

CONCENTRAÇÃO RUMINAL DE SULFETO DE HIDROGÊNIO MENSURADA POR TUBOS COLORIMÉTRICOS EM BOVINOS NELORE SADIOS CRIADOS EXTENSIVAMENTE¹

Paulo Henrique Jorge da Cunha²
Peres Ramos Badial³
José Paes de Oliveira Filho³
Didier Quevedo Cagnini³
Lívia Fagundes Moares³
Regina Kiomi Takahira³
Alexandre Secorun Borges³

RESUMO

O presente trabalho objetivou estabelecer a concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal utilizando tubos colorimétricos em bovinos Nelore sadios criados em pasto de *Brachiaria decumbens* contendo 0,15% de enxofre na matéria seca. Quatro bovinos foram submetidos a exames físicos e laboratoriais, com intervalos de 96 horas, durante período de 40 dias. Os resultados indicaram que a técnica se mostrou adequada e que as dosagens de sulfeto de hidrogênio ruminal foram inferiores a 100 ppm. A técnica utilizando tubos colorimétricos para dosagem de sulfeto de hidrogênio ruminal foi de fácil execução a campo e os bovinos ingerindo *B. decumbens* com 0,15% de enxofre na matéria seca apresentaram concentração mínima de 25 ppm e máxima de 100 ppm de gás sulfídrico ruminal.

Palavras-chave: sulfeto de hidrogênio ruminal, bovino, *Brachiaria decumbens*.

RUMINAL HYDROGEN SULFIDE CONCENTRATION DETERMINED BY A SIMPLE SULFIDE DETECTOR TUBE METHOD IN BOVINE KEPT UNDER EXTENSIVE SYSTEM

ABSTRACT

The aim of this work was to establish the concentration of ruminal hydrogen sulfide using a detector tube method in health Nelore bovine kept in *Brachiaria decumbens* pasture (0.15% S dry matter). Four animals were clinically evaluated and laboratorial exams performed with 96 hour interval, during 40 days of experimental period. Clinical and laboratorial results indicated that technique was suitable and ruminal sulfide hydrogen values were inferior to 100 ppm. It was concluded that the technique was simple and healthy Nelore bovine kept in *Brachiaria decumbens* pasture with sulfur content of 0.15% of dry matter presented minimal concentrations of 25 ppm and maximum of 100 ppm of H₂S.

Key words: ruminal sulfide hydrogen, bovine, *Brachiaria decumbens*.

¹ Parte da tese de Doutorado do primeiro autor. Financiado integralmente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2006/05836-6).

² Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Rua 13 n.278 apto 4 Plaza Residencial Sol de La Plaza Setor Oeste, Goiânia - GO. CEP: 74.120-060. E-mail: phcunhavet@yahoo.com.br

³ Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN RUMINAL DE SULFURO DE HIDRÓGENO POR TUBOS COLORIMÉTRICOS EN BOVINOS NELORE SALUDABLES CREADOS DE FORMA EXTENSIVA

RESUMEN

La ingestión de dietas con altas concentraciones de azufre pueden ocasionar la producción excesiva de sulfuro de hidrógeno ruminal (H_2S), pudiendo ocasionar polioencefalomalacia en vacunos. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la concentración de sulfuro de hidrógeno en el rumen utilizando tubos colorimétricos en vacunos Nelore, sanos, creados en pastura de *Brachiaria decumbens*, conteniendo 0,15% de azufre en la materia seca. Fueron realizados exámenes clínicos y laboratoriales en cuatro vacunos, a intervalos de 96 horas, durante un período de 40 días. Los resultados indicaron que la técnica era conveniente y que el dosaje de sulfuro de hidrógeno ruminal en los mismos fue inferior a 100 ppm. La técnica de utilización de tubos colorimétricos para el dosaje de sulfuro de hidrógeno ruminal a campo fue de ejecución fácil y como resultado los bovinos tuvieron una concentración mínima de 25 ppm e máxima de 100 ppm de gas sulfhídrico ruminal.

