies of microelements, decreased productive levels and affected the functioning of many enzymes and proteins, involving different physiological, biochemical and metabolic processes, as well as the functioning of

los grupos suplementados con 50, 100, 50; 75, 150, 75 mg de Cu, Zn y Mn respectivamente, con respecto al grupo control y al de menor dosis aplicada, se pudo favorecer por el incremento significativo que provoca la suplementación en las concentraciones sanguíneas y hepáticas de Cu (tabla 1) y Zn (tabla 2).

Los incrementos en la producción láctea aumentaron los requerimientos minerales y deficiencias marginales de microelementos, disminuyeron los niveles productivos y afectaron el funcionamiento de numerosas enzimas y proteínas, que involucran a diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y metabólicos, así como el funcionamiento del sistema inmune que contribuyen

immune system, contributing to decrease productive potential and defenses of the organism (McDowell & Arthington 2005).

Cu requirements during lactation are 0.15 mg/kg of milk produced during early lactation (< 100 days). Levels of 0.5 mg of Cu are introduced to fetus, placenta and uterine tissues every day, increasing the requirements from 1.5 to 2 mg/day during the last month of gestation. Mn requirements during gestation grow up to 0.3 mg/day at the end of it, and its concentrations are 0.16 mg/kg in colostrum and 0.03 mg/kg in milk. Those of Zn, 12 mg/day are retained during gestation up to 190 days and at the end of it are duplicated (ARC & CAB 1980). Zn content in milk is 4 mg/kg, ranging from 3.4 to 5.8 mg/kg (NRC 2001).

Therefore, transition period increases Cu, Zn and Mn requirements in milking cows and it is the most adequate moment for its supplementation. Similar results to those of this experiment were obtained in the supply of 50 mg of Cu, parenterally, in female bovines at eight months of gestation. It produced an increase of cupremia, immunoglobulin, decreases mastitis and favored postpartum reproductive performance (Figueredo 2016).

Oral mineral supplementation to milking cows, three weeks before parturition, increase milk production in the moment of lactation peak (Kincaid & Socha 2004), between 2.9 and 3.2 % in the thirteenth week (Siciliano-Jones *et al.* 2008) and in the fourteenth week (Hackbart *et al.* 2010).

Supplementing an amino acid complex including Zn, Cu and Mn favors dry matter intake and the functioning of many metalloenzymes like Cu-Zn-superoxide dismutase, carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidase, alkaline phosphatase and RNA polymerase, which act on metabolism of carbohydrates, proteins, lipids and nucleic acids, improving the performance of milking cows (NRC 2001).

Benefits of organic supplements of Cu, Zn and Mn include prevention of mastitis, improvement of fertility and reduction of incidences of podal injuries (Uchida *et al.* 2001, Kellogg *et al.* 2003, 2004), digestibility of nutrients and udder health (Machado *et al.* 2014).

Zn-deficient animals have a low intake and deficient use of nutrients (McDowell & Arthington 2005). In this sense, Rosa *et al.* (2008) state that even with initial symptoms of Zn deficiency, there is a reduction of food efficiency and low production and secretion of hormones.

It can be concluded that parenteral supplementation of 50 mg of Cu, 100 mg of Zn and 50 mg of Mn in milking cows from 8 months of gestation was the most efficient to reestablish organic levels of these microelements and favors reproductive and productive performance of treated animals.

a disminuir el potencial productivo y las defensas del organismo (McDowell & Arthington 2005).

Los requerimientos de Cu durante la lactación son de 0.15 mg/kg de leche producida en la lactancia temprana (< 100 días). Niveles de 0.5 mg de Cu son incorporados en el feto, la placenta, y tejidos uterinos cada día, incrementando los requerimientos entre 1.5 a 2 mg/día durante el último mes de gestación. Los requerimientos de Mn durante la gestación ascienden hasta cerca de 0.3 mg/día al final de la misma y sus concentraciones son de 0.16 mg/kg en el calostro y 0.03 mg/kg en leche. Del Zn se retienen 12 mg/día durante la gestación hasta los 190 días y al final de la misma se duplican (ARC & CAB 1980). El contenido de Zn en la leche es de 4 mg/kg con un rango que puede ir de 3.4 a 5.8 mg/kg (NRC 2001).

