



**ROBERTA FREITAS LACERDA**

**REDUÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MICROMINERAIS  
EM DIETAS PARA CÃES EM CRESCIMENTO**

**LAVRAS-MG**

**2020**

**ROBERTA FREITAS LACERDA**

**REDUÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MICROMINERAIS EM DIETAS PARA  
CÃES EM CRESCIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Paulo Borges Rodrigues

Orientador

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo

Coorientadores

**LAVRAS - MG**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lacerda, Roberta Freitas.

Redução da suplementação de microminerais em dietas para  
cães em crescimento / Roberta Freitas Lacerda. - 2020.

85 p.

Orientador(a): Paulo Borges Rodrigues.

Coorientador(a): Flávia Maria de Oliveira Borges Saad, Márcio  
Gilberto Zangerônimo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. microelementos orgânicos. 2. caninos. 3. desempenho. I.  
Rodrigues, Paulo Borges. II. Saad, Flávia Maria de Oliveira Borges.  
III. Zangerônimo, Márcio Gilberto. IV. Título.

**REDUÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MICROMINERAIS EM DIETAS PARA  
CÃES EM CRESCIMENTO**

**REDUCING SUPPLEMENTATION OF TRACE MINERALS IN DIETS FOR  
GROWING DOGS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 10 de fevereiro de 2020.  
Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad UFLA  
Dr. Antônio Gilberto Bertechini UFLA  
Dra. Ana Paula Peconick UFLA  
Dr. Walter Motta Ferreira UFMG

Prof. Dr. Paulo Borges Rodrigues  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela presença constante em minha vida, por ter guiado meu caminho e ter me permitido chegar até aqui. Ao meu Santo Anjo por estar sempre ao meu lado me acompanhando em cada passo.

Aos meus pais, Roberto e Odete, por todo amor, dedicação e esforço para que eu pudesse alcançar essa conquista e à minha irmã, Marianne, pela torcida e amizade. Sempre com amor incondicional e total apoio sem medir esforços para me verem feliz, não me deixando desanimar e me incentivando em todos os momentos.

Ao meu namorado, Marcos Paulo, pelo amor e amizade. Obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando e por ser minha paz nos momentos de aflição.

Aos meus avós, pelas orações e pensamentos positivos.

À Universidade Federal de Lavras, à Pós-Graduação em Zootecnia e ao Departamento de Zootecnia pela realização do curso.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Borges Rodrigues, pela ajuda e disponibilidade.

À Prof<sup>ª</sup>. Flávia Saad, pela orientação, paciência, exemplo de profissionalismo e estímulo à pesquisa científica.

À empresa ALLTECH pelo financiamento da pesquisa.

Aos integrantes do NENAC, por todo o aprendizado, pela ajuda na condução do experimento, pela amizade e por fazerem meus dias mais felizes durante a execução deste projeto.

Às amigas, Moara, Priscilla, e prima, Lí, pela amizade, força e incentivo. Sem vocês seria mais difícil.

Aos demais amigos que sempre torceram por minhas conquistas e estiveram presentes em vários momentos felizes de minha vida, o meu muito obrigada!

Aos médicos veterinários residentes do Hospital Veterinário da UFLA, pela paciência com meus filhotes e contribuições ao longo da execução do projeto.

Ao médico veterinário Luiz Eduardo Duarte de Oliveira, pela ajuda nas coletas de sangue dos animais, pela paciência, pelas risadas e por transformar os dias de trabalho mais leves todas as vezes que estive presente.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia-UFLA, principalmente ao Márcio Nogueira, pela colaboração nas análises químicas e pelos momentos de descontração.

Aos meus vinte e quatro filhotes, Bibi, Rubinho, Ariel, Bono, Bacon, Shakira, Pitucha, Rick, Lady, Bethoven, Charlotte, Emilly, Olliver, Cauã, Otto, Zeca, Aurora, Anna, Shitara, Logan, Júlia, Joca, Anitta e Paçoca, o meu amor eterno! Obrigada por tornarem os meus dias de trabalho muito, mas muito mais felizes e divertidos, além de loucos. Sempre me lembrarei de vocês com muito amor!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO GERAL

Devido à sua grande relevância no metabolismo e processos bioquímicos corporais de cães, os minerais são necessários em quantidades adequadas, sem falta ou excessos, devendo-se considerar também a origem da fonte, visto que este fator influi na disponibilidade desses nutrientes. Assim, vinte e quatro cães filhotes, aos 70 dias de idade, foram estudados durante 150 dias com o objetivo de avaliar os efeitos de fontes inorgânicas *versus* orgânicas e diminuição suplementar de cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) orgânico. Foram analisados o desempenho, parâmetros metabólicos e a quantidade de mineral retida no organismo dos animais (*status* mineral) através da quantificação dos minerais na pele, gônadas, pelo e excreção nas fezes e urina. A dieta controle (100% ING) foi suplementada com 11 mg de Cu/kg (sulfato), 88 mg de Fe/kg (sulfato), 5,6 mg de Mn/kg (sulfato), 0,35 mg de Se/kg (selenito) e 100 mg de Zn/kg, com base nas recomendações do National Research Council (NRC, 2006). Minerais orgânicos foram usados como substitutos na mesma concentração mineral (100% ORG) ou em menores quantidades (70% ORG e 40% ORG). Os cães foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso em quatro tratamentos com seis repetições por cada. Nenhuma diferença ( $p>0,05$ ) foi encontrada entre as fontes ING e ORG, nos seus diferentes níveis, para peso corporal; altura de cernelha; comprimento corporal; excreção fecal de Fe, Mn, Se e Zn; absorção e concentração de Fe, Cu, Mn, Se e Zn nas gônadas e pelo; excreção urinária de Fe, Cu, Mn e Zn; retenção de Fe, Mn e Zn; concentração de Cu, Mn, Se e Zn na pele; Fe, Cu e Se no plasma; atividade das enzimas SOD, GSH-Px, níveis plasmáticos de dialdeído malônico (MDA). Foi observada diferença ( $p<0,05$ ) entre as fontes e nos seus diferentes níveis para a densidade mineral óssea do úmero, rádio e ulna; concentração de Cu nas fezes; Se na urina; retenção de Cu e Se; concentração de Mn e Zn no plasma. Conclui-se que a redução nos níveis de suplementação da fonte orgânica não afetou o desempenho e a atividade antioxidante. A suplementação de até 70% da recomendação de Cu, Fe, Mn, Se e Zn, sob a forma orgânica, é efetiva em manter o *status* mineral, a defesa antioxidante e o desenvolvimento ósseo, resultando na manutenção do crescimento e metabolismo de cães filhotes dentro do normal.

Palavras-chave: microelementos orgânicos, caninos, desempenho.

## GENERAL ABSTRACT

Due to its great relevance in the metabolism and body biochemical processes of dogs, minerals are necessary in adequate quantities, without lack or excess, and the source must also be considered, since this factor influences the availability of these nutrients. Thus, twenty-four puppy dogs, at 70 days of age, were studied for 150 days in order to evaluate the effects of inorganic versus organic sources and a supplementary decrease in copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), selenium (Se) and organic zinc (Zn). The performance, metabolic parameters and the amount of mineral retained in the animals' body (mineral status) were analyzed through the quantification of minerals in the skin, gonads, hair and excretion in feces and urine. The control diet (100% ING) was supplemented with 11 mg Cu / kg (sulfate), 88 mg Fe / kg (sulfate), 5.6 mg Mn / kg (sulfate), 0.35 mg Se / kg (selenite) and 100 mg of Zn / kg, based on the recommendations of the National Research Council (NRC, 2006). Organic minerals were used as substitutes in the same mineral concentration (100% ORG) or in smaller quantities (70% ORG and 40% ORG). The dogs were distributed in a completely randomized design in four treatments with six repetitions each. No difference ( $p > 0.05$ ) was found between the sources ING and ORG, at their different levels, for body weight; withers height; body length; fecal excretion of Fe, Mn, Se and Zn; absorption and concentration of Fe, Cu, Mn, Se and Zn in the gonads and hair; urinary excretion of Fe, Cu, Mn and Zn; Fe, Mn and Zn retention; concentration of Cu, Mn, Se and Zn in the skin; Fe, Cu and Se in plasma; activity of SOD enzymes, GSH-Px, plasma levels of malonic dialdehyde (MDA). A difference ( $p < 0.05$ ) was observed between the sources and in their different levels for the bone mineral density of the humerus, radius and ulna; Cu concentration in faeces; If in urine; Cu and Se retention; plasma Mn and Zn concentration. It is concluded that the reduction in the supplementation levels of the organic source did not affect the performance and the antioxidant activity. Supplementing up to 70% of the recommendation of Cu, Fe, Mn, Se and Zn, in organic form, is effective in maintaining mineral status, antioxidant defense and bone development, resulting in the maintenance of growth and metabolism of puppy dogs within normal.

Key words: organic microelementos, canines, performance.

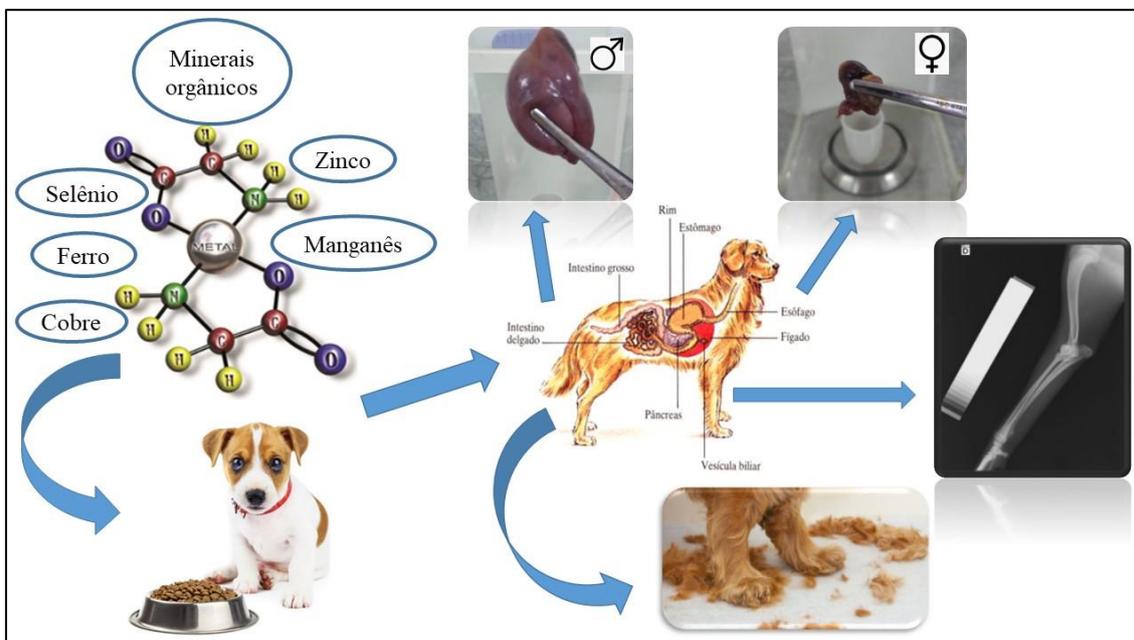
## REDUÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MICROMINERAIS EM DIETAS PARA CÃES EM CRESCIMENTO

Elaborado por Roberta Freitas Lacerda, orientada por Paulo Borges Rodrigues

A ligação dos minerais à uma molécula orgânica proporciona um aumento na absorção e disponibilidade do mineral no organismo, além de aumentar a sua estabilidade física reduzindo assim, a tendência de o micromineral dissociar-se. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da substituição de ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), selênio (Se) e manganês (Mn) inorgânico pela forma orgânica, incluídos na dieta em níveis usuais (100%) ou reduzidos (70% e 40%), sobre o crescimento de cães filhotes, durante 150 dias. Os parâmetros avaliados foram: *status* mineral do animais (consumo de cada mineral, excreção dos minerais nas fezes e urina, absorção e retenção no organismo, quantidade de mineral na pele, gônada, pelo e plasma dos animais), densidade mineral dos ossos úmero, rádio e ulna, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), peroxidação lipídica (concentração de malondialdeído - MDA), além do desenvolvimento dos animais através da medição da altura de cernelha, do comprimento corporal e peso corporal dos animais durante o período experimental.

Para o mineral Cu foi observado menor consumo, excreção nas fezes, absorção e retenção do mineral nos animais que receberam a fonte orgânica nos níveis 70% e 40%. Para todos os níveis da fonte orgânica encontrou-se menor excreção de Se na urina e, conseqüentemente, maior retenção desse mineral no organismo. Os animais que receberam 70% da fonte orgânica apresentaram maiores níveis de Fe na pele. No plasma, no nível de 40% de microminerais orgânicos, o Mn apresentou maior concentração, assim como para o Zn nos níveis 70% e 40%. A suplementação de 70% de microminerais orgânicos apresentou maior densidade dos ossos úmero, rádio e ulna.

Conclui-se que a redução nos níveis de suplementação da fonte orgânica não afetou o desempenho e a atividade antioxidante. A suplementação de até 70% da recomendação do NRC (2006) de Cu, Fe, Mn, Se e Zn, sob a forma orgânica, é efetiva em manter o *status* mineral, a defesa antioxidante e o desenvolvimento ósseo, resultando na manutenção do crescimento e metabolismo de cães filhotes dentro do normal.



Redução da suplementação de microminerais orgânicos para cães em crescimento

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

#### ARTIGO 2

- Figura 1 - Evolução do peso de cães filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (*Bioplex®TR*) de 70 a 120 dias de idade. ....64
- Figura 2 - Altura de cernelha de cães filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (*Bioplex®TR*)..... 65
- Figura 3 - Comprimento corporal (CC) de cães filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (*Bioplex®TR*).....66
- Figura 4 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) (*Bioplex®TR*). ....67
- Figura 5 - Atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH- Px) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) (*Bioplex®TR*). ....67
- Figura 6 - Concentração de malondialdeído (MDA) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) (*Bioplex®TR*). ....68

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Enzimas Cu-dependentes e suas funções .....	18
--	----

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Tabela 1 - Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para cães filhotes.....	35
Tabela 2 - Recomendação do NRC (2006) e redução dos níveis suplementares da fonte orgânica (ORG) e fonte inorgânica (ING) dos microminerais suplementados nas dietas experimentais para cães em crescimento.....	36
Tabela 3 - Composição analisada das fontes orgânicas (ORG) e fonte inorgânica (ING) dos microminerais suplementados nas dietas experimentais para cães em crescimento. ....	37
Tabela 4 - Concentração de ferro em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de ferro orgânico (Bioplex®TR).*	39
Tabela 5 - Concentração de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) no plasma de cães filhotes em jejum (0 horas), duas e seis horas após a alimentação com diferentes concentrações desses elementos de fonte inorgânica (ING) e orgânica (ORG) (Bioplex®TR).*	39
Tabela 6 - Concentração de zinco em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de zinco orgânico (Bioplex®TR).*	40
Tabela 7 - Concentração de cobre em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de cobre orgânico (Bioplex®TR).*	41
Tabela 8 - Concentração de selênio em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de selênio orgânico (Bioplex®TR).*	41
Tabela 9 - Concentração de manganês em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de manganês orgânico (Bioplex®TR).*	42

## ARTIGO 2

Tabela 1 - Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para cães filhotes. ....	60
Tabela 2 - Recomendação do NRC (2006) e redução dos níveis suplementares da fonte orgânica (ORG) e fonte inorgânica (ING) dos microminerais nas dietas experimentais para cães em crescimento. ....	61
Tabela 3 - Composição analisada de microminerais de fontes inorgânicas (ING) ou orgânicas (ORG) nas dietas experimentais para cães em crescimento. ....	62
Tabela 4 - Peso corporal de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) (Bioplex®TR). ....	64
Tabela 5 - Altura de cernelha (AC) e comprimento corporal (CC) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (Bioplex®TR). ....	65
Tabela 6 - Densidade mineral óssea (em milímetro de alumínio – mmAl) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) orgânicos (Bioplex®TR). ....	66

# Sumário

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 MICROMINERAIS .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1 Ferro.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.2 Zinco.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.3 Cobre .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.4 Selênio.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.5 Manganês.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 FONTES ORGÂNICAS DE MICROMINERAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS .....</b>	<b>31</b>
<b>ARTIGO 1 STATUS MINERAL DE CÃES EM CRESCIMENTO SUPLEMENTADOS COM MICROMINERAIS ORGÂNICOS .....</b>	<b>31</b>
<b>ARTIGO 2 DESEMPENHO ANIMAL E ATIVIDADE DE METALOENZIMAS DE CÃES EM CRESCIMENTO SUPLEMENTADOS COM MICROMINERAIS ORGÂNICOS .....</b>	<b>56</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. Introdução**

Os minerais são substâncias inorgânicas, presentes em todos os tecidos e fluidos corporais e sua presença é necessária para a manutenção de vários processos físico-químicos e biológicos essenciais à vida. Eles desempenham uma grande diversidade de funções no organismo. O fornecimento correto dos minerais pode contribuir para a prevenção de problemas de saúde do trato urinário, coração, articulações, ossos e metabolismo da glicose, que acometem com maior frequência os animais idosos. Contudo, a prevenção em animais jovens traz benefícios significativos que serão importantes para a qualidade de vida no futuro desses animais, que estão mais longevos.

Minerais que são necessários em quantidades relativamente grandes são referidos como macro minerais. Os que são requeridos em quantidades muito pequenas são chamados de microminerais ou minerais traço. Esses termos não implicam um papel menor para esses últimos. Pelo contrário, essas designações de quantidade são baseadas nas quantidades necessárias na dieta e suas concentrações geralmente baixas nos tecidos.

A concentração e a fonte dos minerais são dois aspectos importantes que devem ser considerados na formulação. O ideal é uma alimentação com níveis ótimos, sem excessos ou faltas, mas levando em consideração a origem da fonte, fator que afeta a disponibilidade dos minerais. As fontes minerais utilizadas nas rações são, geralmente, oriundas de compostos inorgânicos comumente adicionadas por meio de misturas minerais (premix), a fim de suplementar os minerais deficientes nas matérias primas. No entanto, a forma inorgânica pode apresentar baixo aproveitamento no organismo animal. Com isso, técnicas para obter microminerais mais estáveis e biodisponíveis foram elaboradas e estudadas justamente para beneficiar certos processos metabólicos e fisiológicos que geralmente não são executados com capacidade plena quando esses elementos são fornecidos da maneira convencional. São os chamados minerais orgânicos.

Minerais orgânicos são combinações de um ou mais minerais com substâncias orgânicas, como aminoácidos, carboidratos ou até mesmo proteínas, através de um processo chamado quelação. Esse processo é feito com o objetivo de aumentar a disponibilidade e melhorar o aproveitamento do mineral no organismo, evitando que reações químicas que ocorrem durante a digestão resultem em excreção e perda de minerais. A disponibilidade possivelmente aumenta porque a quelação protege o mineral dessas reações, além de aumentar

a estabilidade, inibir as interações desses elementos com outros nutrientes da dieta e ser menos tóxico ao organismo animal (JACQUES e MCKENZIE, 1991).

