

## Utilização de minerais iônicos ou complexos orgânicos de minerais no pré-parto de vacas Holandesas

[Use of ionic minerals or organic mineral complexes in the dry period of Holsteins cows]

C.G. Batista<sup>1</sup>, S.G. Coelho<sup>2</sup>, A.M.Q. Lana<sup>2</sup>, E. Rabelo<sup>3</sup>, A.S. Araújo<sup>1</sup>, Z.I.P. Lobato<sup>2</sup>, R.B. Reis<sup>2</sup>, H.M. Saturnino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluna de Pós Graduação – EV-UFGM, Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Escola de Veterinária - UFGM - Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup>ReHagro

### RESUMO

Os efeitos do uso de minerais complexados durante o pré-parto sobre a ocorrência de retenção de placenta foram avaliados em 135 vacas Holandesas de dois ou mais partos: grupo mineral iônico (69 animais) e grupo mineral complexado (66 animais). Em 55 desses animais foram também avaliadas as concentrações séricas da imunoglobulina G (IgG), Zn, Cu e a qualidade do colostro. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo em parcelas subdivididas. As concentrações séricas de IgG e dos microminerais foram avaliadas por análise de variância, sendo utilizados, respectivamente, os testes de Duncan e Fisher. A taxa de erro  $\alpha$  admitida foi de 7%. Não foram observadas diferenças entre os grupos para ocorrência de retenção de placenta, qualidade do colostro, concentrações séricas de Zn e IgG ( $P>0,07$ ), sendo observada diferença para a concentração de Cu ( $P<0,07$ ). As concentrações de IgG foram diferentes nas semanas pré-parto avaliadas ( $P<0,07$ ).

Palavras-chave: cobre, imunoglobulinas, retenção de placenta, zinco

### ABSTRACT

*The effects of the use of complex minerals on the occurrence of retained placenta during pre-partum were valued on 135 Holstein cows from two or more deliveries. The animals were divided in two groups: ionic mineral (69 animals) and complexed mineral (66 animals). In 55 of these animals serum concentrations of immunoglobulin G (IgG), Zn and Cu and colostrum quality were also evaluated. The experiment was conducted in complete randomized split-plot design, serum IgG and trace minerals were evaluated by analysis of variance and used, respectively, Duncan's test and Fisher. The  $\alpha$  error rate of 7% was accepted. There were no differences between groups for the occurrence of retained placenta, colostrum quality and serum concentrations of Zn and IgG ( $P>0.07$ ), a difference was observed for Cu ( $P<0.07$ ) concentrations. The IgG concentrations were different on the weeks pre partum evaluated ( $P <0.07$ ).*

*Keywords: copper, immunoglobulin, placenta retention, zinc*

### INTRODUÇÃO

O parto e o início da lactação são períodos de grande estresse para vacas de leite devido aos desafios metabólicos que ocorrem nesse período. Nas últimas duas semanas pré-parto, as vacas de leite geralmente estão em balanço negativo de energia e cálcio, e nos últimos dias que

antecedem o parto, o balanço de outros nutrientes, tais como proteína, vitaminas e minerais, também pode ser comprometido. A principal razão desse balanço negativo de nutrientes é o contínuo decréscimo no consumo de matéria seca (MS) (Bertics *et al.*, 1992; Santos, 1996), associado ao aumento nas demandas de nutrientes para crescimento fetal e

síntese de colostro (Davis *et al.*, 1979; Bell, 1995). O aumento das demandas de nutrientes aumenta também as exigências de oxigênio e resulta na produção de espécies reativas ao oxigênio, que podem exceder a capacidade antioxidante endógena, levando ao estresse oxidativo (Weiss, 1998). Baixas concentrações sanguíneas de selênio, zinco e cobre também estão associadas com aumento no estresse oxidativo e redução na atividade leucocitária, uma vez que esses elementos exercem papel antioxidante (Weiss, 1990; Erskine, 1993). O estresse oxidativo aumenta a susceptibilidade, especialmente das vacas no período de transição, a uma variedade de problemas de saúde, tais como imunodeficiência, mastites, retenção de placenta, infertilidade, entre outros (Goff, 2006; Sordillo e Aitken, 2009).