Por esta razón, el periodo de transición aumenta los requerimientos de Cu, Zn y Mn en la vaca lechera y es el momento más adecuado para suplementarlos. Resultados similares a los de este experimento se obtuvieron con la administración de 50 mg de Cu por vía parenteral en las hembras bovinas a los ocho meses de gestación, donde la misma produjo un incremento de la cupremia, las inmunoglobulinas, disminuyó la mastitis y favoreció el comportamiento reproductivo posparto (Figueredo 2016).

La suplementación mineral por vía oral a vacas lecheras tres semanas antes del parto incrementó la producción de leche en el momento del pico de lactancia (Kincaid & Socha 2004), entre 2.9 y 3.2 % en la décimo tercera semana (Siciliano-Jones *et al.* 2008) y en la decimocuarta semana (Hackbart *et al.* 2010).

El suministro de un complejo de aminoácidos complejados con Zn, Cu y Mn facilitan el consumo de materia seca, y el funcionamiento de muchas metaloenzimas como la Cu-Zn-superóxidodismutasa, carbonilanhidrasa, alcohol dehidrogenasa, carboxipeptidasa, alcalina fosfatasa y RNA polimerasa, las cuales actúan sobre el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, mejorando así el comportamiento de la vaca lechera (NRC 2001).

Los beneficios de los suplementos orgánicos de Cu, Zn y Mn incluyen la prevención de la mastitis, mejora en la fertilidad y reducción de la incidencia de lesiones pódalas (Uchida *et al.* 2001, Kellogg *et al.* 2003, 2004), la digestibilidad de los nutrientes y la salud de la ubre (Machado *et al.* 2014).

Los animales deficientes en Zn, realizan un bajo consumo y deficiente uso de los nutrientes (McDowell & Arthington 2005); en este sentido Rosa *et al.* (2008), añaden que aun con síntomas iniciales de deficiencia de Zn existe reducción en la eficiencia alimenticia y baja producción y secreción de hormonas.

Se concluye que la suplementación parenteral de 50 mg de Cu, 100 mg de Zn y 50 mg de Mn en vacas lecheras a partir de los 8 meses de gestación resultó la más eficaz para restablecer los niveles orgánicos de estos microelementos y favorece el comportamiento reproductivo y productivo de los animales tratados.