Dessa forma, no presente estudo, objetivou-se determinar os efeitos da substituição de fontes inorgânicas de microminerais (Cu, Fe, Mn, Se e Zn) por fontes orgânicas e sua redução, sobre o crescimento, desempenho, *status* mineral, parâmetros metabólicos, proteção antioxidante e densidade mineral óssea de cães filhotes.

## **2. Referencial teórico**

### **2.1 Microminerais**

Várias pesquisas evidenciam a importância dos microminerais na alimentação de seres humanos e animais. Os elementos traços, até recentemente, eram incluídos nas dietas apenas para corrigir carências nutricionais. Atualmente, sabe-se que potencializam aspectos de saúde e produção e são extremamente importantes na manutenção de processos metabólicos. Sua ingestão dietética ideal está relacionada com o aumento da longevidade e com a prevenção de doenças em animais e seres humanos (TODD et al., 2006)

Os elementos traço normalmente ocorrem e atuam nos tecidos em baixas concentrações, sendo essa a única propriedade que eles têm em comum. Geralmente são expressos como partes por milhão (ppm), ou micrograma por grama ( $\mu\text{g/g}$ ). As concentrações características e formas funcionais desses elementos devem ser mantidas dentro de limites estreitos, para que a integridade funcional e estrutural dos tecidos seja mantida e que o crescimento, a saúde e a fertilidade dos animais permaneçam inalterados. A ingestão contínua de dietas deficientes, desequilibradas ou excessivamente altas em um micromineral particular, induz mudanças nas atividades, funcionamento e concentrações desse elemento nos tecidos e fluidos corporais. Nessas circunstâncias as funções bioquímicas e fisiológicas são afetadas e os distúrbios estruturais podem surgir de formas que diferem com os diferentes elementos e duração da deficiência ou toxicidade dietética, e com a idade, sexo e espécie animal envolvida (UNDERWOOD, 2012).

A modulação da atividade de enzimas tem sido considerada a principal função dos microminerais. Os elementos traços fazem parte de metaloenzimas que estão envolvidas no metabolismo da maioria dos nutrientes, como lipídeos, carboidratos e aminoácidos. A presença ou ausência desses elementos pode alterar a atividade dessas enzimas, influenciando o metabolismo dos nutrientes (SHENKIN, 1993).

Os sintomas causados pelos desequilíbrios de microminerais da dieta não são específicos por se tratar de um grande número de elementos que desempenham as mais variadas e complexas funções no organismo. Segundo Veiga e Cardoso (2005), esses sintomas podem ser confundidos com aqueles causados por deficiência de energia e proteína (alimentação deficiente qualitativa e quantitativamente) ou por problemas de saúde (parasitismo e/ou doenças infecciosas).

### **2.1.1 Ferro**

O ferro (Fe) está presente em todas as células do organismo, mas a maior proporção desse elemento encontra-se como componente da hemoglobina e da mioglobina. Seu principal papel é na síntese de hemoglobina, onde atua como transportador de oxigênio (NRC, 2006). No entanto, é também um componente das enzimas citocromos que intervêm no transporte de íons hidrogênio durante a respiração celular (CASE et al., 2010). A recomendação de Fe para cães em crescimento, segundo o NRC (2006), é de 88 mg/Kg considerando um alimento com aproximadamente 4000 kcal de energia metabolizável/kg.

Ferritina e hemossiderina são as formas predominantes de armazenamento de Fe. São encontradas em vários tecidos, principalmente no fígado, baço e medula óssea. A relação ferritina/hemossiderina é afetada pela quantidade total de Fe armazenada (um aumento no armazenamento de Fe induz a um relativo aumento de hemossiderina) e a velocidade de armazenamento de Fe (um rápido aumento no Fe disponível aumenta o nível relativo de hemossiderina, provavelmente porque a apoferritina (parte proteica da ferritina livre de Fe) ocorre em quantidades limitadas) (RIIS, 1983).

Segundo Underwood (1999), nos monogástricos a absorção de Fe é afetada por: idade e *status* do mineral no organismo, condições do trato gastrointestinal, particularmente do duodeno que é o principal sítio de absorção; quantidade e forma química do Fe ingerido e quantidade e proporção de outros minerais e compostos na dieta, os quais podem interagir com o Fe. A presença de cobre, manganês, cobalto na dieta podem afetar a absorção de Fe por competirem pelo sítio de absorção do Fe.

A absorção de Fe dietético é pequena, na maioria dos animais. Aproximadamente 5 a 10% do Fe presente da na dieta é absorvido pelo organismo (ANDREWS, 2005). Hill et al (2001) relataram que a absorção aparente de Fe em cães adultos alimentados com dietas contendo diferentes inclusões de carne bovina e proteína de soja variou de 6,2 a 14,8%. A eficiência de absorção aumenta com a deficiência de ferro e diminui quando a eritropoiese está

deprimida. O Fe na forma de íon ferroso é absorvido com mais facilidade do que o Fe na forma de íon férrico. Portanto, um meio ácido (reductor) no intestino intensifica, em geral, a absorção de Fe. De forma análoga, o Fe do grupo heme, originado a partir da hemoglobina e da mioglobina nas fontes de origem animal, é absorvido melhor do que o Fe de fontes vegetais (CASE et al., 2010).

Na maioria dos animais ocorre uma conservação muito eficiente do Fe, sendo mínimas as perdas desse elemento. A reciclagem de Fe, através da catabolização das hemácias, é a principal fonte mineral no organismo (ANDREWS e SCHMIDT, 2007). Os macrófagos teciduais reconhecem os eritrócitos velhos e danificados e os fagocitam para removê-los da circulação. Dentro dos macrófagos, os eritrócitos são lisados e a hemoglobina é degradada. A heme oxigenase cataboliza a porção heme à biliverdina e, posteriormente, à bilirrubina. A bilirrubina será secretada na bile e excretada do organismo, enquanto o Fe volta à circulação ligado à transferrina (SILVA; MURA, 2010). Esse processo de reciclagem, garante a quantidade de Fe necessária para a síntese de novos eritrócitos (ANDREWS, 2005) .

Quantidades mínimas de Fe são perdidas por excreção renal e fecal. Como consequência, a demanda de Fe só aumenta drasticamente durante os períodos de perda sanguínea fora do normal, como parto, lesões ou doenças gastrointestinais ou infestações parasitárias graves. A deficiência de Fe provoca anemia microcítica e hipocrômica que, frequentemente, manifesta-se clinicamente com fadiga e depressão (CASE et al., 2010).

### **2.1.2 Zinco**

O zinco (Zn) é encontrado em todo o corpo, principalmente como constituinte intracelular, mas está presente na maioria dos tecidos em concentrações relativamente baixas (NRC, 2006). Meyer (1984) encontrou um conteúdo total de Zn corporal em filhotes recém-nascidos e em cães adultos jovens um valor de 9,5 e 23,1 mg/kg de peso corporal. Segundo o NRC (2006) a recomendação de Zn para cães em crescimento é de 100 mg/Kg considerando um alimento com aproximadamente 4000 kcal de energia metabolizável/kg.

O Zn participa como cofator ou catalisador em mais de 400 metaloenzimas envolvidas na replicação celular, metabolismo de carboidratos e proteínas, saúde da pele e cicatrização de feridas. Além de desempenhar um papel crucial na estrutura e função das membranas biológicas, bem como na estabilização de DNA e RNA (NRC, 2006).

Zn está presente em grande quantidade no esqueleto participando da formação e mineralização óssea (FONG et al., 2009). Atua na remodelação da matriz extracelular

colagenosa do osso através da participação em metaloproteínas de matriz, exercendo papel fundamental no desenvolvimento e na fase adulta (YAMAGUCHI e WEITZMANN, 2011).

O Zn é absorvido principalmente do intestino delgado em não ruminantes, sendo que a taxa de absorção está entre 15 e 40%. Ozpinar et al (2001) encontraram uma absorção de 25 a 34% em filhotes de cães. Os tecidos muscular e ósseo são os principais tecidos de reserva de Zn e possuem capacidade de liberar possíveis excedentes em condições de deficiência na dieta (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). A eficiência de absorção deste mineral está relacionada à disponibilidade de Zn no organismo, sendo maior em deficiência e menor em condições de excesso de Zn (FAIRWEATHER-TAIT, 1992).

O transporte do Zn é realizado principalmente por carreadores presentes na membrana, através da formação de quelatos com a metalotioneína, proteína de ligação produzida pelo fígado (MCDOWELL, 1992). Henriques et al. (2003) citam que o transporte de Zn é realizado também por difusão passiva e, já dentro da célula, o elemento é regulado por proteínas que ligam metais, como as metalotioneínas e as proteínas ricas em cisteína (CRIPs), que funcionam como enzimas de transporte intracelular. A metalotioneína inibe a absorção de Zn regulando a ligação do metal a CRIP. Os autores citam, ainda, como transportadores de membrana, ZnT- 1, ZnT-2, ZnT-3 e ZnT-4.

O Zn presente em altas concentrações nas células pode interferir com outros processos metalo-dependentes ou inibir proteínas. Assim, a tioneína se acopla ao Zn e age como marcador bioquímico que controla a concentração deste mineral. Um aumento na concentração de Zn disponível, induz a síntese de tioneína, por meio da ação do elemento sobre os fatores de transcrição Zn-dependentes, formando a metalotioneína. Na presença de baixas concentrações do mineral na célula, o Zn é liberado da metalotioneína (MARET, 2000).

A absorção de Zn está em grande parte envolvida com outras substâncias da dieta que podem alterar sua biodisponibilidade. Produtos de origem vegetal contém substâncias que interferem na absorção, sendo o mais notável, o fitato. Esta interferência pode aumentar ainda mais se houver altas concentrações de cálcio na dieta. Sabe-se que o fitato liga-se mais fortemente ao Zn do que ao cobre ou manganês (MORRIS e ROGERS, 1994). A excreção de Zn se dá primariamente nas fezes através do suco pancreático, bile e outras secreções digestivas (WEDEKIND, 2010).

Devido à sua função na síntese de proteínas, a deficiência de Zn costuma associar-se ao atraso do crescimento nos animais jovens. Outros sinais clínicos são anorexia, atrofia testicular, alterações na reprodução, disfunção do sistema imunológico e desenvolvimento de lesões

cutâneas. Nos cães, os primeiros sintomas clínicos de deficiência de Zn costumam ser alterações da pele e da capa pilosa (CASE et al., 2010).

### 2.1.3 Cobre

Altas concentrações de cobre (Cu) são encontradas em vários tecidos como fígado, cérebro, rins, coração e pelos. Após de Fe e Zn, o Cu é o terceiro elemento traço mais comum no organismo (SCHÜMANN et al., 2002).

Três tecidos principais podem ser utilizados para avaliar a concentração desse mineral no organismo: plasma sanguíneo, fígado e pelo. Mais de 90% desse elemento no plasma está na forma de ceruloplasmina. Assim, o Cu do plasma sanguíneo pode ser estimado como o elemento (por absorção atômica, por exemplo) ou como ceruloplasmina, através da atividade enzimática. Ambos resultados são altamente correlacionados, mas como ceruloplasmina é a preferida, pois não é contaminado pelo material de amostragem. A determinação no fígado é o indicador mais confiável que o plasma, principalmente em casos de intoxicação por Cu. No entanto, a dificuldade da biopsia restringe esta determinação apenas para os casos de necropsia (RIIS, 1983).

O Cu é parte integrante de várias enzimas (Tabela 1). Para sua função, elas exigem apenas o elemento ou o Cu e outros íons metálicos como cofatores. Tais enzimas são: Cu-Zn-superóxido dismutase (Cu-Zn-SOD), ceruloplasmina, citocromo oxidase, tirosinase e lisina oxidase. Além disso, fatores de transcrição dependentes de Cu também desempenham um papel importante na expressão gênica. As enzimas em que esse mineral é um componente intrínseco do centro catalítico são membros da família da oxi-redutase. Essas são essenciais para a respiração celular, defesa contra os radicais livres, síntese de melanina, formação de tecido conjuntivo e metabolismo de Fe (Schumann et al., 2002).

O papel do Cu em Cu-Zn-SOD tem sido intensamente estudado. A SOD catalisa a dismutação de ânions no citoplasma, que é um subproduto da respiração celular. Durante a dismutação, o Cu no centro ativo da SOD é reduzido pelo substrato  $O_2^-$ ; os metabólitos resultantes são  $O_2$  e  $H_2O_2$ . Nesta reação, o Cu não pode ser substituído por nenhum outro metal. Mutações genéticas da SOD1 que alteram a enzima acompanham o aumento da apoptose de células neuronais, por exemplo, na esclerose lateral amiotrófica (ELA) (SCHÜMANN et al., 2002).

Tabela 1 - Enzimas Cu-dependentes e suas funções

Enzimas	Função
Cu-Zn-superóxido dismutase	Defesa antioxidante
Ceruloplasmina	Ligação do Fe à transferrina
Citocromo oxidase	Respiração celular
Tirosinase	Síntese de melanina
Lisina oxidase	Formação de colágeno

Fonte: adaptado de SCHÜMANN et al. (2002).

O metabolismo do Fe e do Cu está inter-relacionado através da atividade ferroxidase da ceruloplasmina. A maior parte do Cu presente no sangue encontra-se unido à ceruloplasmina, uma proteína ferroxidase Cu-dependente que atua como transportadora de Cu e intervém na oxidação do Fe plasmático, necessária para a conjugação com a transferrina (CASE et al., 2010). Em indivíduos com deficiência hereditária de ceruloplasmina, a falta de atividade ferroxidase diminui a conversão de  $Fe^{2+}$  em  $Fe^{3+}$  e, conseqüentemente, a ligação do Fe à transferrina (GITLIN, 1998). A consequência é uma distribuição de Fe prejudicada. (GUTTERIDGE, 1980).

A absorção de Cu ocorre principalmente no estômago e na porção cranial do intestino delgado por difusão passiva e transporte por proteína carreadora, a metalotioneína. A interação com outros fatores dietéticos, como presença de fitato, altos níveis de cálcio, Fe, Zn e cádmio, e a forma química do elemento interferem na absorção (MCDOWELL, 1992). A metalotioneína nas células intestinais regula a absorção de Cu de forma que altos níveis de ingestão de Zn pode inibir a absorção, pois o Zn estimula a produção de metalotioneína, o que bloqueia a absorção transcelular desse mineral (LEONE et al., 1985).

O Cu absorvido é transportado no plasma ligado à albumina e é incorporado na ceruloplasmina no fígado, sendo, em seguida, levado aos tecidos pela circulação (SILVA; MURA, 2010). O principal local de armazenamento de Cu é no fígado. Aproximadamente 0,5-1,5 mg de Cu absorvido é re-excretado na bÍlis e, portanto, perdido nas fezes. Pequenas quantidades são excretadas na urina, suor e pele (CASE et al., 2010).

Problemas reprodutivos, deformidades fetais, hipopigmentação do pelo, perda fetal precoce são sinais de deficiência de Cu em gatos (WEDEKIND et al., 2010). Devido à formação incompleta da matriz de colágeno do osso, resultante da diminuição atividade da enzima lisil

oxidase, a qual contém o Cu em sua composição, a falta de Cu resulta em metabolismo ósseo anormal e anormalidades esqueléticas (RUCKER et al., 1996). O NRC (2006) recomenda uma quantidade de Cu de 11 mg/Kg para cães em crescimento, considerando um alimento com aproximadamente 4000 kcal de energia metabolizável/kg.

#### **2.1.4 Selênio**

O selênio (Se) está amplamente distribuído nos tecidos animais, ainda que presente em pequenas quantidades em alguns órgãos ou tecidos (NRC, 2006). Na maioria das espécies, são encontradas altas concentrações desse mineral no fígado e rins, no entanto, maiores concentrações de Se estão presente nos músculos (UNDERWOOD, 2012).

O Se possui grande potencial antioxidante, agindo no combate a radicais livres que causam a oxidação das membranas celulares. A ação antioxidante do Se ocorre em conjunto com a vitamina E, a vitamina previne a formação dos peróxidos e o mineral atua combatendo os peróxidos já formados (BERTECHINI, 2014). A enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) juntamente com outras enzimas não selenadas como catalase e superóxido dismutase fazem parte da primeira linha de defesa antioxidante. O Se é componente essencial da enzima GSH-Px sendo que o sítio catalítico dessa enzima inclui o resíduo selenocisteína e, seu o nível de atividade são indicativos do suprimento desse mineral no organismo (LI et al., 2018). Essa enzima desativa a formação de peróxidos durante a oxidação dos lipídeos da membrana celular, protegendo as membranas celulares dos radicais livres e outros danos oxidativos (MCDOWELL, 1992).

O Se atua também na produção e regulação dos níveis dos hormônios da tireóide. Na forma de selenocisteína, o Se participa da iodotironina-deiodinase, enzima responsável pela ativação dos hormônios da tireóide (NRC,2006).

A forma química do Se, orgânica ou inorgânica, determina a sua absorção. A selenometionina é a principal forma orgânica encontrada e possui absorção semelhante à da metionina, através do sistema de transporte de aminoácidos sódio dependente, ou seja, por transporte ativo (KATE, 2001). Já a forma inorgânica é absorvida por meio de difusão simples (BERTECHINI, 2014). Uma vez absorvido, todas as formas de Se são convertidas em única forma, o hidreto de selênio ( $H_2Se$ ) e depois são encaminhadas para possíveis destinos, resultando no estoque, síntese de selenoproteínas ou excreção (DANIELS, 1996).

A principal forma de eliminação do Se é por meio da urina, podendo também haver excreção nas fezes e exalação (quando concentrações tóxicas são consumidas) (COMINETTI

e COZZOLINO, 2009). A excreção fecal permanece constante sobre uma vasta ingestão de Se. Já a excreção urinária está intimamente relacionada à ingestão dietética, como observado em ratos e humanos, em que a excreção via urina aumenta proporcionalmente ao aumento da ingestão do mineral (MCDOWELL, 1992)

A deficiência de Se induz o estresse oxidativo, inflamação e apoptose celular, além de causar distúrbios estruturais e funcionais na tireoide, no sistema imunológico e nos tecidos dos animais como: músculos, fígado, rim, pâncreas (DALIA et al., 2017). Graças à abundância de Se nos alimentos, as deficiências naturais deste elemento nunca representam um problema em cães. No entanto, como em outros oligoelementos, a ingestão excessiva de Se é tóxica (CASE et al., 2010). Para cães em crescimento, a recomendação de Se é de 0,35 mg/Kg considerando um alimento com aproximadamente 4000 kcal de energia metabolizável/kg (NRC, 2006).

### **2.1.5 Manganês**

O elemento traço manganês (Mn) ocorre em quantidades muito pequenas em tecidos animais (NRC, 2006). Henry et al. (1995) encontraram em gatos com peso corporal de quatro quilos, uma quantidade de 2,3 mg de Mn.