A retenção de placenta tem sido associada a falhas na função dos neutrófilos (Kimura *et al.*, 2002) e macrófagos (Miyoshi *et al.*, 2002). O efeito da suplementação com antioxidantes sobre a retenção de placenta provavelmente envolve melhora na função imune com maior capacidade reativa de neutrófilos (Spears e Weiss, 2008), uma vez que a redução na atividade leucocitária está relacionada principalmente com a capacidade dos leucócitos em destruir e eliminar bactérias após fagocitose (Erskine, 1993).

A presença de concentrações adequadas de substâncias antioxidantes, derivadas de vitaminas e microminerais, tem como função impedir que os radicais livres presentes no citosol da célula causem danos à própria estrutura física e química da célula, reduzindo, assim, a taxa de destruição celular (Santos, 1996).

A infertilidade em vacas de leite é um problema complexo, multifatorial, que não pode ser avaliado isoladamente de outras doenças ou desordens fisiológicas. Macro, micro- minerais e vitaminas possuem papel vital para prevenir essas desordens no período peri-parto. Com base nas funções gerais dos macro e microelementos, pode-se afirmar, como regra geral, que toda deficiência mineral capaz de produzir alterações na saúde e no metabolismo do animal tende a interferir, também com alguma intensidade, no seu desempenho reprodutivo (Hurley e Doane, 1989; Guthrie e West, 2008).

Os minerais que, geralmente, afetam a reprodução em bovinos estão classificados na categoria dos microminerais, mas Ca e P também podem estar envolvidos (Boland, 2003).

Os minerais “orgânicos”, quelatados ou complexados, têm sido desenvolvidos com a finalidade de garantir a absorção do mineral no trato intestinal, sem entrar no processo de competição iônica (pressão iônica da mucosa intestinal), normalmente determinada pela presença de maior concentração dos íons minerais. O interesse no uso desses minerais se deve a relatos de melhora no desempenho animal, como ganho de peso, eficiência de conversão alimentar, alteração na composição da carcaça, aumento na produção de leite, ou mesmo a percepção de melhorias em saúde e desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas (Santos, 2006). Ainda, Swecker *et al.* (1995) reportam que suplementação com selênio no pré-parto (120mg de Se/kg da mistura mineral) aumentou a concentração de IgG no colostro e a sua absorção em bezerros de corte. Em adição a seu valor imunológico, o colostro é uma excelente fonte de nutrientes para o neonato por conter grande quantidade de proteína, energia, minerais e vitaminas.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da utilização de minerais complexados durante o pré-parto sobre a ocorrência de retenção de placenta, qualidade de colostro e as concentrações séricas de imunoglobulinas (IgG), Zn e Cu.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), certificado nº 43/2007.

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira comercial, no município de Inhaúma, no período de maio a outubro de 2007. Foram utilizadas 135 vacas da raça Holandesa de segunda ou mais ordens de lactação, distribuídas ao acaso nos grupos: mineral iônico (69 animais) e grupo mineral complexado (66 animais). As duas misturas minerais foram formuladas para conter quantidades similares de macro e

microminerais (Tortuga Cia. Zootécnica Agrária, São Paulo, Brasil).

A mistura mineral iônico foi formulada apenas com fontes inorgânicas de minerais: carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, iodeto de cálcio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, fosfato de ferro, sulfato de manganês, cloreto de potássio, selenito de sódio, sulfato de zinco, cloreto de cromo e óxido de magnésio. Na mistura mineral complexado, as fontes inorgânicas de selênio, zinco, cobre, enxofre, manganês e cromo foram substituídas por fontes orgânicas. Para a obtenção das fontes orgânicas, os microminerais foram industrialmente misturados a peptídeos purificados de soja e, posteriormente, fermentados por cultura de

leveduras, produzindo os carboquelatos de zinco, cobre, enxofre, manganês, cobalto e selênio.