## References

- ARC (Agricultural Research Council) & CAB (Commonwealth Agricultural Bureaux) 1980. The Nutrient requirements of ruminant livestock: technical review. Great Britain: Agricultural Research Council - Commonwealth Agricultural Bureaux, 376 p., ISBN: 978-0-85198-459-9, Available: <[https://books.google.com.cu/books?id=m2g\\_AAAAYAAJ&source=gbs\\_navlinks\\_s&redir\\_esc=y](https://books.google.com.cu/books?id=m2g_AAAAYAAJ&source=gbs_navlinks_s&redir_esc=y)>, [Consulted: June 23, 2016].
- Brito, C. R. 2010. Patología de la reproducción animal. call no. 636, La Habana, Cuba: Félix Varela, 369 p., ISBN: 978-959-07-1279-1.
- Campbell, M. H., Miller, J. K. & Schrick, F. N. 1999. "Effect of Additional Cobalt, Copper, Manganese, and Zinc on Reproduction and Milk Yield of Lactating Dairy Cows Receiving Bovine Somatotropin". *Journal of Dairy Science*, 82(5): 1019–1025, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75322-1.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- Fajardo, H., Viamonte, M. I., Rondón, G., García, L. R., Gutiérrez, O., Sánchez, M. & González, N. 2011. "Hembras bovinas lecheras en pastoreo en el Valle del Cauto. II. Caracterización del perfil metabólico y su influencia en la reproducción". *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 5(2–3): 113–123, ISSN: 1999-4494, 1998-3050.
- Figueredo, Y. 2016. Efecto del cobre parenteral en las inmunoglobulinas séricas, mastitis subclínica y comportamiento reproductivo de vacas preparado Siboney de Cuba. M.Sc. Thesis, Centro de Investigaciones para el mejoramiento Animal en la Ganadería tropical (CIMAGT), La Habana, Cuba, 68 p.
- Galindo, J., Gutiérrez, O., Ramayo, M. & Leyva, L. 2014. "Mineral status of cows and its relationship with the soil-plant system in a dairy unit of the Eastern region of Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(3): 241–245, ISSN: 2079-3480.
- García, D. J. R., Joseph, A. J., Cuesta, M. M., Quiñones, R. R., Munyori, N. H., Figueredo, R. J. M. & Mollineda, T. Á. 2012a. "Effects of parenteral supplementation of Cu in female cattle with different levels of cupremia". *Archives Animal Breeding*, 55(2): 113–122, ISSN: 0003-9438.
- García, D. J. R., Munyori, N. H., Cuesta, M. M., Quiñones, R. R., Figueredo, R. J. M., Noval, A. E. & Mollineda, T. Á. 2012b. "Therapeutic efficacy and pharmacological safety of parenteral supplementation of different concentrations of copper in cows". *Archives Animal Breeding*, 55(1): 25–35, ISSN: 0003-9438.
- García, J. R., Cuesta, M., García López, R., Quiñones, R., Figueredo, J. M., Faure, R., Pedroso, R. & Mollineda, Á. 2010a. "Characterization of the content of microelements in the soil-plant-animal system and its influence on cattle reproduction in the central region of Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(3): 227–231, ISSN: 2079-3480.
- García, J. R., García López, R., Cuesta, M., Figueredo, J. M., Quiñones, R., Faure, R., Pedroso, R. & Mollineda, Á. 2010b. "Blood copper levels and their influence on reproductive indicators of cows in tropical conditions". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(3): 233–239, ISSN: 2079-3480.
- Genther, O. N. & Hansen, S. L. 2014. "A multielement trace mineral injection improves liver copper and selenium concentrations and manganese superoxide dismutase activity in beef steers". *Journal of Animal Science*, 92(2): 695–704, ISSN: 0021-8812, 1525-3163, DOI: 10.2527/jas.2013-7066.
- Hackbart, K. S., Ferreira, R. M., Dietsche, A. A., Socha, M. T., Shaver, R. D., Wiltbank, M. C. & Fricke, P. M. 2010. "Effect of dietary organic zinc, manganese, copper, and cobalt supplementation on milk production, follicular growth, embryo quality, and tissue mineral concentrations in dairy cows". *Journal of Animal Science*, 88(12): 3856–3870, ISSN: 0021-8812, 1525-3163, DOI: 10.2527/jas.2010-3055.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p., ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Kellogg, D. W., Socha, M. T., Tomlinson, D. J. & Johnson, A. B. 2003. "Effects of Feeding Cobalt Glucoheptonate and Metal Specific Amino Acid Complexes of Zinc, Manganese, and Copper on Lactation and Reproductive Performance of Dairy Cows". *The Professional Animal Scientist*, 19(1): 1–9, ISSN: 1080-7446, 1525-318X, DOI: 10.15232/S1080-7446(15)31367-X.
- Kellogg, D. W., Tomlinson, D. J., Socha, M. T. & Johnson, A. B. 2004. "Effects of Zinc Methionine Complex on Milk Production and Somatic Cell Count of Dairy Cows: Twelve-Trial Summary". *The Professional Animal Scientist*, 20(4): 295–301, ISSN: 1080-7446, DOI: 10.15232/S1080-7446(15)31318-8.
- Kincaid, R. L. & Socha, M. T. 2004. "Inorganic Versus Complexed Trace Mineral Supplements on Performance of Dairy Cows". *The Professional Animal Scientist*, 20(1): 66–73, ISSN: 1080-7446, DOI: 10.15232/S1080-7446(15)31274-2.
- Machado, V. S., Oikonomou, G., Lima, S. F., Bicalho, M. L. S., Kacar, C., Foditsch, C., Felipe, M. J., Gilbert, R. O. & Bicalho, R. C. 2014. "The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows". *The Veterinary Journal*, 200(2): 299–304, ISSN: 1090-0233, DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.02.026.
- McDowell, L. R. & Arthington, J. D. 2005. *Minerales para Rumiantes en Pastoreo en Regiones Tropicales*. 4th ed., E.E.U.U: University of Florida-IFAS, 91 p.
- Miles, P. H., Wilkinson, N. S. & McDowell, L. R. 2001. *Analysis of minerals for animal nutrition research*. 3rd ed., Gainesville, USA: Department of Animal Science, University of Florida.
- Nayeri, A., Upah, N. C., Sucu, E., Sanz-Fernandez, M. V., DeFrain, J. M., Gorden, P. J. & Baumgard, L. H. 2014. "Effect of the ratio of zinc amino acid complex to zinc sulfate on the performance of Holstein cows". *Journal of Dairy Science*, 97(7): 4392–4404, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2013-7541.
- Nemec, L. M., Richards, J. D., Atwell, C. A., Diaz, D. E., Zanton, G. I. & Gressley, T. F. 2012. "Immune responses in lactating Holstein cows supplemented with Cu, Mn, and Zn as sulfates or methionine hydroxy analogue chelates". *Journal of Dairy*