O Mn tem função como ativador de enzima ou como um constituinte de metaloenzimas. Arginase, piruvato carboxilase e superóxido dismutase são exemplo de enzimas que contem esse mineral. Já as hidrolases, quinases, descarboxilases e transferases são enzimas ativadas por Mn. Esse mineral tem papel essencial na síntese de mucopolissacarídeos importantes para formação da matriz dos ossos, como sulfato de condroitina, sendo imprescindível ao desenvolvimento dos ossos e cartilagem (SILVA e PASCOAL, 2014). Está envolvido no metabolismo lipídico, através de sua participação na biossíntese de colina e colesterol e, na reprodução (CASE et al., 2010).

No plasma, o Mn está amplamente ligado à gamaglobulina e à albumina, e uma pequena fração do  $Mn^{+3}$  está ligada à proteína transportadora de ferro, a transferrina (AISEN et al., 1969). Aproximadamente 1 a 5% do Mn ingerido é normalmente absorvido (DAVIS et al., 1993). Sua absorção no trato gastrointestinal é influenciada por fatores como a concentração na dieta, eliminação através da bile, presença de outros minerais e fitatos (ASCHNER e ASCHNER, 2005). Cálcio, fósforo e ferro são os principais minerais que interferem diretamente sobre a absorção do Mn, sendo os dois primeiros por competição pelo sítio de ligação (MCDOWELL, 1992). É excretado principalmente na bile, no entanto, o suco

pancreático e intestino delgado também participam da regulação dos níveis no tecido (WEDEKIND et al., 2010).

Não se tem descrito deficiências naturais de Mn em cães. No entanto, a deficiência desse mineral caracteriza-se, em outras espécies, por atraso do crescimento, deterioração da reprodução e transtornos do metabolismo lipídico (CASE et al., 2010). O NRC (2006) recomenda para cães em crescimento uma quantidade de 5,6 mg/Kg de Mn considerando um alimento com aproximadamente 4000 kcal de energia metabolizável/kg.

## **2.2 Fontes orgânicas de microminerais**

Alimentos naturais, como milho, trigo, farelo de soja, habitualmente utilizados na alimentação de cães, contêm microminerais essenciais que são requeridos por eles. No entanto, esses elementos estão, frequentemente, em uma forma que os tornam indisponíveis para o animal. Além disso, as concentrações dos microminerais nesses alimentos não atendem às suas necessidades, mesmo se estivessem em uma forma totalmente disponíveis. Conseqüentemente, quando existem deficiências de um ou mais dos elementos minerais vestigiais numa dieta, esses são normalmente fornecidos numa forma suplementar inorgânica ou orgânica, essa última também chamada de quelatos (MILES e HENRY, 2000).

A *Association of American Feed Control Officials – AAFCO* (1997) define os minerais orgânicos como sendo “íons metálicos unidos por ligações químicas a uma molécula orgânica, sendo que desta união, resulta uma estrutura com alta estabilidade e biodisponibilidade”.

Minerais orgânicos são normalmente produzidos pela hidrólise inicial da fonte de proteína, que resulta na formação de um hidrolisado contendo uma combinação de aminoácidos e peptídeos de determinados comprimentos de cadeia. Sob condições adequadas, a reação de um sulfato metálico com este hidrolisado resulta na formação de complexos contendo íons metálicos quelatados. Tais minerais também podem ser sintetizados através da biossíntese, como ocorre na formação da selenometionina e selenocisteína, neste caso, utiliza-se um meio contendo Se inorgânico e leveduras. A levedura incorpora o Se ao invés do enxofre na metionina ou cisteína (HYNES e KELLY, 1995).

Fatores envolvendo a compreensão do Fe ligado à hemoglobina ajudam no conceito de utilização de minerais quelatados. Há uma série de minerais traços como o Cu e o Mn que podem alterar a absorção do Fe inorgânico, mas pouco afeta o Fe ligado à hemoglobina. A biodisponibilidade dos minerais orgânicos é melhor e mais consistente devido à padronização desses durante o processo de fabricação, contra condições menos padronizadas de sais

inorgânicos. Há também relatos de minerais orgânicos sendo mais utilizados em nível celular, seguido de absorção (SCATOLINI, 2007).

Os ligantes orgânicos geralmente são uma mistura de aminoácidos ou de peptídeos pequenos, uma molécula que contém um átomo com um par de elétrons disponível. No processo de quelação, o ligante atua como agente quelante e circunda o átomo de metal para formar uma estrutura de anel heterocíclico, ou seja, o átomo de metal é ligado ao ligante através de átomos doadores, como o oxigênio do grupo carboxila, nitrogênio ou enxofre do aminoácido ou peptídeo. Esses quelantes tem o papel de aumentar a absorção e disponibilidade do mineral no organismo, além de aumentar a sua estabilidade física reduzindo assim, a tendência do micromineral dissociar-se (ACDA e CHAE, 2002).

A quelação de um mineral com um aminoácido ou proteína é feita visando aumentar a disponibilidade e melhorar a utilização do mineral no organismo. A disponibilidade possivelmente aumenta porque a quelação protege o mineral de reações químicas que ocorrem durante a digestão e que resultam em excreção e perda (JACQUES e MCKENZIE, 1991). Em um quelato a relação molar entre o metal e o aminoácido deve ser 1:1 a 1:3 (preferencialmente 1:2). Isto é exigido para que se formem ligações covalentes entre a molécula orgânica e o íon (SPEARS, 1996).

Fatores inerentes aos minerais orgânicos como a elevada biodisponibilidade do mineral, isto é, capacidade de transpor facilmente a barreira das paredes intestinais e entrar em circulação no organismo, a baixa toxicidade dos minerais e fácil inserção dos minerais nas moléculas específicas do organismo possibilitam um maior controle do nível de minerais na célula (SANTOS, 1998).

Os minerais quelatados entram no trato intestinal já ligados ao aminoácido, diminuindo os riscos da não absorção. Se mantém intacto no organismo após a absorção, ou seja, a sua ligação com o aminoácido permanece inalterada (WAPNIR e STIEL, 1986). O elemento mineral metálico na molécula é quimicamente inerte por possuir um tipo de ligação estável, a qual impede a ação química no estômago, evitando desta forma, a dissociação das moléculas.

A absorção dos minerais orgânicos é feita através das vias de absorção das moléculas orgânicas que os ligam e não por transportadores intestinais clássicos de minerais. Dessa forma, a competição entre os elementos pelos mesmos mecanismos de absorção é reduzida (RUTZ et al., 2007). A estrutura da molécula se manteria íntegra até chegar ao local de absorção e processos biológicos podem ser estimulados ou a molécula pode estar presente em compartimentos no organismo, diferentemente das formas inorgânicas (SPEARS, 1996).

A eficiência de absorção a partir do lúmen intestinal para o sangue é determinante para se conhecer a biodisponibilidade dos minerais. No entanto, em alguns casos, os nutrientes absorvidos podem estar na forma na qual não são utilizados. Os minerais quando metabolizados liberam os respectivos íons que são utilizados pelo organismo. Assim, suas necessidades são sempre iguais às perdas obrigatórias acrescentadas às quantidades para a formação de tecidos novos ou de crescimento. Desta forma, nas recomendações de minerais, deve-se considerar também sua absorção intestinal, biodisponibilidade e inter-relações com outros nutrientes que intervêm na absorção (CARRAZZA, 1988).

A biodisponibilidade do mineral é influenciada por propriedades específicas do mineral da forma como está incluído na dieta. Deve-se considerar sua valência e forma molecular (orgânica *versus* inorgânica). Devido à estas propriedades específicas, o mineral pode formar complexos com outros componentes no intestino, dificultando ou facilitando a absorção pela mucosa, o transporte ou o metabolismo do mineral no organismo. Sabe-se que certos minerais, em sua forma inorgânica, competem com outros minerais por sítios de ligação e por absorção no intestino. Para a garantia de ótimo desempenho animal, é importante conhecer a biodisponibilidade dos minerais traço nos ingredientes e fontes suplementares, visando também a formulação adequada de uma ração (MILES e HENRY, 2000).

A utilização dos minerais inorgânicos é, tradicionalmente, considerada mais econômica, uma vez que as fontes orgânicas usualmente têm o custo mais elevado quando comparados com fontes inorgânicas. Entretanto, como mencionado acima, em algumas situações, os minerais orgânicos podem atingir fins biológicos que os inorgânicos não podem (SPEARS, 1996). Além disso, no caso de animais de companhia o que se almeja é a longevidade dos animais, então, considerando as vantagens da inclusão das fontes orgânicas e o objetivo da sua utilização na indústria PET, essa tem o custo-benefício melhor.

Reis (2016) observou maior concentração de Se em todos os grupos de animais suplementados com fonte orgânica quando comparado àqueles animais que consumiram minerais de fonte inorgânica. Isso possivelmente ocorreu devido a um metabolismo mais eficiente da fonte orgânica, já que o selenito é reduzido a selenato e só posteriormente a selenofosfato, o único precursor da selenocisteína; ao passo que a selenometionina é a fonte de Se metabólico reduzido disponível para ser convertido rapidamente a selenocisteína.

Putarov (2010) comparando diferentes fontes de Se na forma orgânica e inorgânica em dietas para cães, na curva pós-prandial de absorção plasmática de Se feita cada 2 horas, observou uma maior absorção de Se nos animais que receberam a fonte orgânica.

França et al. (2008), avaliando fontes suplementares de Zn (Zn-aminoácido, sulfato de Zn e óxido de Zn) para gatos adultos, observaram que animais que receberam Zn quelatado e óxido de Zn apresentaram maior concentração do mineral na pele; animais que consumiram a fonte quelatada e na forma de sulfato apresentaram maior concentração de Zn no pelo.

Jamikorn; Preedapattarapong (2008) avaliando a forma orgânica de Zn (Zn metionilglicinato - ZnMG) comparada ao sulfato de Zn (ZnSO<sub>4</sub>), encontraram maior taxa de crescimento de pelo, maior nível de deposição no pelo, maior absorção e concentração plasmática de Zn em cães alimentados com a fonte orgânica.

Em um estudo comparando Cu, Mn, Zn quelatado e inorgânico em cadelas em gestação e lactação e nos seus filhotes, Kuhlman e Rompala (1998) não relataram diferença significativa no peso corporal e concentração dos minerais no pelo das cadelas; assim como na taxa de crescimento dos filhotes. No entanto, os animais suplementados com o quelato apresentaram pelos mais suaves e menos fragmentados.

Lowe et al. (1994) verificaram que a absorção de Zn em cães adultos na forma de quelato foi significativamente maior em relação ao óxido de Zn e que, para o Zn aminoácido, ela aproximou-se da absorção de aminoácido livre, de aproximadamente, 89%. Estes autores mostraram também que o cálcio causou um declínio no consumo de Zn, evidenciado pelo aumento do Zn fecal. Esse efeito na diminuição do consumo de Zn devido ao cálcio foi menor nos cães alimentados com quelato Zn aminoácido, comparado com os cães alimentados com óxido de Zn ou Zn polissacarídeo.

Em animais de produção, os estudos analisam o desempenho dos animais alimentados com dietas que apresentam reduzida suplementação de microminerais na forma organicamente complexada.

Scatolini (2007) estudando aves em segundo ciclo de produção não observou influência da suplementação de Zn, Cu, Mn, Se e Fe, comparando formas inorgânicas e orgânicas de cada mineral testados individualmente e/ou associados, sobre o peso dos ovos, percentagem de postura e consumo de ração.

Yan & Waldroup (2006) avaliaram a suplementação de Mn na forma orgânica e na forma inorgânica (óxido e sulfato de manganês) para frangos de corte Cobb 500. Não foram observados efeitos significativos sobre o desempenho zootécnico (peso corporal, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade) das aves. No entanto, foram observadas maiores concentrações de Mn nas tíbias das aves alimentadas com minerais orgânicos, cujos valores

diferem de 15,81% e 53,89% para o sulfato de manganês e para o óxido de manganês, respectivamente.

Xavier et al. (2004) observaram melhorias nos índices de desempenho de poedeiras semipesadas no segundo ciclo de produção, e concluíram que existem benefícios na inclusão de Se, Zn e Mn sob a forma de complexo orgânico nesta fase. Albuquerque (2004) e Sechinato (2003) avaliaram o efeito da suplementação dietética de fontes orgânicas de Zn, Cu, Mn, Se, Fe e I e concluíram que a suplementação desses microminerais, na forma isolada ou combinada, não afetaram o desempenho de poedeiras no primeiro ciclo produtivo.

Burkett et al. (2005) constataram que os melhores resultados foram alcançados, quando houve redução de 50% dos níveis normais dos minerais traços, que foram adicionados na forma orgânica na dieta de suínos. Freumant (2003) encontrou melhores resultados de desempenho em suínos quando o Zn, Mn, Cu e Fe foram reduzidos em 30% dos níveis normais e adicionados na forma de orgânica.

Não foram encontrados na literatura estudos em que foram avaliados a troca da fonte inorgânica pela orgânica de uma gama de microminerais na dieta de cães em crescimento sendo necessário, portanto, analisar os efeitos dessa troca e quais os níveis ideais de cada mineral que podem ser utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAFCO. **Official Publication**. Atlanta: 1997.

ACDA, S.; CHAE, B. A review on the applications of organic trace minerals in pig nutrition. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 25-30, 2002.

AISEN, P.; AASA, R.; REDFIELD, A. G. The chromium, manganese, and cobalt complexes of transferrin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 17, p. 4628-4633, 1969.

ALBUQUERQUE, R. D. **Produção e qualidade da casca de ovos de galinhas poedeiras recebendo microminerais orgânicos em sua dieta**. 2004. (Tese (doutorado)). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP., 2004.

ANDREWS, N. C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159-169, 2005.

ANDREWS, N. C.; SCHMIDT, P. J. Iron homeostasis. **Annual Review Physiology**, v. 69, p. 69-85, 2007.

ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 353-362, 2005.

BERTECHINI, A. G. Metabolismo de Minerais. In: SAKOMURA, N. K. S., J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. (Ed.). **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 678. 2014.

BURKETT, J. et al. Growth comparison and fecal mineral excretion of inorganic and organic trace mineral supplementation in swine. **Animal Industry Report**, v. 651, n. 1, p. 17, 2005.

CARRAZZA, R. F. Minerais em dietas latino-americanas. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 38, n. 3, p. 599-621, 1988.

CASE, L. P. et al. **Canine and Feline Nutrition-E-Book: A Resource for Companion Animal Professionals**. Elsevier Health Sciences. 2010.

COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: Selênio. . In: (Ed.). **Série de publicações ILSI Brasil**. São Paulo, v.8, 1-20. 2009.

DALIA, A. et al. The effect of dietary bacterial organic selenium on growth performance, antioxidant capacity, and Selenoproteins gene expression in broiler chickens. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 254, 2017.

DANIELS, L. A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biological trace element research**, v. 54, n. 3, p. 185-199, 1996.

DAVIS, C. D.; ZECH, L.; GREGER, J. Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 202, n. 1, p. 103-108, 1993.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of trace elements. **Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 213-217, 1992.

FONG, L. et al. Interaction of dietary zinc and intracellular binding protein metallothionein in postnatal bone growth. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1151-1162, 2009.

FRANÇA, J. et al. Fontes suplementares de zinco para gatos adultos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, 2008.

FREMAUT, D. Trace mineral proteinates in modern pig production: reducing mineral excretion without sacrificing performance. **Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries**, p. 171-178, 2003.

GITLIN, J. D. Aceruloplasminemia. **Pediatric research**, v. 44, n. 3, p. 271, 1998.

GUTTERIDGE, J. Iron-oxygen reactions and their use in clinical chemistry. **Medical laboratory sciences**, v. 37, n. 3, p. 267, 1980.

HENRIQUES, G. S.; HIRATA, M. H.; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da Enzima Conversora de Angiotensina. **Revista de nutrição**, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.

HENRY, P. R. Manganese bioavailability. In: (Ed.). **Bioavailability of Nutrients for Animals**: Elsevier, 239-256. 1995.

HILL, R. et al. The effect of texturized vegetable protein from soy on nutrient digestibility compared to beef in cannulated dogs. **Journal of animal science**, v. 79, n. 8, p. 2162-2171, 2001.

HYNES, M. J.; KELLY, M. P. Metal ions, chelates and proteinates. **Annual of the 11th Symposium of Biotechnology in the Feed Industry**, Nottingham University Press. p.233-248. 1995.

JACQUES, K.; MCKENZIE, C. Organic trace minerals on the farm. **Feeds & Feeding**, v. 16, p. 155-162, 1991.

JAMIKORN, U.; PREEDAPATTARAPONG, T. Comparative effects of zinc methionylglycinate and zinc sulfate on hair coat characteristics and zinc concentration in plasma, hair, and stool of dogs. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 4, p. 9-16, 2008.

KATE, A. Selenium metabolism in animals: the relations between dietary selenium from physiological response. **Proceedings of Alltech's 17th Symposium**, 2001.

KUHLMAN, G.; ROMPALA, R. E. The influence of dietary sources of zinc, copper and manganese on canine reproductive performance and hair mineral content. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12S, p. S2603, 1998.

LEONE, A.; PAVLAKIS, G. N.; HAMER, D. H. Menkes' disease: abnormal metallothionein gene regulation in response to copper. **Cell**, v. 40, n. 2, p. 301-309, 1985.

LI, J. et al. Effects of different selenium sources on growth performance, antioxidant capacity and meat quality of local Chinese Subei chickens. **Biological trace element research**, v. 181, n. 2, p. 340-346, 2018.

LOWE, J. A.; WISEMAN, J.; COLE, D. J. A. Zinc source influences zinc retention in hair and hair growth in the dog. **The Journal of Nutrition**, v. 124, n. 12, p. 2575S, 1994.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1455S-1458S, 2000.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. Academic Press Inc. 1992.

MEYER, H. Mineral metabolism and requirements in bitches and suckling pups. **ANDERSON, R**, Oxford: Pergamon Press. 13-24. 1984.

MILES, R. D.; HENRY, P. R. Relative trace mineral bioavailability. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 73-93, 2000.

MORRIS, J. G.; ROGERS, Q. R. Assessment of the nutritional adequacy of pet foods through the life cycle. **The Journal of nutrition**, v. 124, n. suppl\_12, p. 2520S-2534S, 1994.

NATIONAL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. National Academies Press. 2006.

NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. National Research Council: National Academies Press 2006.

ÖZPINAR, H. et al. Investigation of excretion and absorption of different zinc salts in puppies. **Laboratory animals**, v. 35, n. 3, p. 282-287, 2001.

PUTAROV, T. C. **Avaliação de fontes de selênio e seus efeitos no perfil metabólico e condição reprodutiva de cães**. 2010. 72 p. (Dissertação (mestrado)). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

REIS, J. S. **Microminerais biocomplexados em dietas para gatos em crescimento**. 2016. 146 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2016.

RIIS, P. M. **Dynamic biochemistry of animal production**. 3 ED. Amsterdam: Elsevier. 1983.