Todos os animais foram alojados, aproximadamente, 42 dias antes do parto em piquetes de braquiária (*Brachiaria decumbes*), de 40x30m<sup>2</sup>, com aproximadamente 11 animais cada, recebendo, a partir daí, as dietas experimentais na forma de dieta completa. As dietas foram formuladas de acordo com as recomendações do NRC (Nutrient..., 2001) (Tab. 1) e foram oferecidas às nove e 17 horas. A água foi fornecida à vontade, em tanques com capacidade de 200 litros. Os partos ocorreram nos piquetes e foram monitorados a cada hora. A placenta foi considerada retida quando a expulsão não ocorreu até 12 horas após o parto.

Tabela 1. Composição, quantidade e ingredientes da dieta oferecida na maternidade

Ingrediente	Quantidade/animal (kg)	MS (kg)
Tifton verde	7,00	1,80
Farelo de soja	2,00	1,78
Polpa cítrica	0,30	0,26
Silagem de milho	23,90	7,30
Mistura pré-parto/ingredientes	1,00	
Milho moído	0,66	
Fosfato bicálcico	0,09	
Sulfato de magnésio	0,12	
Premix vitamínico ADE***	0,05	
Premix mineral iônico e complexado	0,02	
Sal comum	0,03	
Óxido de magnésio	0,03	
Total da dieta	34,2	
	<b>Nutrientes</b>	<b>%</b>
	Matéria seca	34,80
	Proteína bruta	14,65
	FDN	47,88
	FDA	27,17
	Extrato etéreo	4,90
	NDT	64,38
	Minerais	6,22
	Cálcio (ppm)	0,55
	Fósforo (ppm)	0,26
	Cobalto (ppm)	0,00
	Cobre (ppm)	0,02
	Zinco (ppm)	0,02

\*\*\*Premix ADE: cobalto 200mg, cobre 10000mg, manganês 14000mg, zinco 43000mg, se 290mg, iodo 500mg, vit A 4000000UI, vit D3 11000000UI, vit E 27000UI, monensina, 13000mg, enxofre 500mg, biotina 870mg.

Em 55 animais, 28 do grupo mineral iônico e 27 do mineral complexado, amostras de sangue de 20mL foram obtidas em tubos de vacutainer com

ativador de coágulo, na veia mamária, aos 42 dias pré-parto e semanalmente até o dia do parto, para avaliação de IgG sérica, e 28 dias pré-parto

e semanalmente, para avaliação das concentrações de Zn e Cu. Imediatamente após as colheitas, as amostras foram centrifugadas a 3.000RPM por 15 minutos, sendo o soro removido e congelado a -20°C.

Nesses mesmos animais, duas amostras de colostro foram obtidas, uma hora após o parto, por ordenha manual, antes da colostragem dos bezerros. Uma amostra de 50mL foi utilizada para mensurar a qualidade do colostro, com a utilização de colostrômetro, de acordo com escala proposta por Fleenor e Stott (1980): até 21,8mg/mL de imunoglobulinas, colostro de baixa qualidade; de 22 a 49,8mg/mL, qualidade intermediária; e acima desse valor, colostro de alta qualidade. A outra amostra de 10mL foi colhida e congelada em freezer (-20°C) para posterior análise de IgG.

As concentrações séricas de Cu e Zn foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (Perkin-Elmer AAS 5000).

Para as análises de IgG no soro e colostro, utilizou-se o teste de imunodifusão radial (IDR), segundo Mancini *et al.* (1965) e Fleenor e Stott (1981). IgG de bovino purificada foi utilizada para construção da curva padrão, sendo o intervalo de detecção estipulado entre 9,35 e 71mg/mL; a curva foi construída no software ORIGEN®.