- Science, 95(8): 4568–4577, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2012-5404.
- Noval, A. E., García, D. J. R., García, L. R., Quiñones, R. R. & Mollineda, T. Á. 2014. “Caracterización de algunos componentes químicos, en suelos de diferentes agroecosistemas ganaderos”. *Centro Agrícola*, 41(1): 25–31, ISSN: 2072-2001, 0253-5785.
- NRC (National Research Council) (ed.). 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th ed., call no. SF203 .N883 2001, Washington, D.C: National Academy Press, 381 p., ISBN: 978-0-309-06997-7.
- Parker, R. 1989. “Body condition scoring of dairy cattle”. *Factsheet*, 410/20, ISSN: 1198-712X.
- Pogge, D. J., Richter, E. L., Drewnoski, M. E. & Hansen, S. L. 2012. “Mineral concentrations of plasma and liver after injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle”. *Journal of Animal Science*, 90(8): 2692–2698, ISSN: 0021-8812, 1525-3163, DOI: 10.2527/jas.2011-4482.
- Rosa, D. E., Fazzio, L. E., Picco, S. J., Furnus, C. & Mattioli, G. A. 2008. “Metabolismo y deficiencia de zinc en bovinos”. *Analecta Veterinaria*, 28(2): 34–44, ISSN: 1514-2590.
- Siciliano-Jones, J. L., Socha, M. T., Tomlinson, D. J. & DeFrain, J. M. 2008. “Effect of Trace Mineral Source on Lactation Performance, Claw Integrity, and Fertility of Dairy Cattle”. *Journal of Dairy Science*, 91(5): 1985–1995, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.2007-0779, PMID: 18420629, 18420629.
- Sotolongo, J. 2007. *Medicina interna veterinaria*. La Habana, Cuba: Félix Varela, ISBN: 978-959-07-0549-6.
- Spears, J. W. & Weiss, W. P. 2008. “Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows”. *The Veterinary Journal*, 176(1): 70–76, ISSN: 1090-0233, DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.12.015.
- StatPoint Technologies 2010. *Statgraphics Centurion*. (ser. Centurion), version 16.1 (XV), [Windows], Available: <<http://statgraphics-centurion.software.informer.com/download/>>.
- Uchida, K., Mandebvu, P., Ballard, C. S., Sniffen, C. J. & Carter, M. P. 2001. “Effect of feeding a combination of zinc, manganese and copper amino acid complexes, and cobalt glucoheptonate on performance of early lactation high producing dairy cows”. *Animal Feed Science and Technology*, 93(3–4): 193–203, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/S0377-8401(01)00279-6.
- Valera, M., Gutiérrez, O., Gallego, C., Oramas, A. & Sánchez, L. 2011. “Macro y microelementos sanguíneos en rebaños lecheros en pastoreo, pertenecientes al Instituto de Ciencia Animal. Nota técnica”. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 45(2): 121–122, ISSN: 2079-3480.

**Received: March 20, 2015**