RUCKER, R. B. et al. Modulation of lysyl oxidase by dietary copper in rats. **The Journal of nutrition**, v. 126, n. 1, p. 51-60, 1996.

RUTZ, F.; PAN, E.; XAVIER, G. Efeito de minerais orgânicos sobre o metabolismo e desempenho de aves. **Revista Aveworld**. Disponível em < <http://www.aveworld.com.br/index.php/documento/141> >, Acesso em: 24 de março de 2018. 2007.

SANTOS, R. A. **Minerais quelatados na nutrição Animal**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Apostila. 1998.

SCATOLINI, A. M. **Mn, Zn e Se associados a moléculas orgânicas na alimentação de galinhas poedeiras no segundo ciclo de produção**. 2007. 51 p. (Dissertação (mestrado)). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP., 2007.

SCHÜMANN, K. et al. Hohenheim consensus workshop: copper. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 469, 2002.

SECHINATO, A. D. S.; DE ALBUQUERQUE, R.; NAKADA, S. Efeito da suplementação dietética com micro minerais orgânicos na produção de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 159-166, 2006.

SHENKIN, A. Current concepts on trace element requirements in nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 12, p. S114-S118, 1993.

SILVA, J. H. V.; PASCOAL, L. A. F. Função e disponibilidade dos minerais. In: SILVA, J. H. V. P., L. A. F. (Ed.). **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP: SAKOMURA,

N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L., 678. 2014.

SILVA, S. M. C.; MURA, J. D. P. Biodisponibilidade de minerais. In: (Ed.). **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2 ed. São Paulo: Roca, 113-125. 2010.

SPEARS, J. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 151-163, 1996.

TODD, S. E.; THOMAS, D.; TUCKER, L. Selenium requirements in cats and dogs. In: LAUE, D.-K. e TUCKER, L. (Ed.). **Recent Advances in Pet Nutrition**. Nottingham University Press, 79-89. 2006.

UNDERWOOD, E. **Trace elements in human and animal nutrition**. Elsevier. 2012.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3 ed. New York: Cabi Publishing. 1999.

WAPNIR, R. A.; STIEL, L. Zinc intestinal absorption in rats: specificity of amino acids as ligands. **The Journal of nutrition**, v. 116, n. 11, p. 2171-2179, 1986.

WEDEKIND, K. J. Micronutrients: minerals and vitamins. In: HAND, M. S. e LEWIS, L. D. (Ed.). **Small animal clinical nutrition**. 5. ed. Kansas: Mark Morris Institute, 107-148. 2010.

XAVIER, G. et al. Performance of layers fed diets containing organic selenium, zinc and manganese, during a second cycle of production., **Proceedings of the Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry**., Lexington. p.19. 2004.

YAMAGUCHI, M.; WEITZMANN, M. N. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- $\kappa$ B activation. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 355, n. 1-2, p. 179, 2011.

YAN, F.; WALDROUP, P. Evaluation of Mintrex® manganese as a source of manganese for young broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 8, p. 708-713, 2006.

## **SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

### **ARTIGO 1 Determinação da concentração de minerais no organismo de cães em crescimento suplementados com microminerais orgânicos**

Artigo formatado segundo as normas do *Animal Feed Science and Technology* (versão preliminar).

## Resumo

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar a troca da fonte inorgânica (ING) pela orgânica (ORG, Bioplex<sup>®</sup>TR) e a redução da suplementação dos microminerais ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), selênio (Se) e manganês (Mn) na forma orgânica. Vinte e quatro cães filhotes, com 70 dias de idade ( $1,30 \pm 0,36$  Kg), foram avaliados durante 150 dias. A dieta controle (100%ING) foi suplementada com 88 mg de Fe/kg, 100 mg de Zn/kg, 11 mg de Cu/Kg, 0,35 mg de Se/kg e 5,6 mg de Mn/kg. Os demais tratamentos foram usados como substitutos na mesma concentração mineral (100%ORG) ou em proporções menores (70%ORG e 40%ORG), totalizando quatro tratamentos. Os cães foram distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso, totalizando 6 repetições por tratamento. Foram coletadas amostras de pelo, pele, gônadas, fezes e urina. O consumo foi mensurado diariamente para a realização do cálculo de absorção e retenção dos minerais pelos animais. Nenhuma diferença ( $p > 0,05$ ) foi encontrada entre as fontes ING e ORG, nos seus diferentes níveis, para excreção fecal e absorção de Fe, Zn, Se e Mn; concentração de Fe, Zn, Cu, Se e Mn nas gônadas e pelo; excreção urinária de Fe, Zn, Cu e Mn; retenção de Fe, Zn e Mn; concentração de Zn, Se e Mn na pele; Fe, Cu e Se no plasma. Foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre as fontes e nos seus diferentes níveis para excreção de Cu nas fezes; Se na urina; retenção de Cu e Se; consumo e absorção de Cu; concentração de Mn e Zn no plasma; concentração de Fe e Cu na pele. Conclui-se que a suplementação de até 70% da recomendação do NRC (2006) de Cu, Fe, Mn, Se e Zn, sob a forma orgânica, é efetiva em manter a concentração o *status* mineral no organismo, resultando na manutenção do crescimento e metabolismo de cães filhotes dentro do normal.

*Palavras-chave:* biodisponibilidade, minerais traço, caninos, retenção.

## 1. Introdução

A adequada ingestão de microminerais pelos cães é de grande importância para a manutenção de inúmeros processos vitais ao organismo desses animais que estão se tornando cada vez mais longevos. Os minerais traço são ingredientes indispensáveis na alimentação em todas as fases, principalmente no processo de crescimento, período em que o metabolismo, a síntese proteica, a diferenciação celular e a formação óssea estão acelerados.

Os microminerais participam principalmente como agentes catalíticos em todas as reações do metabolismo. A atuação em metaloenzimas os tornam elementos chave no crescimento, metabolismo e processos bioquímicos (SHENKIN, 1993).

O ferro (Fe), além de componente das enzimas citocromos e lisil hidroxilase, tem um importante papel na síntese de hemoglobina atuando como transportador de oxigênio (CASE et al., 2010). O zinco (Zn) é de extrema importância tanto no desenvolvimento como na fase adulta, pois participa de metaloenzimas que agem na remodelação da matriz extracelular colagenosa do osso, na replicação celular, no metabolismo de carboidratos e proteínas e na saúde da pele (FONG et al., 2009; NRC, 2006; YAMAGUCHI e WEITZMANN, 2011).

O cobre (Cu) também é integrante de várias enzimas essenciais para a respiração celular, defesa contra radicais livres, síntese de melanina, formação de tecido conjuntivo e metabolismo do Fe (SCHÜMANN et al., 2002). O selênio (Se) é conhecido pelo seu grande potencial antioxidante em conjunto com a vitamina E, prevenindo a oxidação das membranas celulares, além de intervir na produção e regulação dos níveis dos hormônios da tireóide. O manganês (Mn) também tem um importante papel na formação da matriz dos ossos pois atua na síntese de mucopolissacarídeos; tem função como ativador ou como constituinte de metaloenzimas como arginase, piruvato carboxilase e superóxido dismutase (SILVA e PASCOAL, 2014).

A fonte mineral mais utilizada na alimentação animal é a inorgânica, como sulfato de zinco, selenito de sódio, sulfato de cobre, procedentes de compostos geológicos ou industriais. Alguns fatores devem ser considerados na aquisição dos compostos minerais provenientes de fontes inorgânicas como a fonte, tamanho das partículas, ausência de substâncias tóxicas para os animais e a biodisponibilidade dos elementos (ARAUJO et al., 2008).

Os minerais também podem ser encontrados na forma orgânica sendo definidos como íons metálicos unidos por ligações químicas a uma molécula orgânica, geralmente uma mistura de aminoácidos ou de peptídeos, sendo que desta união, resulta uma estrutura com alta estabilidade e biodisponibilidade (AAFCO, 1997). Essas moléculas orgânicas tem o papel de aumentar a absorção e disponibilidade do mineral no organismo, além de aumentar a sua estabilidade física reduzindo, assim, a tendência do micromineral dissociar-se. A disponibilidade possivelmente aumenta porque a quelação protege o mineral de reações químicas que ocorrem durante a digestão e que resultam em excreção e perda (ACDA e CHAE, 2002).

O conhecimento da biodisponibilidade dos minerais traço nos ingredientes e fontes suplementares é de extrema importância, visando um ótimo crescimento e desenvolvimento animal. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da substituição de Fe, Zn, Cu, Se e Mn inorgânico pela forma orgânica, incluídos em níveis usuais (100%) ou

reduzidos (70% e 40%), sobre o crescimento de cães filhotes, avaliando-se a concentração mineral no organismo dos animais.

## **2. Material e métodos**

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (protocolo 006/18).

### *2.1 Animais*

Vinte e quatro cães filhotes, sem raça definida, aos 70 dias de vida e com peso médio inicial de  $1,30 \pm 0,36$  Kg foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso. Os filhotes foram vacinados aos 60, 90 e 120 dias de idade (Elevencell Vac, Labovet Produtos Veterinários, Brasil) e alojados individualmente em baias com piso de cimento e dimensões de 2,5 x 0,9 m. O período experimental teve duração de 150 dias.

### *2.2 Dietas experimentais*

Os filhotes foram distribuídos em quatro tratamentos experimentais, sendo que no tratamento I foi utilizada a fonte inorgânica de microminerais na suplementação de 100% da recomendação do NRC (2006) para cães filhotes. Já nos tratamentos II, III e IV foi utilizada a fonte orgânica nas suplementações de 100%, 70% e 40% da recomendação de microminerais do NRC (2006), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para cães filhotes.

Ingredientes (g/kg na matéria natural)	100% ING	100% ORG	70% ORG	40% ORG
Quirera de milho	387,55	387,55	387,55	387,55
Farelo de trigo	200,00	200,00	200,00	200,00
Farinha de vísceras	131,80	131,80	131,80	131,80
Farinha de carne e ossos	100,00	100,00	100,00	100,00
Farelo de soja	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de vísceras de aves	30,00	30,00	30,00	30,00
Óleo de soja	15,00	15,00	15,00	15,00
Adsorvente - MYCOSORB®	1,00	1,00	1,00	1,00
Antioxidante - BHT	0,15	0,15	0,15	0,15
Antifúngico - Ácido propiônico	0,50	0,50	0,50	0,50
Palatabilizante natural	20,00	20,00	20,00	20,00
Mananligossacarídeo	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	3,00	3,00	3,00	3,00
Ácido docosahexaenóico	4,00	4,00	4,00	4,00
Cloreto de colina	2,00	2,00	2,00	2,00
Premix vitamínico <sup>a</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00
Fonte mineral inorgânica <sup>b</sup>	2,00	-	-	-
Fonte mineral orgânica <sup>c</sup>	-	2,00	1,40	0,80
Inerte (caulin)	-	-	0,60	1,20

<sup>a</sup>Premix vitamínico forneceu os seguintes níveis de vitaminas por quilograma de alimento: vitamina A (15000UI), vitamina D3 (1500UI), vitamina E (350UI), vitamina K (0,15 mg), tiamina (1,60 mg), riboflavina (2,8 mg), ácido pantotênico (12,5 mg), niacina (14,5 mg), piridoxina (1,4 mg), ácido fólico (0,2 mg), biotina (2,5 mg) vitamina B12 (0,03 mg), colina (2000mg).

<sup>b</sup>Fonte mineral inorgânica continha no mínimo, por quilograma do premix: 45000 mg de ferro (sulfato de ferro), 5500 mg de cobre (sulfato de cobre), 3000 mg de manganês (sulfato de manganês), 52500 mg de zinco (sulfato de zinco), 868 mg de iodo (iodato de cálcio), 180 mg de selênio (selenito de sódio).

<sup>c</sup>Fonte mineral orgânica continha no mínimo, por quilograma do premix: 45000 mg de ferro (proteinato de ferro), 5500 mg de cobre (proteinato de cobre), 3000 mg de manganês (proteinato de manganês), 52500 mg de zinco (proteinato de zinco), 868 mg de iodo (iodato de potássio), 180 mg de selênio (levedura enriquecida com selênio).

As dietas diferiram apenas na quantidade e fonte de microminerais, sendo isoenergéticas e isoproteicas (Tabela 2 e 3). O NRC (2006) recomenda as seguintes quantidades de microminerais para cães filhotes: 11mg de Cu/kg; 88mg de Fe/kg; 5,6mg de Mn/kg; 0,35mg de Se/kg e 100mg de Zn/kg, na matéria seca, considerando um alimento com aproximadamente 4000kcal de energia metabolizável/kg.

Os animais receberam água *ad libitum* e os alimentos foram fornecidos diariamente na quantidade calculada segundo a equação (1). As médias de consumo diário dos animais foram: Tratamento I - 331,19g; Tratamento II: 332,30g; Tratamento III - 373,42g; Tratamento IV - 354,73.

$$EM=130*PC^{0,75}*3,2*[e^{(-0,87p)}-0,1] \quad (1)$$

Onde:

EM= energia metabolizável em kcal/dia

PC= peso corporal em kg

p = PCa/PCm

PCa = peso corporal no momento da avaliação (kg)

PCm = peso corporal esperado quando adulto (kg)

e = base do logaritmo natural, log = 2,718

A fonte mineral orgânica (Bioplex®TR) foi fornecida por fontes proteinadas disponíveis comercialmente, obtidas a partir de proteína de soja hidrolisada enzimaticamente; exceto o Se orgânico que foi a partir de uma proteína de levedura, principalmente como selenometionina. Já a fonte inorgânica foi suplementada como sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco e selenito de sódio.

Tabela 2 - Recomendação do NRC (2006) e redução dos níveis suplementares da fonte orgânica (ORG) e fonte inorgânica (ING) dos microminerais suplementados nas dietas experimentais para cães em crescimento.

Tratamentos	mg/kg de alimento na matéria seca				
	Fe	Zn	Cu	Se	Mn
100% ING	88,00	100,00	11,00	0,35	5,60
100% ORG	88,00	100,00	11,00	0,35	5,60
70% ORG	61,60	70,00	7,70	0,25	3,92
40% ORG	35,20	40,00	4,40	0,14	2,24

Tabela 3 - Composição analisada das fontes orgânicas (ORG) e fonte inorgânica (ING) dos microminerais suplementados nas dietas experimentais para cães em crescimento.

Tratamentos	mg/kg de alimento na matéria seca				
	Fe	Zn	Cu	Se	Mn
100% ING	451,361	155,304	32,224	0,388	40,329
100% ORG	401,840	141,588	31,942	0,364	39,679
70% ORG	346,333	129,466	20,042	0,294	29,510
40% ORG	340,089	109,420	18,773	0,280	24,827
Mistura alimentícia sem as fontes de minerais	306,916	53,781	15,640	0,086	22,146

### 2.3 Status mineral

A mensuração do consumo de alimento e a coleta total de fezes e urina foram feitos nos últimos cinco dias experimentais. Pela manhã, as fezes foram coletadas, pesadas e, em seguida, armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ao final do período de coleta, as amostras de cada animal foram homogeneizadas, secas em estufa a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas e moídas em moinho (Thomas® Wiley Mills modelo 4, Thomas Scientific Inc., Estados Unidos) com peneira de 1,0mm. Para a coleta de urina, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas. Acopladas às gaiolas foram colocadas caixas de isopor com gelo com um funil ligada à bandeja da gaiola, na qual continha no seu interior uma garrafa PET. A urina foi coletada duas vezes ao dia sendo em seguida armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Os animais foram submetidos à coleta de sangue no 150º dia experimental. As coletas foram feitas com os animais em jejum de dozes horas, duas e seis horas após a alimentação. O sangue coletado da veia jugular por venopunção foi colocado em tubos Vacutainer com heparina sódica e livres de microminerais (NH Trace Elements Sodium Heparin, Greiner Bio-one Inc., Austria), centrifugado a 3000xg durante 15 minutos a  $6^{\circ}\text{C}$  para a retirada do plasma (modelo 2K-15 Sigma Laborzentrifugen, Sigma, Alemanha). O plasma foi armazenado em micro tubos tipo eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$  até análise dos microminerais.

No 140º dia, amostras de pelo da região toracolombar direita de cada animal foram coletadas e armazenadas até análise de microminerais. No 150º dia, os animais passaram por um procedimento cirúrgico para remoção de amostras de pele e gônada, onde foram pré-anestesiados com Meperidina (Petidina®) de 50 mg/mL na dose de 4 mg/kg associado a Acepromazina 0,2% (Acepran®) na dose de 0,02 mg/kg por via intramuscular e posteriormente anestesiados com Propofol (Propovan®) de 10 mg/mL na dose de 5 mg/kg por via endovenosa.

Os tecidos testicular ou ovariano foram removidos conforme protocolo descrito por Fossum (2014). Nesse mesmo procedimento, removeu-se, no local da incisão, um fragmento de um centímetro de largura de cada animal. As amostras de gônadas e pele foram armazenadas a -20°C até análise.

As dietas, amostras fecais, de urina, pele, gônadas e pelo passaram por um processo de digestão em forno de micro-ondas (MARSXpress, Cem Inc., Estados Unidos) sob ação de ácido nítrico (Sigma-Aldrich Inc., Estados Unidos), conforme metodologia USEPA 3051A (USEPA, 1998). Os elementos Cu, Fe Mn e Zn foram determinados em espectrofotometria de absorção atômica em chama (modelo 800 Perkin-Elmer Instruments Inc., Estados Unidos); para o Se foi utilizado o forno de grafite. Os microminerais nas amostras de plasma foram determinados diretamente após diluição com água deionizada.

#### 2.4 Análises estatísticas

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado, sendo que os 24 cães foram distribuídos em quatro tratamentos, totalizando seis animais por tratamento sendo cada animal uma unidade experimental. Foi realizado o teste Shapiro-Wilk para analisar a normalidade dos dados e quando necessário eles foram transformados antes de serem analisados estatisticamente. Foi feita a análise de variância das variáveis de *status* mineral utilizando-se a função *lm* do pacote *stats* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019). O teste de médias Tukey foi utilizado com a função *HSD.test* pacote *agricolae* do programa estatístico R.

Os dados da concentração plasmática dos microminerais foram submetidos à análise de variância em esquema de parcela subdivida no tempo utilizando a função *psub2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019). O teste de médias Tukey foi utilizado para comparação das dietas ao longo do tempo. Significância foi declarada a  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Ferro

Para o elemento Fe, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes tratamentos nos parâmetros de consumo, excreção nas fezes e na urina, absorção, retenção, concentração do mineral nas gônadas, plasma e pelo (Tabelas 4 e 5). Maior concentração de Fe na pele foi encontrada nos animais suplementados com 70% de microminerais orgânicos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração de ferro em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de ferro orgânico (*Bioplex®TR*).\*

Item	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor	EPM <sup>1</sup>
		100%	70%	40%		
Consumo (mg/kg/dia)	149,49	133,53	129,33	120,64	0,19	11,08
Fezes (mg/kg/dia)	91,55	71,61	94,19	66,01	0,27	12,52
Absorção (mg/kg/dia)	57,94	61,92	35,14	54,63	0,55	14,25
Urina (mg/kg/dia)	0,17	LQ <sup>2</sup>	0,33	0,37	0,65	0,11
Retenção (mg/kg/dia)	57,77	61,92	34,81	54,26	0,54	14,22
Pele (mg/kg)	302,66b	110,75b	534,42a	327,66b	<0,01	37,63
Gônada (mg/kg)	423,77	162,13	292,03	348,62	0,18	40,49
Pelo (mg/kg)	437,32	429,02	302,32	447,31	0,63	45,44

\*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>1</sup>EPM= erro padrão da média.