Nas amostras pré-secas dos alimentos, determinaram-se matéria seca em estufa a 105°C (Official..., 1980), proteína bruta pelo método de Kjeldhal, segundo o AOAC (Official..., 1980), componentes da parede celular pelo método sequencial de Van Soest *et al.* (1991) e cálcio e fósforo, segundo o AOAC (Official..., 1980). Os minerais nas amostras de sal complexado e iônico foram determinados no laboratório Silicon, em São Paulo.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo em parcelas subdivididas, com o tipo de mineral na parcela e o tempo na subparcela. Para testar as diferenças entre as médias de IgG no soro sanguíneo das vacas, usou-se o teste de Duncan a 7% de probabilidade. Para testar as diferenças entre as médias do mineral no soro sanguíneo, usou-se o teste de Fisher a 7% de probabilidade. Os dados

referentes à retenção de placenta e à qualidade de colostro avaliada pelo colostrômetro foram analisados pelo teste do qui-quadrado a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de Zn no soro das vacas, nas semanas anteriores ao parto e ao parto, não foram diferentes entre grupos e entre tempos, e não houve interação grupo *versus* tempo ( $P>0,07$ ) (Tab. 2). Já as concentrações de Cu foram maiores em todas as semanas avaliadas nos animais que receberam minerais complexados ( $P<0,07$ ). As concentrações de Zn e Cu nos dois grupos estão dentro dos valores considerados normais e próximas às relatadas por Kincaid e Socha (2007), utilizando-se minerais complexados.

Neste experimento, os minerais complexados foram oferecidos aos animais, em média, seis semanas antes do parto, sendo esse tempo suficiente para provocar alterações nas concentrações séricas de Cu, mas não de Zn.

A concentração de IgG sérica não foi diferente entre os grupos e não ocorreu interação grupo *versus* semana avaliada ( $P>0,05$ ), sendo as concentrações de IgG diferentes apenas entre as semanas avaliadas ( $P<0,05$ ) (Fig. 1). A concentração média de IgG no soro apresenta taxa de redução semanal até o parto de 2,74mg/dL, sendo os valores observados estatisticamente diferentes na segunda e primeira semanas pré-parto. Este comportamento também foi descrito por Brandon *et al.* (1971), que observaram 50% de redução, duas a três semanas antes do parto, e por Guy *et al.* (1994), que relataram queda maior na concentração de IgG no soro 13 dias antes do parto, chegando ao mínimo entre seis dias e o dia do parto. A queda na concentração de IgG no soro próximo ao parto ocorre devido ao transporte das imunoglobulinas para a glândula mamária para a formação do colostro. Segundo Brandon *et al.* (1971), os valores da IgG retornam à concentração normal quatro semanas após o parto. A concentração sérica média de IgG de 23,2mg/mL é próxima à relatada por Gapper *et al.* (2007), de 25mg/mL. A redução nas concentrações de IgG nas semanas anteriores ao parto se apresenta dentro de padrões normais.

Tabela 2. Concentração média e desvio-padrão de Zn e Cu ( $\mu\text{g/mL}$ ) no soro de vacas leiteiras que receberam minerais iônicos ou complexados nas semanas anteriores ao parto

Dias	Mistura mineral iônico	Mineral complexado
$\text{Zn } (\mu\text{g/mL})^1$		
-28	0,88 $\pm$ 0,34	0,92 $\pm$ 0,28
-21	0,89 $\pm$ 0,33	0,96 $\pm$ 0,31
-14	1,05 $\pm$ 0,35	0,89 $\pm$ 0,28
-7	0,90 $\pm$ 0,13	0,93 $\pm$ 0,31
Parto	0,89 $\pm$ 0,31	1,03 $\pm$ 0,55
Média	0,93 $\pm$ 0,32	0,95 $\pm$ 0,36
$\text{Cu } (\mu\text{g/mL})^2$		
-28	0,61 $\pm$ 0,15 B	0,66 $\pm$ 0,15 A
-21	0,61 $\pm$ 0,10 B	0,65 $\pm$ 0,16 A
-14	0,61 $\pm$ 0,14 B	0,66 $\pm$ 0,19 A
-7	0,53 $\pm$ 0,42 B	0,73 $\pm$ 0,16 A
Parto	0,61 $\pm$ 0,15 B	0,62 $\pm$ 0,11 A
Média	0,60 $\pm$ 0,14 B	0,65 $\pm$ 0,15 A

Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, diferem pelo teste de Fisher ( $P < 0,07$ ). Zinco CV: 25,8; Cobre CV: 24,3.