Palabras-clave: gas sulfhídrico ruminal, vacuno, *Brachiaria decumbens*.

INTRODUÇÃO

O sulfeto de hidrogênio (gás sulfídrico ou H_2S) é produto normal do metabolismo da microbiota ruminal e as bactérias do gênero *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* são as responsáveis pela degradação do sulfato, especialmente em sulfeto de hidrogênio, sendo este eructado ou absorvido e/ou usado na síntese da proteína microbiana (1).

O H_2S participa na etiopatogenia da polioencefalomalacia (PEM) ocasionada por ingestão excessiva de enxofre. A PEM é uma encefalopatia degenerativa dos ruminantes, sendo o termo utilizado para descrever a alteração morfológica caracterizada por amolecimento (malacia) da substância cinzenta (polio) do encéfalo (2).

A técnica de dosagem de sulfeto de hidrogênio ruminal com o uso de tubos colorimétricos foi útil para monitorar situações de risco, bem como auxiliar no diagnóstico definitivo da PEM causada por excesso de enxofre em bovinos (3-5).

O objetivo do trabalho foi avaliar a concentração do H_2S ruminal utilizando tubos colorimétricos contribuindo para a determinação de valores fisiológicos deste composto em bovinos nelore (*Bos indicus*) mantidos a campo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma fazenda de gado de corte localizada no município de Paulistânia, Estado de São Paulo. Foram avaliados quatro bovinos da raça Nelore com 15 a 20 meses de idade e com peso médio de 350 kg, mantidos em piquete com *B. decumbens*.

As determinações da concentração do enxofre nesta forragem (1.500 mg/kg) e na água do bebedouro (2,4 mg/L) foram realizadas no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e de Fertilizantes e Corretivos da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP/Botucatu.

O período experimental compreendeu 40 dias, sendo que os exames físicos (temperatura corpórea, frequências cardíaca e respiratória, motricidade ruminal) e laboratoriais (hemograma, fibrinogênio, proteína plasmática e concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal) foram realizados sempre às 9 horas, com intervalos de 96 horas, totalizando 10 momentos (M1 a M10) por animal.

As amostras de sangue total foram colhidas, por venopunção da jugular, em tubos contendo anticoagulante (EDTA) e submetidas à contagem de células em câmara hematómica de Neubauer, a determinação do volume globular pelo método do microhematócrito e a dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina, calculando-se posteriormente os índices hematimétricos (volume globular médio e concentração de hemoglobina globular média). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em esfregaços sanguíneos corados pelo panótico rápido. Para a mensuração do fibrinogênio utilizou-se a técnica de precipitação no tubo de microhematócrito a 56°C e a proteína foi determinada diretamente pela refratometria (6).

A técnica utilizada para a determinação da concentração de gás sulfídrico ruminal foi adaptada de Gould et al. (7) com as modificações descritas por Cunha et al. (3). Inicialmente, foi realizada a tricotomia da fossa paralombar esquerda e anti-sepsia com iodopovidona (PVPI). A punção ruminal foi realizada no ponto médio da porção mais dorsal da fossa paralombar esquerda, utilizando-se agulha de cateter intravenoso 14G, sem a cânula externa, de teflon. Em seguida, um equipo intravenoso com 15 cm de comprimento sem a extremidade do gotejador foi encaixado ao conector da agulha. A ponta cortada do equipo adaptado foi acoplada ao tubo colorimétrico de dosagem de gás sulfídrico (modelo 120 SF, Sensidyne®, Florida, EUA), previamente inserido na bomba manual de vácuo (modelo AP-20S, Sensidyne®, Florida, EUA). As mensurações foram realizadas de acordo com o manual do fabricante da bomba, padronizando em 100 mL de gás para valores entre 25 a 1.000 ppm de sulfeto de hidrogênio, com tempo de amostragem de 1,5 minutos. Nos momentos em que não houve alteração na coloração do tubo, repetiu-se a dosagem e, não se detectando alteração, supôs-se que o respectivo valor encontrava-se abaixo do limite inferior de detecção do tubo (<25 ppm de H₂S ruminal).