<sup>2</sup>LQ - Menor que o limite de quantificação do método.

Tabela 5 - Concentração de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) no plasma de cães filhotes em jejum (0 horas), duas e seis horas após a alimentação com diferentes concentrações desses elementos de fonte inorgânica (ING) e orgânica (ORG) (*Bioplex®TR*).\*

Item	Tempo (horas)	100%	Níveis suplementares			p-valor <sup>1</sup>			EPM <sup>2</sup>
			100%	70%	40%	D x T	D	T	
Ferro (mg/L)	0	0,82	0,56	0,63	1,63	0,49	0,05	0,12	0,33
	2	0,62	0,51	0,49	0,83				
	6	1,20	0,83	0,80	1,23				
Zinco (mg/L)	0	0,55	0,57	1,78	1,58	0,64	0,11	0,01	0,42
	2	0,67	0,71	0,63	0,86				
	6	1,14	0,98	0,85	1,38				
Cobre (mg/L)	0	1,63	1,31	1,45	1,28	0,84	0,51	0,32	0,11
	2	1,73	1,42	1,56	1,39				
	6	1,66	1,46	1,50	1,45				
Selênio (µg/L)	0	236,45	290,84	200,56	181,78	0,51	0,08	0,12	30,21
	2	230,55	232,67	208,93	201,98				
	6	288,19	252,90	234,75	224,42				
Manganês (mg/L)	0	0,14b	0,15b	0,22b	0,79a	0,17	<0,01	0,20	0,17
	2	0,24	0,26	0,22	0,34				
	6	0,32b	0,43b	0,35b	0,63a				

\*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>1</sup>DxT - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo

<sup>2</sup>EPM= erro padrão da média.

### 3.2 Zinco

Não houve diferença significativa no teor de Zn ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos para o consumo, excreção nas fezes e urina, absorção, retenção e concentração na pele, gônada e pelo (Tabela 6). Maior concentração desse mineral foi encontrada no plasma dos animais em jejum (tempo 0) dos tratamentos III e IV ( $p<0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 6 - Concentração de zinco em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de zinco orgânico (*Bioplex®TR*).\*

Item	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor	EPM <sup>1</sup>
		100%	70%	40%		
Consumo (mg/kg/dia)	51,44	47,05	48,34	38,81	0,15	3,81
Fezes (mg/kg/dia)	41,17	40,62	38,80	30,06	0,16	3,60
Absorção (mg/kg/dia)	10,27	6,43	9,54	8,76	0,56	1,97
Urina (mg/kg/dia)	1,12	0,47	LQ <sup>2</sup>	0,41	0,26	0,20
Retenção (mg/kg/dia)	9,15	5,96	9,54	8,35	0,69	1,91
Pele (mg/kg)	183,86	119,07	207,19	184,48	0,21	14,36
Gônada (mg/kg)	162,57	146,76	152,17	201,42	0,50	13,14
Pelo (mg/kg)	169,49	165,20	190,25	186,05	0,33	5,55

\*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

<sup>1</sup>EPM= erro padrão da média.

<sup>2</sup>LQ - Menor que o limite de quantificação do método.

### 3.3 Cobre

Para os parâmetros excreção de Cu na urina, concentração do mineral na gônada, pelo e plasma não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) (Tabelas 5 e 7). O consumo, excreção nas fezes, absorção e retenção de Cu nos animais suplementados com 100% de microminerais orgânicos e 100% orgânicos foram maiores que os demais tratamentos ( $p<0,05$ ). Já a concentração desse mineral na pele foi maior nos animais suplementados com 40% orgânico ( $p<0,05$ ) (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentração de cobre em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de cobre orgânico (*Bioplex®TR*).\*

Item	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor	EPM <sup>1</sup>
		100%	70%	40%		
Consumo (mg/kg/dia)	10,68a	10,61a	7,48b	6,66b	<0,01	0,39
Fezes (mg/kg/dia)	8,32a	8,55a	6,76b	5,78b	0,02	0,28
Absorção (mg/kg/dia)	2,36a	2,06a	0,72b	0,88b	0,03	0,25
Urina (mg/kg/dia)	0,06	LQ <sup>2</sup>	0,02	0,06	0,42	0,01
Retenção (mg/kg/dia)	2,30a	2,06a	0,70b	0,82b	0,03	0,25
Pele (mg/kg)	1,27b	1,52b	1,89b	4,77a	0,01	0,51
Gônada (mg/kg)	3,45	2,13	2,59	3,63	0,61	0,44
Pelo (mg/kg)	8,39	8,51	9,42	9,45	0,84	0,55

\*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>1</sup>EPM= erro padrão da média.

<sup>2</sup>LQ - Menor que o limite de quantificação do método.

### 3.4 Selênio

Não houve diferença significativa (p>0,05) para os parâmetros consumo, excreção nas fezes, absorção, concentração de Se na pele, gônada, pelo e plasma (Tabelas 5 e 8). A excreção desse mineral na urina e a retenção foram maiores nos animais suplementados com 70% e 40% de microminerais orgânicos (p<0,05) (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração de selênio em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de selênio orgânico (*Bioplex®TR*).\*

Item	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor	EPM <sup>a</sup>
		100%	70%	40%		
Consumo (mg/kg/dia)	0,129	0,134	0,110	0,102	0,36	0,01
Fezes (mg/kg/dia)	0,081	0,109	0,075	0,053	0,10	0,01
Absorção (mg/kg/dia)	0,048	0,025	0,035	0,049	0,34	0,01
Urina (mg/kg/dia)	0,034a	0,017b	LQ <sup>b</sup>	0,012b	<0,01	0,01
Retenção (mg/kg/dia)	0,014b	0,008b	0,035a	0,037a	0,04	0,01
Pele (mg/kg)	0,950	0,762	1,115	0,983	0,14	0,05
Gônada (mg/kg)	0,710	0,638	0,712	0,846	0,50	0,04
Pelo (mg/kg)	1,467	1,660	1,565	1,164	0,08	0,06

\*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>1</sup>EPM= erro padrão da média.

<sup>2</sup>LQ - Menor que o limite de quantificação do método.

### 3.5 Manganês

Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos para os parâmetros consumo, excreção nas fezes e urina, absorção, retenção e concentração de Mn na pele, gônada e pelo (Tabela 9). Os animais que receberam suplementação de 40% dos microminerais na forma orgânica apresentaram maiores concentrações plasmáticas de Mn nos tempos 0 e 6 horas (Tabela 5).

Tabela 9 - Concentração de manganês em amostras de cães filhotes recebendo diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de manganês orgânico (*Bioplex®TR*).\*

Item	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor	EPM <sup>1</sup>
		100%	70%	40%		
Consumo (mg/kg/dia)	13,92	13,19	11,04	8,81	0,08	1,04
Fezes (mg/kg/dia)	9,58	8,11	6,31	4,53	0,10	1,11
Absorção (mg/kg/dia)	4,34	5,08	4,73	4,28	0,97	1,18
Urina (mg/kg/dia)	0,14	0,12	LQ <sup>2</sup>	0,22	0,15	0,07
Retenção (mg/kg/dia)	4,20	4,96	4,73	4,06	0,96	1,21
Pele (mg/kg)	29,13	11,77	40,76	31,66	0,07	7,21
Gônada (mg/kg)	11,50	9,09	9,34	12,93	0,47	1,92
Pelo (mg/kg)	6,64	7,07	5,50	6,52	0,74	1,04

\*Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

<sup>1</sup>EPM= erro padrão da média.

<sup>2</sup>LQ - Menor que o limite de quantificação do método.

## 4. Discussão

### 4.1 Ferro

Não há relatos de estudos na literatura que avaliaram a substituição total de microminerais inorgânicos pela forma orgânica durante a fase de desenvolvimento de cães.

A disponibilidade do Fe deve ser controlada não apenas em nível celular mas também sistemicamente, uma vez que esse mineral é altamente reativo (ANDREWS, 2005) e, de forma não associada, pode reagir com o peróxido de hidrogênio durante a reação de Fenton, formando os radicais livres (DUNN et al., 2007). No presente estudo, a homeostase do Fe foi precisamente mantida através da atuação de uma gama de mecanismos fisiológicos que agem para regular os níveis desse mineral, evitando sua reação com outras moléculas. Dentre esses mecanismos, sabe-se que mudanças na absorção e excreção de minerais no trato gastrointestinal são os primários para a manutenção da homeostase, ou seja, o maior consumo levaria a uma maior

excreção de mineral, visando regular a quantidade desses elementos no organismo (BAO et al., 2007). O Fe não possui via fisiológica para sua excreção nos mamíferos, portanto, a absorção também é responsável por sua regulação homeostática corporal (PAPANIKOLAOU e PANTOPOULOS, 2005).

Outro mecanismo que parece exercer um maior controle da homeostase que o regulador dietético é a eritropoiese, uma vez que a maior parte do Fe corporal é usada pela medula óssea para hemoglobinação das células vermelhas do sangue (ANDREWS, 1999). No presente estudo, a concentração de Fe no plasma dos animais que receberam 40% de microminerais de fonte orgânica tendeu a ser maior ( $p < 0,10$ ) mas manteve-se dentro dos níveis normais para a espécie (0,33-1,47 mg/L) (HARVEY, 2008). Isso pode ser indicativo de uma maior mobilização do mineral do organismo animal. Podemos inferir que essa maior mobilização seja devida a uma eritropoiese aumentada uma vez que esta é a principal forma de regulação da homeostase do Fe e que a principal fonte desse elemento é a reciclagem dentro do organismo. Tanto a absorção intestinal quanto a reciclagem do macrófago, determinam os níveis de Fe no plasma. Os macrófagos fagocitam os eritrócitos velhos e danificados sendo que a porção heme é catabolizada a biliverdina e, subsequentemente, a bilirrubina que é excretada do organismo, enquanto o Fe retorna à circulação (ANDREWS e SCHMIDT, 2007).

Outros autores, avaliando os mesmos parâmetros em outras espécies encontraram resultados diferentes deste trabalho. Reis (2016) avaliando a suplementação de microminerais orgânicos em gatos filhotes, obteve uma redução linear do consumo de Fe com a diminuição da suplementação do Fe orgânico. Ma et al. (2012) trabalhando com Fe-glicina para frangos de corte concluíram que essa fonte mineral promoveu menor excreção de Fe em relação ao sulfato de Fe. Feng et al. (2009) e Creech et al. (2004) também encontraram em suínos menor excreção fecal desse mineral com a diminuição da concentração dietética, independente da fonte. Já Rincker et al. (2005) relatou um aumento linear na excreção de Fe nas fezes de suínos na fase de creche com o aumento desse elemento na forma inorgânica.

Yu et al. (2000) e Feng et al. (2007) verificaram que o Fe plasmático aumentou com o aumento da suplementação com Fe orgânico, resultados opostos aos encontrados no presente estudo. Já Schiavon et al. (2000) descreveram que a concentração plasmática de Fe em leitões tendeu a ser maior sob baixo nível de suplementação de Fe do que em altos níveis suplementares para ambas as fontes minerais (proteinato e sulfato) corroborando com os dados encontrados neste trabalho.

Os altos níveis de Fe presente nos ingredientes utilizados na formulação de dietas para cães, como farinha de carne e ossos e farinha de vísceras, e o fato de a principal fonte desse mineral ser proveniente da reciclagem do macrófago, torna a suplementação massiva de Fe na dieta questionável. Tanto a concentração de Fe nos ingredientes quanto a reciclagem do macrófago já forneceriam a quantidade recomendada pelo NRC (2006) de 88 mg/kg de matéria seca necessários para a formação da hemoglobina, valores acima reduziram a utilização do mineral.

A redução concomitante da oferta dos cinco elementos modificou as proporções entre todos os minerais nas dietas devido aos diferentes conteúdos naturais dos alimentos. Assim, a relação inversa encontrada entre o suprimento de Fe e o Fe plasmático poderia, pelo menos parcialmente, derivar da maior proporção de Fe em relação aos outros metais concorrentes na dieta de baixa suplementação (40%).

Os dados de concentração de minerais teciduais são normalmente utilizados para avaliar o *status* mineral dos animais. No presente estudo houve uma maior concentração de Fe na pele dos animais suplementados com 70% da recomendação do NRC (2006) desse mineral na forma orgânica, o que demonstra que o Fe orgânico foi melhor absorvido e utilizado do que a fonte inorgânica. Níveis adequados de Fe também são importantes para o funcionamento, a saúde e a aparência da pele. Em um tecido metabolicamente ativo como a pele, que forma um tampão entre o animal e o ambiente, a necessidade de íons metálicos diferentes depende de sua função específica, por exemplo, na proliferação celular, na maturação de queratinócitos e no desenvolvimento ou estado fisiológico do tecido e a saúde do animal (HOSTÝNEK et al., 1993).

#### 4.2 Zinco

Não houve diferença significativa nos parâmetros consumo, excreção nas fezes e urina, absorção e retenção de Zn, o que mostra a atuação dos mecanismos de absorção e excreção para manter o controle da homeostase do mineral no organismo (HAMBIDGE, 2003). Segundo Henriques et al. (2003), após o transporte do Zn para o interior dos enterócitos, o elemento se liga à CRIP, uma proteína de transporte intracelular. Essa ligação é regulada pelas metalotioneínas, que são pequenos peptídeos expressos quando ocorre o carregamento com metais, como Cu e Zn, sendo locais para armazenagem e neutralização desses íons metálicos (LINDER e HAZEGH-AZAM, 1996). Elas se unem primeiro ao Zn e liberam-no gradativamente no citosol, de acordo com a necessidade do organismo, para se ligar à CRIP.

Por isso, a absorção de Zn pode ser regulada por fatores da dieta e fatores fisiológicos que afetam a expressão gênica da metalotioneína e da CRIP. O Zn presente em altas concentrações nas células pode interferir com outros processos metalo-dependentes ou inibir proteínas. Assim, a tioneína se acopla ao Zn e age como marcador bioquímico que controla a concentração deste mineral. Um aumento na concentração de Zn disponível induz a síntese de tioneína, por meio da ação do elemento sobre os fatores de transcrição Zn-dependentes, formando a metalotioneína. Na presença de baixas concentrações do mineral na célula, o Zn é liberado da metalotioneína (MARET, 2000). Portanto, no presente estudo podemos inferir que o nível de consumo de Zn pode ter determinado a síntese da metalotioneína, controlando a absorção do mineral e provavelmente a resposta do animal aos níveis suplementares.

Um fato importante relacionado ao metabolismo do Zn é a sua interação com o cálcio (Ca) que leva a uma redução da sua disponibilidade com consequente excreção nas fezes. A utilização da forma orgânica de Zn impede que essa interação ocorra eliminando os efeitos negativos do Ca na absorção desse mineral (Brinkhaus et al., 1998). Sendo assim, a forma orgânica é a mais recomendável por proporcionar uma maior biodisponibilidade dos minerais.

Diferentes resultados têm sido encontrados em estudos avaliando fontes orgânicas e inorgânicas do Zn. Reis (2016) avaliando a suplementação de microminerais orgânicos em gatos filhotes relatou uma menor excreção do mineral no menor nível de suplementação (redução de 40% dos níveis de Zn recomendado pelo NRC (2006)) em relação à suplementação com 100% do recomendado pelo NRC na forma orgânica, mas justificou que esse resultado pode ter sido decorrente do consumo de Zn ter sido também significativamente menor. Além disso, não foram encontradas diferenças nos parâmetros absorção, concentração na urina, retido e presente na pele, gônada e pelo, corroborando com o presente estudo.

Resultados distintos aos apresentados neste trabalho foram descritos por Jamikorn; Preedapattarapong (2008), que encontraram maior nível de deposição no pelo, maior absorção e concentração plasmática de Zn e, Lowe et al. (1994), que relataram maior deposição de Zn no pelo e maior excreção do mineral, ambos estudos comparando a fonte orgânica com a inorgânica de Zn em dietas para cães.

Maior concentração plasmática de Zn foi encontrada nos animais em jejum (tempo 0) recebendo os tratamentos III e IV, o que mostra a alta biodisponibilidade da fonte orgânica. Brinkhaus et al. (1998) também encontraram resultados significativos para a concentração plasmática de Zn em cães alimentados com uma fonte orgânica (propionato de zinco) e uma fonte inorgânica (óxido de zinco), avaliados por um período de 6 horas. No entanto, nos tempos

0 e 2 horas após a administração, não houveram diferenças entre as fontes. Ao longo das 6 horas de observação, os animais que receberam o propionato de Zn tiveram níveis de Zn no plasma significativamente mais elevados. Uma hora após a administração da fonte orgânica ocorreu um pico acentuado nos níveis plasmáticos do mineral, seguido por uma redução lenta. Os autores concluíram que o Zn sob a forma orgânica é significativamente mais biodisponível que o Zn na forma inorgânica.

#### 4.3 Cobre

O Cu é absorvido principalmente no estômago por difusão passiva e transportado por proteínas carreadoras, as metalotioneínas (MCDOWELL, 1992), que regulam a absorção do Cu, assim como ocorre com o Zn. A suplementação com Cu aumenta a expressão gênica da metalotioneína mas não altera a expressão do transportador a nível de membrana basal, o ATP7 (BAUERLY et al., 2004). Assim, o Cu se liga à metalotioneína na mucosa mas não é transportado ao plasma e sim eliminado na descamação das células intestinais (BREMNER e BEATTIE, 1990). Dessa maneira, esse mecanismo limita a quantidade de Cu que passa pela membrana basolateral, sendo a excreção de Cu baixa quando o Cu dietético é baixo e aumenta com a concentração no alimento (LÖNNERDAL, 2008), justificando a maior excreção de Cu nas fezes no maior nível de suplementação (100%), refletindo na retenção do mineral.

Yenice et al. (2015) encontraram que a suplementação da forma orgânica de Cu para poedeiras reduziu a excreção do mineral nas fezes em comparação com a fonte inorgânica e que o baixo nível do elemento teve menor excreção de Cu em comparação com o alto. Em estudos com frango de corte consumindo Cu orgânico (Bioplex® Cu), Bao et al. (2007) relataram que a excreção de Cu aumentou linearmente com o aumento da suplementação. Concentrações fecais de Cu foram reduzidas em aproximadamente 50% em suínos alimentados com dieta reduzida em Cu (CREECH et al., 2004), resultados que corroboram com o presente estudo e mostram a perfeita homeostase do Cu, regulada pela metalotioneína.