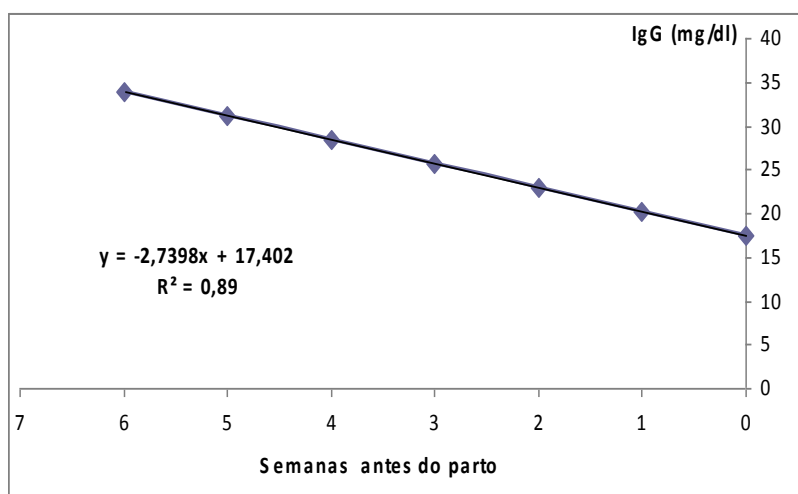


Figura 1. Concentração sérica de IgG nas semanas anteriores ao parto em vacas leiteiras.

Todos os partos ocorreram de forma normal. A ocorrência de retenção de placenta, a qualidade do colostro avaliada pelo colostrômetro e pela técnica de imunodifusão radial não foram diferentes entre os animais que receberam mistura de minerais iônicos ou complexados ( $P > 0,05$ ) (Tab. 3).

Vários fatores têm sido apontados como causas de retenção de placenta, entre eles deficiências de macro e microminerais e alterações na resposta imune. Os animais receberam a mistura

com minerais complexados, aproximadamente, nas seis semanas anteriores ao parto; as concentrações séricas de Cu foram alteradas, mas não refletiram em redução na ocorrência de retenção de placenta e na melhora da qualidade do colostro.

A concentração média de IgG encontrada no colostro dos dois grupos foi de 79,9 $\pm$ 24,9mg/mL; este valor está dentro da faixa considerada normal (Gapper *et al.*, 2007).

Tabela 3. Qualidade do colostro avaliada por colostrômetro e concentração de IgG mg/mL, avaliada por imunodifusão radial, e ocorrência de retenção de placenta em vacas que receberam, no período pré-parto, mineral iônico ou complexado

Grupo	Concentração de IgG mg/mL <sup>1</sup>	Qualidade do colostro <sup>2</sup>			Retenção de placenta <sup>2</sup>
		< 20mg/dL	>20mg/dL <50mg/dL	> 50mg/dL	
Mineral iônico	72,6±24,1	11/28 (39,3%)	3/28 (10,7%)	14/28 (50%)	14/69 (20,3%)
Mineral complexado	86,8±24,5	5/28 (18,5%)	18/28 (60%)	18/28 (60%)	8/66 (12,1%)

<sup>1</sup> Teste de Duncan (P>0,07); concentração de IgG CV: 30,7. ( ) frequência relativa; <sup>2</sup> Teste de qui-quadrado (P>0,05)

### CONCLUSÕES

A utilização de complexos de minerais para vacas no pré-parto, por um período de aproximadamente 42 dias antes do parto, não alterou a qualidade do colostro, as concentrações séricas de IgG e Zn e a ocorrência de retenção de placenta. Contudo, este estudo demonstrou aumento na concentração de cobre sérico com a utilização de complexos orgânicos, o que pode indicar diferenças no tempo de suplementação para os diferentes minerais, merecendo, dessa forma, novas investigações.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à fazenda São João, por permitir realizar este experimento em suas instalações, à Tortuga, pelo apoio para realização deste experimento e à Escola de Engenharia da UFMG, pelas análises de minerais no soro dos animais.