Os resultados da temperatura corpórea, frequência cardíaca e respiratória, motricidade ruminal, do hemograma, do fibrinogênio plasmático e da proteína plasmática foram submetidos à análise descritiva, constituída pelo cálculo das médias aritméticas e dos desvios-padrão. A média e os desvios padrão para o parâmetro da determinação da concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal foram calculados e submetidos à análise estatística no programa GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software) e foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Friedman. Diferença estatística foi considerada para $p \leq 0,05$ (8). Para realização da análise estatística foi considerado o valor de 24 ppm nas aferições referentes aos valores inferiores a 25 ppm do sulfeto de hidrogênio ruminal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da temperatura corpórea, frequência cardíaca e respiratória (tabela 1) permaneceram dentro da faixa de normalidade para a espécie bovina (9).

A motricidade ruminal apresentou valores médios que variaram de 3,6 a 8,2 movimentos ruminais em cinco minutos (tabela 1). Radostits et al. (9) estabeleceram como valores normais para bovinos "*Bos taurus*" de sete a dez movimentos em cinco minutos, ou seja, valores superiores aos encontrados nos zebuínos avaliados. Entretanto, em nenhum animal foi identificado sinal clínico sugestivo de doença do trato digestório, não sendo observado alterações na postura, no comportamento, na forma abdominal e nos ruídos ruminais a auscultação (9).

Os resultados dos exames laboratoriais (tabelas 2, 3 e 4) permaneceram dentro da faixa de normalidade para a espécie bovina (9), indicando que durante o período experimental os animais se mantiveram saudáveis.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão dos valores de temperatura corpórea (°C), frequências cardíaca e respiratória por minuto e motricidade ruminal em cinco minutos avaliados de quatro bovinos nelores mantidos em pasto de *Brachiaria decumbens*.

	Animais			
	1001	1028	1070	1100
Temperatura	39±0,35	38,9±0,43	38,87±0,23	38,8±0,17
Frequência cardíaca	71,9±7,5	78,1±5,3	69,3±4,1	66,7±3,9
Frequência respiratória	24,5±2,4	27,7±5,9	25,6±2,6	31,6±3,7
Motricidade ruminal	5,9±1,4	5,1±1,5	7,1±1,1	6,2±1,4

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos constituintes do eritrograma de quatro bovinos nelores mantidos em pasto de *Brachiaria decumbens*.

Eritrograma	Animais			
	1001	1028	1070	1100
Hemácias (x10⁶/μL)	6,84±0,90	7,42±0,84	6,44±0,52	5,7±0,41
Hemoglobina (mg/dL)	10±1,41	10,67±1,09	9,32±0,67	7,69±0,70
Volume Globular (%)	30,35±3,72	32,2±3,32	27,95±1,70	24,15±20
VGM (fL)	44,6±4,60	43,44±2,10	43,38±2,48	42,44±1,93
CHGM (%)	33,18±1,43	33,13±0,85	33,35±0,99	31,97±1,08

Tabela 3. Médias e desvios-padrão dos valores absolutos dos constituintes do leucograma de quatro bovinos Nelores mantidos em pasto de *Brachiaria decumbens*.

Leucograma	Animais			
	1001	1028	1070	1100
Leucócitos (x10³/ μL)	7,5±2,58	8,148±0,65	9,2895±1,41	9,014±1,10
Segmentados(x10³/ μL)	2,06±1,01	1,57±0,51	2,77±1,84	1,55±0,74
Linfócitos (x10³/ μL)	5,855±1,37	6,04±0,79	5,66±0,96	6,54±0,74
Eosinófilos (x10³/ μL)	0,29±0,28	0,15±0,18	0,32±0,26	0,68±0,54
Basófilos (x10³/ μL)	0,02±0,04	0	0,02±0,05	0,01±0,03
Monócitos (x10³/ μL)	0,39±0,30	0,33±0,21	0,48±0,32	0,19±0,13

Tabela 4. Médias e desvios-padrão do fibrinogênio (mg/dL) e proteínas totais (g/dL) de quatro bovinos nelore mantidos em pasto de *Brachiaria decumbens*.