A tirosinase é uma enzima contendo Cu, amplamente distribuída em micro-organismos, animais e plantas, e é uma enzima essencial na biossíntese de melanina, envolvida na determinação da cor da pele e do cabelo dos mamíferos (PARVEZ et al., 2007). Outra enzima dependente desse elemento é a lisina oxidase e a redução da sua atividade resulta em descamação da pele. Além disso, o Cu é conhecido por ter muitas aplicações biológicas e cosméticas benéficas, baseadas na estimulação de uma variedade de processos relacionados à pele, como a produção de colágeno, elastina e glicosaminoglicano (MAQUART et al., 1990 e

1993; WEGROWSKI et al., 1992). O Cu também tem papel importante na cicatrização de feridas, no processo de maturação e estabilização da síntese e degradação de colágeno, conferindo força tênsil à cicatriz e participa também da formação de leucócitos e síntese de hemácias (FIGUEIREDO et al. 2007; MONTENEGRO et al. 2012). Como descrito, esse mineral é de extrema importância para a saúde da pele. A maior concentração de Cu na pele dos animais suplementados com 40% das recomendações do NRC (2006) mostra uma maior eficiência de armazenamento desse elemento na forma orgânica por esse tecido, favorecendo todos os processos físico-químicos e biológicos que ocorrem na pele no qual esse mineral participa.

#### 4.4 Selênio

A urina é a principal via de eliminação de Se e está relacionada à ingestão de mineral (LEESON e SUMMERS, 2001) e, no presente estudo, esteve relacionada também à forma química dietética. Reis (2016) e Todd et al. (2012) igualmente encontraram um aumento na concentração de Se na urina de gatos com o aumento da ingestão do mineral. A diferença na retenção entre Se orgânico e inorgânico pode ser explicada pelas diferenças nas vias metabólicas. Ambos podem ser incorporados na glutathione peroxidase, mas a forma orgânica da selenometionina também pode ser incorporada a outras proteínas em substituição à metionina (CAO et al., 2014). Esse Se armazenado pode ser liberado durante *turnover* proteico. A menor excreção urinária de Se nas suplementações na forma orgânica refletem a incorporação de Se nas proteínas corporais. O Se inorgânico não utilizado para a síntese de selenoproteína é excretado na urina.

Enquanto a excreção urinária pode ser uma medida altamente responsiva para determinar o *status* de Se, excreção fecal não é afetada e permanece constante em uma vasta ingestão do mineral (WEDEKIND et al., 2010; TODD et al., 2012), fato esse que pôde ser observado no presente estudo.

Como a retenção está relacionada à excreção urinária, podemos observar que a menor concentração de Se na urina encontrada nesse trabalho interferiu em uma maior retenção do mineral nos animais suplementados com os menores níveis da forma orgânica. Yoon et al. (2007) relataram maior retenção de Se em frangos de corte suplementados com Se orgânico comparado à fonte inorgânica. Outros autores também afirmam que a retenção de Se sob forma inorgânica é menor em relação ao Se orgânico (COMBS JR e COMBS, 1986; DANIELS, 1996; WINDISCH et al., 1997).

Com relação à concentração plasmática de Se, alguns trabalhos em outras espécies relataram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, que teve um comportamento dose-dependente. Cao et al. (2014), comparando as fontes inorgânica e orgânica (0,3 mg Se/kg de selenito de sódio *versus* 0,1, 0,3, 0,5 e 0,7 mg Se/kg de DL-Selenometionina) afirmaram que o nível plasmático de Se refletiu a concentração do mineral na dieta, aumentando nas maiores suplementações, em suínos desmamados. Fato relatado também por Todd et al. (2012) fornecendo 1,0, 1,5 e 2,0 µg de Se/g de matéria seca de cada fonte de Se (selenito de sódio e selênio orgânico) para gatos. Para frangos de corte, Wang et al. (2011), avaliando 0,15mg Se/Kg e, Yoon et al. (2007), que fornecendo 0,15 mg Se/Kg, nas formas de selenito de sódio e selenometionina, também encontraram um aumento da concentração plasmática de Se proporcional ao aumento da suplementação. Zhan et al. (2010) verificaram em suínos que a ingestão materna de 0,3 mg Se/Kg na forma de selenometionina aumentou o conteúdo de Se plasmático de sua prole em 25,34%.

#### 4.5 Manganês

Estudos avaliando a absorção e armazenamento de Mn nos tecidos analisados no presente trabalho e no plasma são escassos na literatura devido ao fato de sua avaliação ser mais complicada, pois se encontra em baixas concentrações em materiais biológicos e fontes externas podem contaminar as amostras com o elemento durante os procedimentos para análise (VERSIECK e MCCALL, 1985). A maioria dos estudos que avaliam a concentração de Mn em tecidos, utilizam a tíbia como sendo um indicador adequado para analisar a oferta de Mn em frangos de corte e poedeiras e mostram que a fonte orgânica apresenta maior biodisponibilidade que a fonte inorgânica (BAO et al., 2007; BERTA et al., 2004; YILDIZ et al., 2011).

Sabe-se que o tecido ósseo é composto pelos osteoclastos, que promovem a reabsorção óssea dissolvendo a matriz óssea, e pelos os osteoblastos, responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea e, que o Mn é essencial para a formação de mucopolissacarídeos na cartilagem dos ossos (BRUZZANITI e BARON, 2006).

Liu et al. (2015) avaliando três suplementações de Mn, sendo um controle (60 mg Mn/kg) e dois com deficiência (40,0 e 8,7 mg Mn/Kg), para frangos de corte, encontraram uma redução da expressão dos RNAm de dois genes importantes envolvidos na diferenciação e atividade dos osteoclastos. O gene RANKL, expresso nos osteoblastos, é essencial para a diferenciação dos osteoclastos e inibição da sua apoptose (KONG et al., 1999) e o fator osteoprotegerina (OPG) tem como principal ação biológica a inibição da diferenciação dos

osteoclastos e de sua atividade (YASUDA et al., 1998). A interação desses dois genes permite saber sobre o estado normal da regulação óssea e possíveis alterações patológicas (WANG et al., 2008). Os osteoblastos estão envolvidos na regulação da osteoclastogênese por meio da modificação da razão RANKL/OPG. A redução na expressão dos RNAm de ambos os genes pode ser explicada por uma possível redução na quantidade de osteoblastos, devido a deficiência de Mn. Os autores encontraram também um aumento na relação RANKL/OPG com a deficiência de Mn, promovendo uma maior diferenciação dos osteoclastos e aumento na sua atividade, aumentando assim, a reabsorção óssea. Esses resultados podem explicar a maior concentração plasmática de Mn encontrada nos animais que foram suplementados com 40% de microminerais orgânicos. Essa maior concentração pode ser um indicativo de deficiência do mineral que ocasionou uma maior reabsorção óssea pelos osteoclastos, liberando o mineral na corrente sanguínea.

Reis (2016) estudando a redução da suplementação de microminerais orgânicos para gatos filhotes e Aksu et al. (2010), avaliando diferentes níveis dessas mesmas fontes em frangos de corte, não encontraram diferença na concentração plasmática de Mn entre os grupos experimentais, resultados diferentes aos encontrados no presente estudo.

## **5. Conclusão**

A suplementação de até 70% da recomendação do NRC (2006) de Cu, Fe, Mn, Se e Zn, sob a forma orgânica, é efetiva em manter o *status* mineral, resultando na manutenção do crescimento e metabolismo de cães filhotes dentro do normal.

## Referências bibliográficas

AAFCO. **Official Publication**. Atlanta: 1997.

ACDA, S.; CHAE, B. A review on the applications of organic trace minerals in pig nutrition. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 25-30, 2002.

AKSU, D. S.; AKSU, T.; OZSOY, B. The effects of lower supplementation levels of organically complexed minerals (zinc, copper and manganese) versus inorganic forms on hematological and biochemical parameters in broilers. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v. 16, n. 4, p. 553-559, 2010.

ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 26, p. 1986-1995, 1999.

ANDREWS, N. C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159-169, 2005.

ANDREWS, N. C.; SCHMIDT, P. J. Iron homeostasis. **Annual review of physiology**, v. 69, p. 69-85, 2007.

ARAUJO, J. A. et al. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta veterinária brasileira**, v. 2, n. 3, p. 53-60, 2008.

BAO, Y. et al. Effect of organically complexed copper, iron, manganese, and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 3, p. 448-455, 2007.

BAUERLY, K. A.; KELLEHER, S. L.; LÖNNERDAL, B. Functional and molecular responses of suckling rat pups and human intestinal Caco-2 cells to copper treatment. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 155-162, 2004.

BERTA, E. et al. Effect of inorganic and organic manganese supplementation on the performance and tissue manganese content of broiler chicks. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, n. 2, p. 199-209, 2004.

BREMNER, I.; BEATTIE, J. Metallothionein and the trace minerals. **Annual review of nutrition**, v. 10, n. 1, p. 63-83, 1990.

BRINKHAUS, F. et al. Bioavailability of zinc propionate in dogs. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2596S-2597S, 1998.

BRUZZANITI, A.; BARON, R. Molecular regulation of osteoclast activity. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 7, n. 1-2, p. 123-139, 2006.

CAO, J. et al. Effects of dietary Selenomethionine supplementation on growth performance, antioxidant status, plasma selenium concentration, and immune function in weaning pigs. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 46, 2014.

CASE, L. P. et al. **Canine and Feline Nutrition-E-Book: A Resource for Companion Animal Professionals**. Elsevier Health Sciences. 2010.

COMBS JR, G. F.; COMBS, S. B. **The role of selenium in nutrition**. Academic Press, Inc. 1986.

CREECH, B. et al. Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 7, p. 2140-2147, 2004.

DANIELS, L. A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biological trace element research**, v. 54, n. 3, p. 185-199, 1996.

DUNN, L. L.; RAHMANTO, Y. S.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 2, p. 93-100, 2007.

FENG, J. et al. The effect of iron glycine chelate on tissue mineral levels, fecal mineral concentration, and liver antioxidant enzyme activity in weanling pigs. **Animal feed science and technology**, v. 150, n. 1-2, p. 106-113, 2009.

FENG, J. et al. Effects of iron glycine chelate on growth, haematological and immunological characteristics in weanling pigs. **Animal feed science and technology**, v. 134, n. 3-4, p. 261-272, 2007.

FINGLAND, R. B. Ovariohysterectomy. In: BOJRAB, M. J. (Ed.). **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 375-380. 1996.

FONG, L. et al. Interaction of dietary zinc and intracellular binding protein metallothionein in postnatal bone growth. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1151-1162, 2009.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2014.

HAMBIDGE, M. Biomarkers of trace mineral intake and status. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 3, p. 948S-955S, 2003.

HARVEY, J. W. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W., et al (Ed.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Massachusetts: Elsevier, 259-285. 2008.

HENRIQUES, G. S.; HIRATA, M. H.; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da Enzima Conversora de Angiotensina. **Revista de nutrição**, v. 16, n. 3, p. 333-345, 2003.

HOSTÝNEK, J. J. et al. Metals and the skin. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 171-235, 1993.

JAMIKORN, U.; PREEDAPATTARAPONG, T. Comparative effects of zinc methionylglycinate and zinc sulfate on hair coat characteristics and zinc concentration in plasma, hair, and stool of dogs. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 4, p. 9-16, 2008.

KONG, Y.-Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v. 397, n. 6717, p. 315, 1999.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Nutrition of chicken**. 4th ed. Guelph: Guelph University Books. 415 p. 2001.

LINDER, M. C.; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **The American journal of clinical nutrition**, v. 63, n. 5, p. 797S-811S, 1996.

LIU, R. et al. Effects of manganese deficiency on the microstructure of proximal tibia and OPG/RANKL gene expression in chicks. **Veterinary research communications**, v. 39, n. 1, p. 31-37, 2015.

LÖNNERDAL, B. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 3, p. 846S-850S, 2008.

LOWE, J. A.; WISEMAN, J.; COLE, D. Absorption and retention of zinc when administered as an amino-acid chelate in the dog. **The Journal of nutrition**, v. 124, n. suppl\_12, p. 2572S-2574S, 1994.

MAQUART, F.-X. et al. In vivo stimulation of connective tissue accumulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2+</sup> in rat experimental wounds. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 5, p. 2368-2376, 1993.

MAQUART, F.-X. et al. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. **Connective tissue research**, v. 24, n. 2, p. 107-120, 1990.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1455S-1458S, 2000.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. Academic Press Inc. 1992.

NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. National Research Council: National Academies Press 2006.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 199-211, 2005.

PARVEZ, S. et al. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 9, p. 805-816, 2007.

REIS, J. S. **Microminerais biocomplexados em dietas para gatos em crescimento**. 2016. 146 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2016.

RINCKER, M. et al. Effects of dietary zinc and iron supplementation on mineral excretion, body composition, and mineral status of nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 12, p. 2762-2774, 2005.

SCHIAVON, S. et al. Effect of proteinate or sulphate mineral sources on trace elements in blood and liver of piglets. **Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 131-139, 2000.

SCHÜMANN, K. et al. Hohenheim consensus workshop: copper. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 469, 2002.

SHENKIN, A. Current concepts on trace element requirements in nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 12, p. S114-S118, 1993.

SILVA, J. H. V.; PASCOAL, L. A. F. Função e disponibilidade dos minerais. In: SILCA, J. H. V. P., L. A. F. (Ed.). **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L., 678. 2014.

TODD, S.; THOMAS, D.; HENDRIKS, W. Selenium balance in the adult cat in relation to intake of dietary sodium selenite and organically bound selenium. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 96, n. 1, p. 148-158, 2012.

VERSIECK, J.; MCCALL, J. T. Trace elements in human body fluids and tissues. **CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 22, n. 2, p. 97-184, 1985.

WANG, Y.; HOU, J.-F.; ZHOU, Z.-L. Chicken receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand induces formation of chicken osteoclasts from bone marrow cells and also directly activates mature osteoclasts. **Poultry Science**, v. 87, n. 11, p. 2344-2349, 2008.

WANG, Y. et al. Effects of selenomethionine and sodium selenite supplementation on meat quality, selenium distribution and antioxidant status in broilers. **Czech Journal of Animal Science**, v. 56, n. 7, p. 305-313, 2011.

WEDEKIND, K. J. Micronutrients: minerals and vitamins. In: HAND, M. S. e LEWIS, L. D. (Ed.). **Small animal clinical nutrition**. 5. ed. Kansas: Mark Morris Institute, 107-148. 2010.

WEGROWSKI, Y.; MAQUART, F.; BOREL, J. Stimulation of sulfated glycosaminoglycan synthesis by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2+</sup>. **Life Sciences**, v. 51, n. 13, p. 1049-1056, 1992.

WINDISCH, W.; GABLER, S.; KIRCHGESSNER, M. Effect of selenite, seleno cysteine and seleno methionine on the selenium metabolism of <sup>75</sup>Se labeled rats. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 78, n. 1-5, p. 67-74, 1997.

YAMAGUCHI, M.; WEITZMANN, M. N. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- $\kappa$ B activation. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 355, n. 1-2, p. 179, 2011.

YASUDA, H. et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1329-1337, 1998.

YENICE, E. et al. Effects of organic and inorganic forms of manganese, zinc, copper, and chromium on bioavailability of these minerals and calcium in late-phase laying hens. **Biological trace element research**, v. 167, n. 2, p. 300-307, 2015.

YILDIZ, A.; CUFADAR, Y.; OLGUN, O. Effects of dietary organic and inorganic manganese supplementation on performance, egg quality and bone mineralisation in laying hens. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 162, n. 10, p. 482-488, 2011.

YOON, I.; WERNER, T.; BUTLER, J. Effect of source and concentration of selenium on growth performance and selenium retention in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, n. 4, p. 727-730, 2007.

ZHAN, X. et al. Selenomethionine: an effective selenium source for sow to improve Se distribution, antioxidant status, and growth performance of pig offspring. **Biological trace element research**, v. 142, n. 3, p. 481-491, 2011.

**ARTIGO 2 Desempenho animal e atividade de metaloenzimas de cães em crescimento suplementados com microminerais orgânicos**

Artigo formatado segundo as normas do *Animal Feed Science and Technology* (versão preliminar).

## Resumo

Os microminerais são de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento animal. Atuam em diversos processos fisiológicos e metabólicos que permitem a completa e correta formação do organismo. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos das fontes inorgânica (ING) *versus* orgânica (ORG) e diminuição suplementar dos microminerais ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), selênio (Se) e manganês (Mn). Vinte e quatro cães filhotes, aos 70 dias de idade ( $1,30 \pm 0,36$  Kg), foram avaliados durante 150 dias. Foi analisado o desempenho animal, através da mensuração do peso corporal, altura de cernelha e comprimento corporal e, a proteção antioxidante, através da avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a peroxidação lipídica pela mensuração da concentração de malondialdeído (MDA). A dieta controle (100%ING) foi suplementada com 88 mg de Fe/kg, 100 mg de Zn/kg, 11 mg de Cu/Kg, 0,35 mg de Se/kg e 5,6 mg de Mn/kg. Os demais tratamentos, três níveis de microminerais orgânicos (Bioplex<sup>®</sup>TR), foram usados como substitutos na mesma concentração mineral (100%ORG) ou em proporções menores (70%ORG e 40%ORG), totalizando quatro tratamentos. Os cães foram distribuídos em delineamento inteiramente ao acaso, totalizando 6 repetições por tratamento. Nenhuma diferença ( $p > 0,05$ ) foi encontrada entre as fontes ING e ORG, nos seus diferentes níveis, para peso corporal, altura de cernelha, comprimento corporal e atividade das enzimas SOD, GSH-Px E MDA. Foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre as fontes e nos seus diferentes níveis para densidade mineral óssea, sendo que a suplementação de 70% de microminerais orgânicos apresentou maior densidade dos ossos úmero, rádio e ulna. Conclui-se que a redução nos níveis de suplementação da fonte orgânica não afetou o desempenho e a atividade antioxidante podendo-se, portanto, ser utilizada como fonte de suplementação para cães filhotes. O nível de suplementação da fonte orgânica de 70% pode ser adotado, pois se mostrou igual à fonte inorgânica para a defesa antioxidante, manteve o desempenho dos cães e teve melhores resultados para o desenvolvimento ósseo.

*Palavras-chave:* desenvolvimento animal, defesa antioxidante, enzimas.

## 1. Introdução

O perfil nutricional da ração e o uso de métodos de alimentação adequados durante a vida do animal, especialmente na fase de crescimento, diminuem o risco de patologias. Os minerais atuam no processo de crescimento do animal de diversas formas. A divisão celular é a base do crescimento e requer DNA, RNA e síntese proteica. O Zn entra como cofator em inúmeras enzimas que participam da expressão gênica por meio de fatores de transcrição. Essas

enzimas são metaloenzimas dependentes de Zn e são associadas à síntese de DNA e RNA, incluindo a RNA polimerase e transcriptase reversa. Nelas, o Zn se liga firmemente, estabilizando estruturas que são funcionalmente importantes. O Zn também pode influenciar a regulação hormonal da divisão celular, especialmente via hormônio do crescimento (GH) e fator I do crescimento dependente de insulina (IGF-I), além de interferir em hormônios mitogênicos, atuando sobre a proliferação celular, além de ter efeito estimulatório na formação osteoblástica e mineralização óssea (MACDONALD, 2000).