### REFERÊNCIAS

BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.*, v.73, p.2804-2819, 1995.

BERTICS, S.J.; GRUMMER, R.R.; CADORNINGA-VALINO, C. *et al.* Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration in early lactation. *J. Dairy Sci.*, v.75, p.1914-1922, 1992.

BOLAND, M.P. Trace minerals in production and reproduction in dairy cows. *Adv. Dairy Tech.*, v.15, p.319-330, 2003.

BRANDON, M.R.; WATSON, D.L.; LASCELLES, A.K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretions of cow. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, v.49, p.613-623, 1971.

DAVIS, A.J.; FLEET, R.J.A.; GOODE, M.H. *et al.* Changes in mammary gland function at the onset of lactation in the goat: correlation with hormonal changes. *J. Physiol.*, v.288, p.33-44, 1979.

ERSKINE, R.J. Nutrition and mastitis. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*, v.9, p.551-561, 1993.

FLEENOR, W.A.; STOTT, G.H. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *J. Dairy Sci.*, v.63, p.973-977, 1980.

FLEENOR, W.A.; STOTT, G.H. Single radial immunodiffusion analysis for quantitation of colostrum immunoglobulin concentration. *J. Dairy Sci.*, v.64, p.740-747, 1981.

GAPPER, L.W.; COPESTAKE, D.E.J.; OTTER, D.E. *et al.* Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.389, p.93-109, 2007.

GOFF, J.P. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.1292-1301, 2006.

- GUTHRIE, L.D.; WEST, J.W. Nutrition e reproduction interactions in dairy cattle. The University of Georgia College of Agricultural e Environment Science Cooperative Extension Service, 2008. Disponível em: <<http://www.ahdairy.com/uploads/articles/nutritionreproductioninteractionsindairy cattle.pdf>> Acesso em: 08 fev. 2009.
- GUY, M.A.; McFADDEN, T.B.; COCKRELL, D.C. *et al.* Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.3002-3007, 1994.
- HURLEY, W.L.; DOANE, R.M. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.784-804, 1989.
- KIMURA, K.; GOFF, J.P.; KEHRLI, M.E. Jr. *et al.* Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.544-550, 2002.
- KINCAID, R.L.; SOCHA, M.T. Effect of cobalt supplementation during late gestation and early lactation on milk and serum measures. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.1880-1886, 2007.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMSANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, v.2, p.235-254, 1965.
- MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. *Reprod. Domest. Anim.*, v.37, p.53-56, 2002.
- NUTRIENT requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington: *National Academy of Sciences*, 2001. 381p.
- OFFICIAL methods of analysis. 13.ed. Washington: AOAC, 1980. 1015p.
- SANTOS, J.E.P. *Effect of degree of fatness prepartum on lactation performance and ovarian activity of early postpartum dairy cows*. 1996. 120f. Thesis. (Ph.D). Dept. Animal Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ.
- SANTOS, J.E.P. Efetividade do uso de minerais orgânicos para bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 8., 2006, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba:FEALQ, 2006. p.191-213.
- SORDILLO, L.M.; AITKEN, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.128, p.104-109, 2009.
- SPEARS, J.W.; WEISS, W.P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.*, v.176, p.70-76, 2008.
- SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D.; EVERSOLE, D.E. *et al.* Effect of selenium supplementation on colostrum IgG concentration in cows grazing selenium deficient pastures and on postsuckle serum IgG concentration in their calves. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.450-453, 1995.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.3583-3597, 1991.
- WEISS, W.P. Effect of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.3187-3194, 1990.
- WEISS, W.P. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: A review. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2493-2501, 1998.