	Animais			
	1001	1028	1070	1100
Fibrinogênio plasmático (mg/dL)	315±110,67	365±120,30	375±108,65	325±123,04
Proteínas totais (g/dL)	6,57±0,27	6,66±0,50	6,41±0,32	6,7±0,27

Em relação ao consumo de enxofre pelos bovinos Nelore, considerou-se que a ingestão da forragem foi de 2,5% do peso vivo, representando uma ingestão de 0,15% de enxofre na matéria seca. Para o cálculo da ingestão de enxofre na água foi estimado que um bovino de 350 kg mantido em temperatura ambiente de 28°C deve ingerir 37 litros de água por dia (3), totalizando consumo de 24 mg de enxofre por dia (0,0024% de enxofre na matéria seca), visto que a concentração de enxofre obtida na água foi de 0,65mg/L. Assim, os bovinos ingeriram um total de 0,1524% de enxofre na matéria seca, estando no nível recomendado (0,15%) por Klasing et al. (10).

A dosagem de gás sulfídrico ruminal, estabelecida por Gould et al. (7) e adaptada por Cunha et al. (3) realizada na presente pesquisa, mostrou-se um exame complementar prático porque pode ser realizada a campo e forneceu de forma imediata estimativa da concentração do sulfeto de hidrogênio ruminal.

Gould et al. (7) ao compararem a técnica da dosagem de gás sulfídrico ruminal utilizando tubos colorimétricos com a cromatografia líquida de alta eficiência, não observaram diferenças significativas entre os resultados obtidos, confirmando que a metodologia empregada no presente estudo reflete valores confiáveis da concentração de H₂S ruminal, sendo desnecessário o uso de outras técnicas para este propósito.

Na presente pesquisa verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) do animal 1070 comparando com os demais bovinos (tabela 5). Variações nos valores do sulfeto de hidrogênio ruminal entre os animais do mesmo grupo também foram relatadas por Niles et al. (11). Isto indica que o metabolismo ruminal do enxofre é rápido e que as concentrações do gás sulfídrico ruminal são dinâmicas e se modificam rapidamente em resposta ao consumo de enxofre e a capacidade de absorção pela parede do rúmen (12).

Tabela 5. Valores médios e desvios-padrão ($x \pm \sigma$) do sulfeto de hidrogênio ruminal (ppm), obtidos em 10 momentos, com intervalos de 96 horas, em quatro bovinos nelore mantidos em pasto de *Brachiaria decumbens*.

	<i>Animais</i>			
	1001	1028	1070	1100
Concentração H₂S (ppm)	24,9±1,85a	26,9±4,01a	54,3±31,43b	39,4±22,49a

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os animais.

Os valores detectados do gás sulfídrico ruminal no presente estudo foram superiores a 25 ppm e inferiores a 100 ppm (dados não apresentados), concentrações inferiores aos descritos como normais (inferiores a 500 ppm) por Gould et al. (7), Loneragan et al (12) e Niles et al (11). Entretanto, os referidos autores utilizaram metodologia semelhante de dosagem de H₂S ruminal em bovinos "*Bos taurus*". Cunha et al. (3) detectaram elevados teores de gás sulfídrico ruminal (5.000ppm) em bovinos nelore confinados e alimentados exclusivamente com feno que continha elevados teores de enxofre na análise mineral foliar (0,37% da matéria seca). Cunha et al. (4) relataram um surto de PEM em bezerros da raça Red Angus mantidos semi-confinados no Rio Grande do Sul e observaram que as concentrações de sulfeto de hidrogênio ruminal variaram de 1.000 a 2.500 ppm, indicando que os animais estavam consumindo enxofre em quantidades elevadas (0,38% da matéria seca) na dieta.