A lisil oxidase é uma enzima dependente de Cu importante na formação das ligações cruzadas de colágeno e elastina, a qual é necessária para adicionar um grupo hidroxila aos resíduos de lisina e colágeno, permitindo a ligação cruzada entre as fibras de colágeno. Essa ligação dá a proteína a rigidez e elasticidade estrutural (CHOU et al., 1969). O Fe atua como cofator de hidroxilação da enzima prolina-lisil hidroxilase responsável por formar a hidroxiprolina, constituinte do colágeno (TUDERMAN et al., 1977). O Mn é essencial para o desenvolvimento da matriz orgânica dos ossos que é composta grandemente por mucopolissacarídeos (SALTMAN e STRAUSE, 1993).

Os minerais também participam de metaloenzimas importantes na proteção contra a oxidação celular e antioxidante como a superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). A principal função da SOD é catalisar a dismutação do superóxido, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron, em peróxido de hidrogênio. Pode ser encontrada tanto na mitocôndria quanto no citosol. Na mitocôndria, essa enzima é dependente do elemento Mn e no citosol é Cu-Zn dependente (MACMILLAN-CROW e CRUTHIRDS, 2001).

O Se atua na manutenção do equilíbrio oxidativo participando como constituinte da enzima GSH-Px na forma de selenocisteína. A selenocisteína tem sua estrutura química semelhante à cisteína, porém, possui uma molécula de Se no lugar do enxofre. A GSH-Px é importante no controle da formação de radicais livres por meio da redução de peróxido de hidrogênio e peróxido lipídico para água e álcool (DALIA et al., 2017).

A densidade mineral óssea é um parâmetro biofísico de grande importância experimental e clínica, que permite avaliar o processo de mineralização óssea (LOUZADA, 1997). Porém, o alto custo dos equipamentos e, conseqüentemente, dos exames para determinação e avaliação da densidade mineral óssea, inviabilizam a introdução e aplicação da densitometria óssea como modalidade de diagnóstico complementar de rotina. Assim, novos métodos estão sendo estudados visando facilitar a avaliação da densidade mineral óssea.

A densitometria óptica radiográfica tem se mostrado uma técnica viável para avaliar as alterações de densidade mineral, podendo ser até mais eficientes do que as análises bioquímicas séricas de fosfatase alcalina, fósforo e cálcio para a determinação da desmineralização óssea (GALLO, 1996; LEAL, 2002; RAHAL et al., 2002). Nessa técnica utiliza-se uma escala de alumínio como referencial densitométrico. O alumínio tem sido usado para confecção da escala, por possuir uma curva de absorção de radiação X muito semelhante à dos ossos (LEMBO, 2006). A escala de alumínio, por possuir características conhecidas, permite estabelecer uma calibração pelo sistema computacional por comparação das tonalidades de cinza, minimizando possíveis alterações que a imagem possa apresentar em decorrência de variáveis radiológicas e gerando valores densitométricos expressos em equivalentes a milímetros de alumínio (mmAl) (LOUZADA, 1997).

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da substituição de Fe, Zn, Cu, Se e Mn inorgânico pela forma orgânica, incluídos em níveis usuais (100%) ou reduzidos (70% e 40%), sobre o crescimento de cães filhotes avaliando o peso corporal, altura de cernelha, comprimento corporal, densidade mineral dos osso úmero, rádio e ulna, atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase e concentração de malondialdeído.

## **2. Material e métodos**

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (protocolo 006/18).

### *2.1 Animais*

Vinte e quatro cães filhotes, sem raça definida, aos 70 dias de vida e com peso médio inicial de  $1,30 \pm 0,36$  Kg foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso. Os filhotes foram vacinados aos 60, 90 e 120 dias de idade (Elevencell Vac, Labovet Produtos Veterinários, Brasil) e alojados individualmente em baias com piso de cimento e dimensões 2,5 x 0,9 m. O período experimental teve duração de 130 dias.

### *2.2 Dietas experimentais*

Os filhotes foram distribuídos em quatro tratamentos experimentais, sendo que no tratamento I foi utilizada a fonte inorgânica de microminerais na suplementação de 100% da recomendação do NRC (2006) para cães filhotes. Já nos tratamentos II, III e IV foi utilizada a

fonte orgânica nas suplementações de 100%, 70% e 40% da recomendação de microminerais do NRC (2006), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para cães filhotes.

Ingredientes (g/kg na matéria natural)	100% ING	100% ORG	70% ORG	40% ORG
Quirera de milho	387,55	387,55	387,55	387,55
Farelo de trigo	200,00	200,00	200,00	200,00
Farinha de vísceras	131,80	131,80	131,80	131,80
Farinha de carne e ossos	100,00	100,00	100,00	100,00
Farelo de soja	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de vísceras de aves	30,00	30,00	30,00	30,00
Óleo de soja	15,00	15,00	15,00	15,00
Adsorvente - MYCOSORB®	1,00	1,00	1,00	1,00
Antioxidante - BHT	0,15	0,15	0,15	0,15
Antifúngico - Ácido propiônico	0,50	0,50	0,50	0,50
Palatabilizante natural	20,00	20,00	20,00	20,00
Mananoligossacarídeo	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	3,00	3,00	3,00	3,00
Ácido docosahexaenóico	4,00	4,00	4,00	4,00
Cloreto de colina	2,00	2,00	2,00	2,00
Premix vitamínico <sup>a</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00
Fonte mineral inorgânica <sup>b</sup>	2,00	-	-	-
Fonte mineral orgânica <sup>c</sup>	-	2,00	1,40	0,80
Inerte (caulin)	-	-	0,60	1,20

<sup>a</sup>Premix vitamínico forneceu os seguintes níveis de vitaminas por quilograma de alimento: vitamina A (15000UI), vitamina D3 (1500UI), vitamina E (350UI), vitamina K (0,15 mg), tiamina (1,60 mg), riboflavina (2,8 mg), ácido pantotênico (12,5 mg), niacina (14,5 mg), piridoxina (1,4 mg), ácido fólico (0,2 mg), biotina (2,5 mg) vitamina B12 (0,03 mg), colina (2000mg).

<sup>b</sup>Fonte mineral inorgânica continha no mínimo, por quilograma do premix: 45000 mg de ferro (sulfato de ferro), 5500 mg de cobre (sulfato de cobre), 3000 mg de manganês (sulfato de manganês), 52500 mg de zinco (sulfato de zinco), 868 mg de iodo (iodato de cálcio), 180 mg de selênio (selenito de sódio).

<sup>c</sup>Fonte mineral orgânica continha no mínimo, por quilograma do premix: 45000 mg de ferro (proteinato de ferro), 5500 mg de cobre (proteinato de cobre), 3000 mg de manganês (proteinato de manganês), 52500 mg de zinco (proteinato de zinco), 868 mg de iodo (iodato de potássio), 180 mg de selênio (levedura enriquecida com selênio).

As dietas diferiram apenas na quantidade e fonte de microminerais, sendo isoenergéticas e isoproteicas (Tabela 2 e 3). O NRC (2006) recomenda as seguintes quantidades de microminerais para cães filhotes: 11mg de Cu/kg; 88mg de Fe/kg; 5,6mg de Mn/kg; 0,35mg de Se/kg e 100mg de Zn/kg, na matéria seca, considerando um alimento com aproximadamente 4000kcal de energia metabolizável/kg.

Os animais receberam água *ad libitum* e os alimentos foram fornecidos diariamente na quantidade calculada segundo a equação (1). As médias de consumo diário dos animais foram: Tratamento I - 331,19g; Tratamento II: 332,30g; Tratamento III - 373,42g; Tratamento IV - 354,73.

$$EM=130*PC^{0,75}*3,2*[e^{(-0,87p)}-0,1] \quad (1)$$

Onde:

EM= energia metabolizável em kcal/dia

PC= peso corporal em kg

p = PCa/PCm

PCa = peso corporal no momento da avaliação (kg)

PCm = peso corporal esperado quando adulto (kg)

e = base do logaritmo natural, log = 2,718

A fonte mineral orgânica (Bioplex®TR) foi fornecida por fontes proteinadas disponíveis comercialmente, obtida a partir de proteína de soja hidrolisada enzimaticamente; exceto o Se orgânico que foi a partir de uma proteína de levedura, principalmente como selenometionina. Já a fonte inorgânica foi suplementada como sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco e selenito de sódio.

Tabela 2 - Recomendação do NRC (2006) e redução dos níveis suplementares da fonte orgânica (ORG) e fonte inorgânica (ING) dos microminerais nas dietas experimentais para cães em crescimento.

Tratamentos	mg/kg de alimento na matéria seca				
	Fe	Zn	Cu	Se	Mn
100% ING	88,00	100,00	11,00	0,35	5,60
100% ORG	88,00	100,00	11,00	0,35	5,60
70% ORG	61,60	70,00	7,70	0,25	3,92
40% ORG	35,20	40,00	4,40	0,14	2,24

Tabela 3 - Composição analisada de microminerais de fontes inorgânicas (ING) ou orgânicas (ORG) nas dietas experimentais para cães em crescimento.

Tratamentos	mg/kg de alimento na matéria seca				
	Fe	Zn	Cu	Se	Mn
100% ING	451,361	155,304	32,224	0,388	40,329
100% ORG	401,840	141,588	31,942	0,364	39,679
70% ORG	346,333	129,466	20,042	0,294	29,510
40% ORG	340,089	109,420	18,773	0,280	24,827
Mistura alimentícia sem as fontes de minerais	306,916	53,781	15,640	0,086	22,146

### 2.3 Desempenho animal e densidade mineral óssea

Os cães foram pesados e tiveram a altura de cernelha e comprimento corporal mensurados no primeiro dia de fornecimento das dietas e, posteriormente, semanalmente até o final do experimento. A altura de cernelha foi determinada tomando por base a distância vertical entre a cernelha e o solo. O comprimento corporal foi feito tomando como ponto inicial a base da nuca (articulação atlânto-occipital), com mensuração até o solo, passando pela base da cauda (última vértebra sacral) e pela tuberosidade do calcâneo (adaptado de Muller et al., 2008).

Os animais tiveram o membro torácico direito radiografado em projeção médio lateral, em decúbito lateral direito no 130º dia para determinação do desenvolvimento ósseo. Todas as radiografias foram feitas com chassi e filme radiográfico (Fujifilm Holdings Co., Japão) tamanho 24x30cm, no conjunto de aparelho radiográfico (modelo ST503HF, Sawae Co., Brasil). A técnica radiográfica utilizada como padrão para todas as radiografias foi fixada em quilovoltagem de 40Kv e tempo de exposição de 10mA/s. Junto ao chassi foi fixada uma escala de alumínio (Liga específica padronizada pela ABNT), usado como referencial densitométrico, o qual foi posicionado paralelamente ao membro radiografado. A escala continha 29 degraus, tendo o primeiro degrau 1,0mm de espessura, variando a seguir de 1,0 em 1,0mm. As imagens foram arquivadas em JPEG e analisadas por meio do software ImageJ® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos), onde foi feita a comparação de tonalidades de cinza entre a escala de referência e o osso. Em todos os animais foram realizadas três leituras consecutivas de todo o osso e da escala.

### 2.4 Atividade enzimática e peroxidação lipídica

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos a coletas de sangue para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase

(GSH-Px) e da concentração de malondialdeído (MDA) pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram coletadas com os cães em jejum de 12 horas, através da veia jugular e, posteriormente, colocadas individualmente em mini tubos contendo anticoagulante heparina (Mini Tubos, Labor Import Co., Brasil) e processados em centrífuga a 1000xg por 10 minutos a temperatura de 4°C (modelo 2K-15 Sigma Laborzentrifugen, Sigma, Alemanha). Após centrifugação, o plasma foi removido e armazenado em micro tubos tipo eppendorf e congelado a temperatura de -80°C até a realização das análises. Para as análises foram utilizados os kits comerciais Superóxido Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Co., Estados Unidos), Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical Co., Estados Unidos) e TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Co., Estados Unidos), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. As leituras das microplacas foram feitas em espectrofotômetro automático de microplacas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific Inc., Alemanha), sendo que todas as análises foram realizadas em duplicata para cada parcela experimental.

### 2.5 Análises estatísticas

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado, sendo que os 24 cães foram distribuídos aos quatro tratamentos, totalizando seis animais por tratamento e cada animal correspondente a uma unidade experimental. Foi realizado o teste Shapiro-Wilk para analisar a normalidade dos dados e quando necessário eles foram transformados antes de serem analisados estatisticamente.

Foi realizada a análise de variância das variáveis ganho de peso, comprimento corporal e altura de cernelha em seis tempos de coleta em esquema de parcela subdividida no tempo.

No presente estudo, a análise de variância foi realizada utilizando a função *psub2.dic* do pacote *ExpDes.pt* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2019). O teste de médias Tukey foi utilizado para comparação das dietas e análise de regressão ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo. Significância foi declarada a  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1 Desempenho animal e densidade mineral óssea

Não foi observada interação dieta x tempo ( $p > 0,05$ ) e diferença entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros peso corporal (Tabela 4 e Figura 1), altura de cernelha (Figura 2) e comprimento corporal (Tabela 5 e Figura 3), mas observou-se diferença ( $p < 0,05$ )

entre os tempos de coleta em todos esses parâmetros. A densidade mineral dos ossos úmero, rádio e ulna (Tabela 6) foi maior ( $p>0,05$ ) no tratamento com suplementação de 70% de microminerais orgânicos.

Tabela 4 - Peso corporal de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) (*Bioplex®TR*).

Item	Tempo	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor <sup>a</sup>			EPM <sup>b</sup>
			100% ORG	70% ORG	40% ORG	D x T	D	T	
Peso (Kg)	0	1,29	1,29	1,31	1,28				
	3	1,63	1,75	1,8	1,84				
	6	2,38	2,48	2,79	2,87	0,56	0,39	<0,01	0,02
	9	3,76	3,85	4,09	4,46				
	12	5,67	5,60	5,66	6,79				
	15	7,97	7,74	7,89	9,58				
	18	9,71	9,45	9,67	11,15				

<sup>a</sup> D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo.

<sup>b</sup> EPM = erro padrão da média

Figura 1 - Evolução do peso de cães filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (*Bioplex®TR*) de 70 a 120 dias de idade.

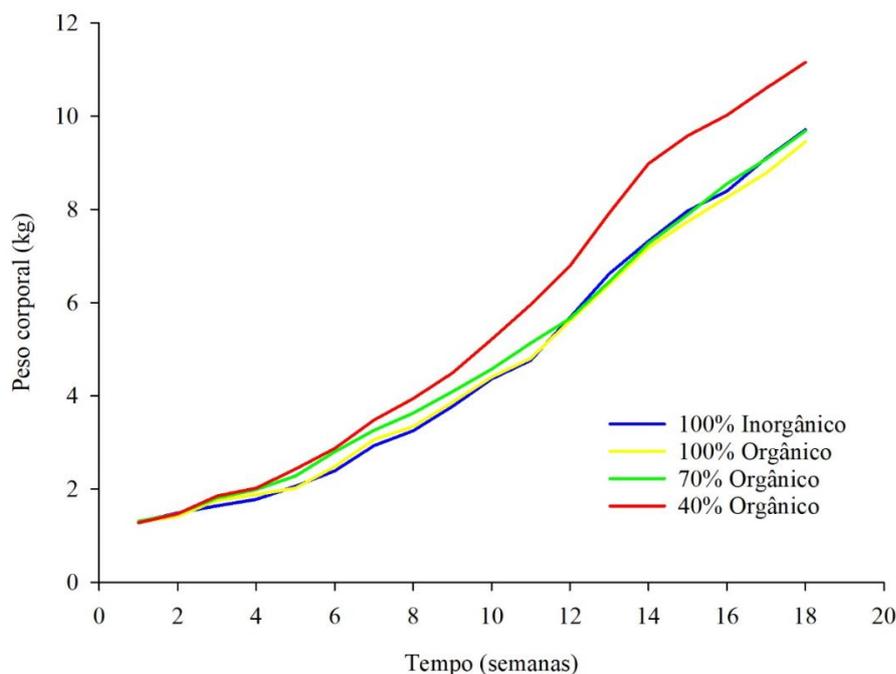


Figura 2 - Altura de cernelha de cães filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (*Bioplex®TR*).

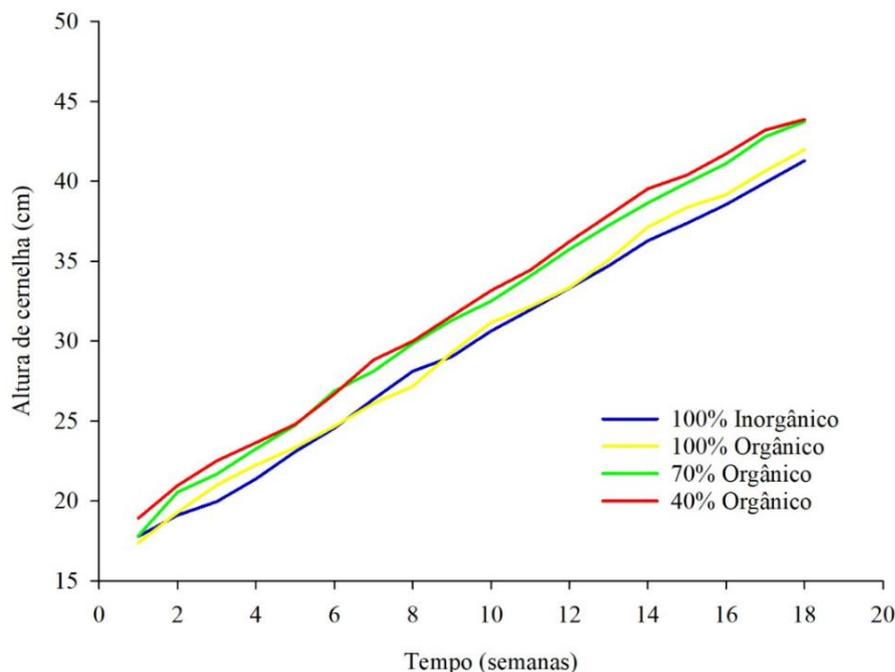


Tabela 5 - Altura de cernelha (AC) e comprimento corporal (CC) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (*Bioplex®TR*).