Os casos de PEM descritos em bovinos "*Bos taurus*" criados extensivamente no Brasil (13) não tiveram os valores de H₂S ruminal aferidos e não foram encontrados na literatura nacional compilada valores de referência para este composto em bovinos nelore criados extensivamente. Isto justifica a importância deste trabalho, pois, a bovinocultura brasileira de corte é baseada na criação extensiva sustentada pelas forrageiras, sobretudo a *Brachiaria decumbens*, além do fato de que aproximadamente 80% dos bovinos criados extensivamente são da raça Nelore.

A técnica de dosagem de sulfeto de hidrogênio ruminal pelos tubos colorimétricos é uma ferramenta útil para monitorar situações de risco e auxiliar no diagnóstico definitivo da PEM por enxofre. A utilização desta metodologia associada à análise de enxofre na dieta e na água estabeleceriam a participação do enxofre nos casos de PEM no Brasil (3-5), bem como auxiliaria no diagnóstico diferencial de outras causas de encefalopatias (13).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a técnica para dosagem de sulfeto de hidrogênio ruminal utilizando tubos colorimétricos foi de fácil execução a campo e que bovinos nelore mantidos em pasto de *Brachiaria decumbens* com 0,15% de enxofre na matéria seca apresentam concentração mínima de 25 ppm e máxima de 100 ppm de gás sulfídrico ruminal.

COMITE DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos realizados encontram-se de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu, sendo o experimento aprovado pela mesma (Protocolo nº117/2006-CEEA) em 21 de setembro de 2006.

REFERÊNCIAS

1. Burgess BA. Polioencephalomalacia. Large Anim Vet Rounds. 2008;8:1-6.
2. Cunha PHJ. Polioencefalomalacia experimentalmente induzida pela ingestão de dieta com alto teor de enxofre ou pelo herpesvírus bovino 5 em bovinos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2010.
3. Cunha PHJ, Badial PR, Oliveira Filho JP, Amorim RL, Cagnini DQ, Borges AS. Intoxicação experimental por enxofre em bovinos Nelore [CD-ROM]. In: Anais do 2º Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário; 2008, Campo Grande. Campo Grande: ENDIVET; 2008. p.20-1.
4. Cunha PHJ, Bandarra PM, Dias MM, Borges AS, Driemeier D. Surto de polioencefalomalacia por ingestão excessiva de enxofre na dieta em bezerros no Rio Grande do Sul. Pesqui Vet Bras. 2010;30:613-7.
5. Cunha PHJ, Badial PR, Cagnini DQ, Oliveira Filho JP, Moraes LF, Takahira RK, et al. Polioencefalomalacia experimental em bovinos induzida por toxicose por enxofre. Pesqui Vet Bras. 2011;31:41-52.
6. Coles EH. Patologia clínica veterinária. 3ª ed. São Paulo: Manole; 1984.
7. Gould DH, Cummings BA, Hamar DW. In vivo indicators of pathologic ruminal sulfide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia. J Vet Diagn Invest. 1997; 9:72-6.
8. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: UFMG; 1998.
9. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2007.
10. Klasing KC, Goff JP, Greger JL, King JC. Mineral tolerance of animals. 2nd ed. Washington: National Academics Press; 2005.

11. Niles GA, Morgan S, Edwards WC, Lalman D. Effects of dietary sulfur concentrations on the incidence and pathology of polioencephalomalacia in weaned beef calves. *Vet Hum Toxicol.* 2002;44:70-2.
12. Loneragan GH, Gould DH, Callan RJ, Sigurdson CJ, Hamar DW. Association of excess sulfur intake and an increase in hydrogen sulfide concentrations in the ruminal gas cap of recently weaned beef calves with polioencephalomalacia. *J Am Vet Med Assoc.* 1998; 213:1599-604.
13. Sant'Ana JFF, Barros CSL. Polioencephalomalacia in ruminants in Brazil. *Braz J Vet Pathol.* 2010;3:70-9.

Recebido em: 04/08/10

Aceito em: 01/04/11