Item	Tempo (semanas)	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor <sup>a</sup>			EPM <sup>b</sup>
			100% ING	70% ING	40% ING	D x T	D	T	
AC (cm)	0	17,78	17,38	17,81	18,92				
	3	19,95	20,98	21,66	22,50				
	6	24,55	24,66	26,86	26,68				
	9	29,01	29,28	31,30	31,58	0,50	0,43	0,001	0,03
	12	33,31	33,34	35,73	36,22				
	15	37,37	38,36	39,90	40,38				
CC (cm)	0	36,68	38,68	39,33	38,36				
	3	42,81	43,80	45,80	46,78				
	6	53,08	50,54	54,81	55,62				
	9	62,80	61,80	65,46	66,44	0,57	0,67	<0,01	0,06
	12	71,55	69,84	74,21	76,02				
	15	78,40	79,70	82,28	84,62				
	18	83,95	85,46	88,26	88,82				

<sup>a</sup> D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo.

<sup>b</sup> EPM = erro padrão da média

Figura 3 - Comprimento corporal (CC) de cães filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (ferro, zinco, cobre, selênio e manganês) orgânicos (*Bioplex®TR*).

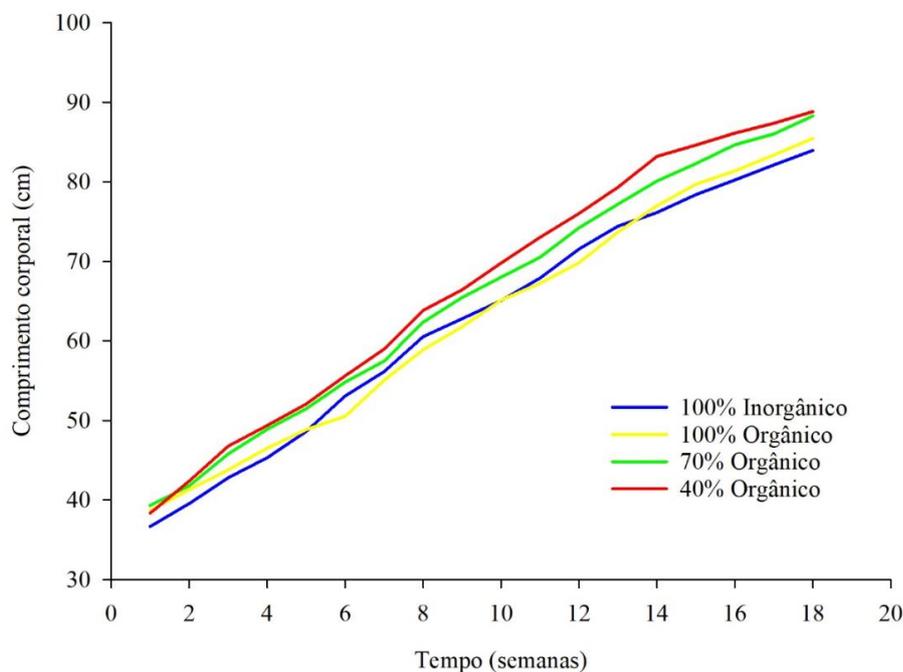


Tabela 6 - Densidade mineral óssea (em milímetro de alumínio – mmAl) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) orgânicos (*Bioplex®TR*).

Item	100% ING	Níveis suplementares (ORG)			p-valor	EPM
		100% ORG	70% ORG	40% ORG		
Úmero	1,94b	1,95b	2,84a	2,11b	0,02	0,19
Rádio	1,78b	1,90b	2,82a	2,09b	0,04	0,24
Ulna	1,81b	1,76b	2,79a	1,83b	0,02	0,22

Médias na mesma linha seguidas por letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
EPM = erro padrão da média

### 3.2 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-PX) e peroxidação lipídica (concentração de MDA)

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em resposta à suplementação inorgânica (100%) ou pelos diferentes níveis de suplementação orgânica (100%, 70% e 40%) na atividade das enzimas SOD, GSH-Px e na peroxidação lipídica (concentração de MDA) (Figuras 4 a 6).

Figura 4 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) (*Bioplex®TR*).

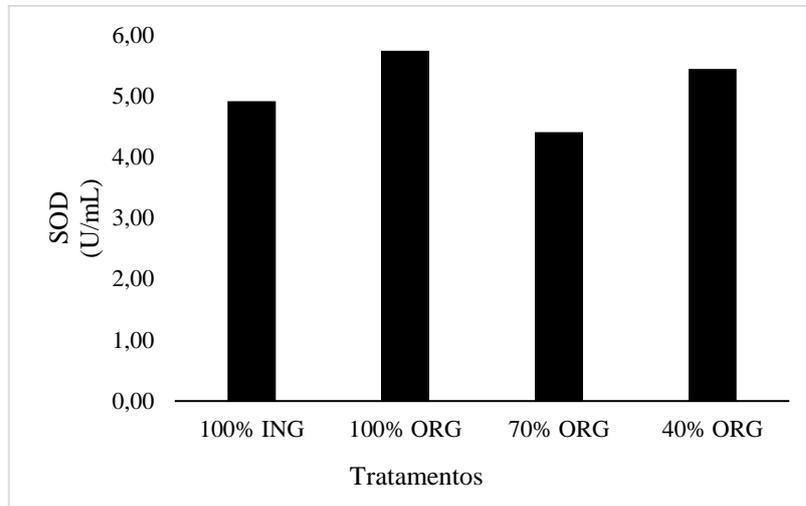


Figura 5 - Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH- Px) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) (*Bioplex®TR*).

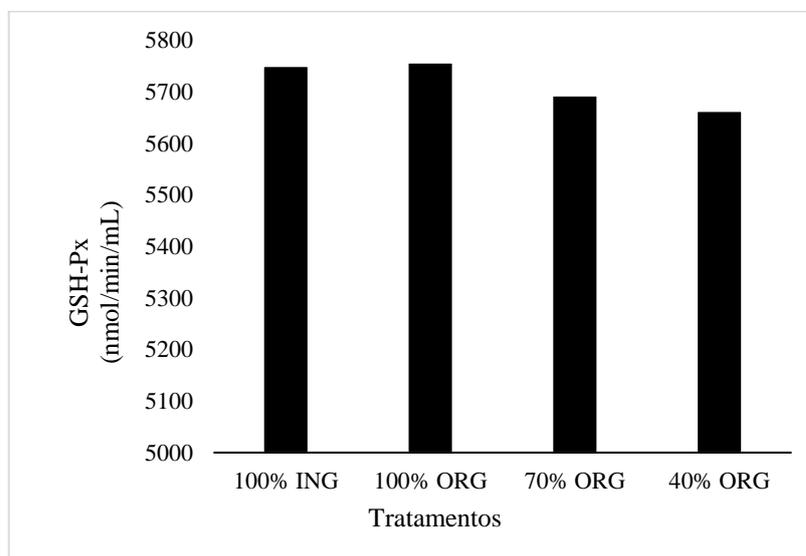
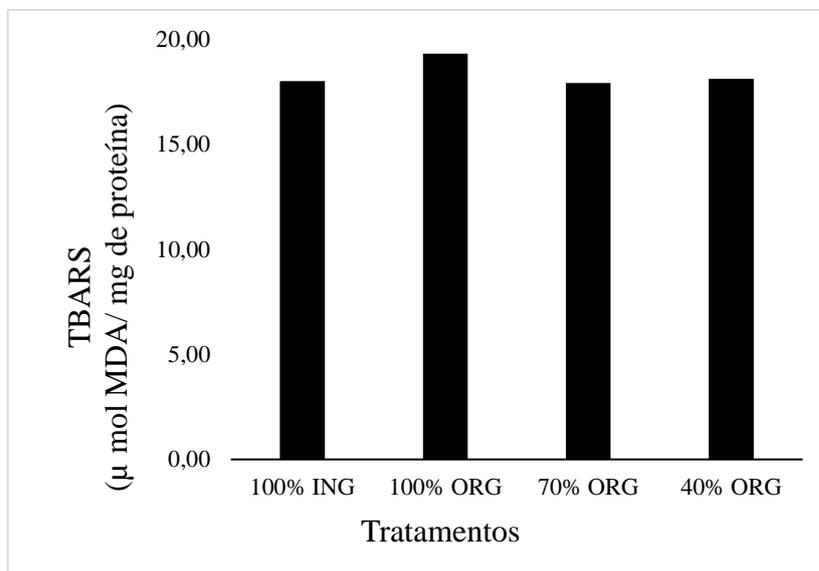


Figura 6 - Concentração de malondialdeído (MDA) de cães filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou orgânica - ORG) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) (Bioplex®TR).



#### 4. Discussão

##### 4.1 Desempenho animal e densidade mineral óssea

A redução da suplementação de Fe, Zn, Cu, Se e Mn sob a forma orgânica não afetou os parâmetros peso corporal, altura de cernelha e comprimento corporal de cães filhotes até os 220 dias de idade. Todas as dietas atenderam a necessidade mínima de cães em crescimento estabelecida pelo NRC (2006). Os ingredientes utilizados na formulação junto com a suplementação dos minerais podem ter beneficiado o tratamento com 40% de inclusão de microminerais orgânicos. Esse favorecimento pode ter evitado o aparecimento de problemas no desenvolvimento e pode ter feito com que os animais que receberam essa inclusão apresentassem maiores valores de peso corporal, altura de cernelha e comprimento corporal (Figuras 1 a 3) mesmo que não significativos estatisticamente. Durante esse período, os cães apresentaram crescimento e desenvolvimento dentro do esperado para a fase de vida desses animais. Não há relatos na literatura de estudos que analisaram o desenvolvimento de cães recebendo a substituição total de micro minerais inorgânicos pela forma orgânica.

Reis (2016) também não encontrou diferenças nos parâmetros de desempenhos em gatos suplementados com níveis reduzidos desses microminerais. Nollet et al. (2008) não observaram diferenças no peso corporal e no ganho de peso de frangos de corte recebendo uma redução suplementar de até 83% de microminerais orgânicos. Sechinato et al. (2006), Brito et al. (2006)

e Creech et al. (2004) também não relataram diferenças em poedeiras, frangas de reposição e suínos, respectivamente. Ott e Johnson (2001) também avaliaram a substituição da forma orgânica dos microminerais Cu, Mn e Zn pela forma inorgânica em cavalos e não encontraram diferenças no comprimento corporal, no ganho de peso e na altura de cernelha.

Não há na literatura valores de referência para a densidade mineral óssea de cães, uma vez que a técnica utilizada pode influenciar esses valores. No presente estudo foi possível observar que os ossos dos animais que receberam a suplementação com 70% de microminerais na forma orgânica apresentaram maior densidade mineral do que nos animais suplementados com a forma inorgânica, conferindo-os maior resistência e, portanto, menor risco de fratura. Esse resultado pode estar relacionado à maior biodisponibilidade das fontes orgânicas de minerais. De fato, a ligação dos minerais às moléculas orgânicas facilitaria a absorção e acesso do mineral aos órgãos ou sistema que dele necessitam aumentando-se, assim, a sua biodisponibilidade (ACDA e CHAE, 2002). Gobesso et al. (2014) observaram que potros tratados com minerais na forma orgânica apresentaram um incremento significativo em sua densidade óssea.

Os animais não apresentaram sinais de deficiência de minerais que afetariam o crescimento e desenvolvimento nesta fase e isso sugere que não houve influência negativa da menor suplementação de microminerais. A deficiência de microminerais afetaria o desenvolvimento ósseo resultando em anormalidades esqueléticas e redução da densidade mineral óssea. Segundo Rostagno et al. (2000) e Gomes et al. (1996), a concentração de Zn no osso (tíbia) de frangos tem sido utilizada para estimar a exigência desse mineral por participar de metaloproteínas de matriz que atuam na remodelação da matriz extracelular colagenosa do osso. Eberle et al. (1999) avaliando a deficiência de Zn em ratos, fornecendo uma dieta baseada em caseína (0,76 mg de Zn/kg) ou a mesma dieta suplementada com 60 mg de Zn/kg concluíram que essa deficiência levou ao aparecimento de osteopenia no fêmur desses animais.

O Mn também participa de metaloenzimas responsáveis pela síntese de mucopolissacarídeos no tecido cartilaginoso. Yildiz et al. (2011) estudando cinco doses crescentes de Mn nas formas orgânica e inorgânica (15, 30, 45, 60 e 75 mg/kg) em poedeiras, encontrou que a suplementação da forma orgânica de Mn afeta positivamente a distribuição dos elementos no organismo, levando a uma melhoria no crescimento e na solidez óssea, concluindo que a fonte orgânica é a melhor a ser utilizada, assim como foi apresentado também no presente estudo.

Outro fator que poderia afetar o crescimento dos cães é a alteração no olfato e paladar, ocasionada pela deficiência de Zn, o que levaria a uma anorexia e perda de peso, não observadas no presente estudo. Takeda et al. (2004) relacionaram o Zn a uma metaloenzima responsável pela sensação de paladar em humanos e a deficiência desse mineral ocasionou hipogeusia, que foi corrigida após terapia com o elemento.

#### *4.2 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) e peroxidação lipídica (concentração de MDA)*

As enzimas SOD e GSH-Px são importantes para manutenção da defesa antioxidante e microminerais como Cu, Zn, Mn e Se são indispensáveis na regulação da atividade das mesmas. Portanto, o adequado fornecimento desses elementos na dieta é de extrema importância a proteção contra o dano oxidativo. No presente trabalho, não houve alteração significativa na atividade das enzimas SOD e GSH-Px e na concentração de MDA. As suplementações de microminerais na forma orgânica foram semelhantes à suplementação inorgânica para esses parâmetros e, portanto, fornecem adequada proteção ao organismo contra oxidação.

Ao contrário dos resultados obtidos, Li et al. (2017) suplementando a dieta de frangos de corte com 0,3 mg de Se/kg com as fontes selenito de sódio, levedura enriquecida com Se e selenometionina, verificaram que a fonte orgânica de Se proporcionou maior atividade sérica de GSH-Px, assim como Yoon et al. (2007) que forneceram 0,15 mg Se/Kg, nas formas de selenito de sódio e selenometionina e, Wang e Xu (2008) (0,2 mg de Se/kg selenito de sódio e levedura enriquecida com Se). Cao et al. (2014) avaliando em suínos (0,3 mg Se/kg de selenito de sódio *versus* 0,1, 0,3, 0,5 e 0,7 mg Se/kg de DL-Selenometionina). Já Reis (2016) e Payne & Southern (2005) também não encontraram diferenças na atividade da GSH-Px em gatos e frangos de corte, respectivamente, assim como neste trabalho.

No presente estudo, os resultados mostram uma semelhança na atividade da GSH-Px em todas as dietas experimentais. Neste caso, o Se do selenito de sódio pode ter sido incorporado rapidamente na GSH-Px e o Se da selenometionina teria sido incorporado inicialmente às proteínas (WHITE e HOEKSTRA, 1979).

Alguns trabalhos relataram resultados diferentes aos encontrados neste estudo. Ma et al. (2011) mostraram que a adição de 90 ou 120 mg / kg de zinco glicina levou a uma melhora da atividade da SOD e GSH-Px e uma redução do conteúdo de MDA nos fígados de frangos de corte aos 21 e 42 dias. Aksu et al. (2010) verificaram que a atividade da SOD eritrocitária foi maior e da SOD em tecido hepático foi semelhantes entre as dietas experimentais, já os níveis

de MDA plasmático foram menores nos frangos que consumiram a fonte orgânica de Cu, Mn e Zn, independente do nível. Já Cao et al. (2014) não encontraram mudanças significativas da concentração de MDA no plasma de suínos, resultados que corroboram com os encontrados no presente trabalho.

## **5. Conclusão**

A redução nos níveis de suplementação da fonte orgânica não afetou o desempenho e a atividade antioxidante, podendo, portanto, ser utilizada como fonte de suplementação para cães filhotes.

O nível de suplementação da fonte orgânica de 70% pode ser adotado, pois apresentou melhores resultados para o desenvolvimento ósseo, mostrou-se igual à fonte orgânica para a defesa antioxidante e manteve o desempenho dos cães.

## Referências Bibliográficas

ACDA, S.; CHAE, B. A review on the applications of organic trace minerals in pig nutrition. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 25-30, 2002.

BRITO, J. Á. G. D. U. et al. Uso de microminerais sob a forma de complexo orgânico em rações para frangas de reposição no período de 7 a 12 semanas de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2006.

CAO, J. et al. Effects of dietary Selenomethionine supplementation on growth performance, antioxidant status, plasma selenium concentration, and immune function in weaning pigs. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 46, 2014.

CHOU, W.; SAVAGE, J.; O'DELL, B. Role of copper in biosynthesis of intramolecular cross-links in chick tendon collagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 21, p. 5785-5789, 1969.

DALIA, A. et al. The effect of dietary bacterial organic selenium on growth performance, antioxidant capacity, and Selenoproteins gene expression in broiler chickens. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 254, 2017.

EBERLE, J. et al. Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 13, n. 1-2, p. 21-26, 1999.

GALLO, R. N. E. A. Avaliação da densidade óssea em gatos em crescimento submetidos a dois tipos de ração. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15. **Anais...** v. Campo Grande. Mato Grosso do Sul: PANVET, p. 78, 1996.

GOBESSO, A. A. D. O. et al. Deposição óssea de cálcio e fósforo, densidade radiográfica e desenvolvimento corporal em potros alimentados com minerais orgânicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 2, p. 142-148, 2014.

LEAL, A. C. R. **Determinação dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio em cães por meio da técnica de densitometria óptica radiográfica em imagens radiográficas: correlação entre o peso, sexo e idade.** 2002. 51. (Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.2002.

LEMBO, M. **Estudo comparativo da densidade mineral óssea (DMO) em gatos domésticos (felis catus) castrados e não castrados, por meio da técnica de densitometria óptica radiográfica.** 2006. 87 p. (Mestrado (dissertação)). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LI, J. et al. Effects of different selenium sources on growth performance, antioxidant capacity and meat quality of local Chinese Subei chickens. **Biological trace element research**, v. 181, n. 2, p. 340-346, 2017.

LOUZADA, M. Densidade de peças ósseas de frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. **Veterinária e Zootecnia**, v. 9, p. 95-109, 1997.

MA, W. et al. Effects of zinc glycine chelate on oxidative stress, contents of trace elements, and intestinal morphology in broilers. **Biological trace element research**, v. 142, n. 3, p. 546-556, 2011.

MACDONALD, R. S. The role of zinc in growth and cell proliferation. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1500S-1508S, 2000.

MACMILLAN-CROW, L. A.; CRUTHIRDS, D. L. Manganese superoxide dismutase in disease. **Free radical research**, v. 34, n. 4, p. 325-336, 2001.

MÜLLER, D. C. D. M.; SCHOSSLER, J. E.; PINHEIRO, M. Adaptação do índice de massa corporal humano para cães. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1038-1043, 2006.

NOLLET, L.; HUYGHEBAERT, G.; SPRING, P. Effect of different levels of dietary organic (Bioplex) trace minerals on live performance of broiler chickens by growth phases. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, n. 1, p. 109-115, 2008.

OTT, E.; JOHNSON, E. Effect of trace mineral proteinates on growth and skeletal and hoof development in yearling horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 6, p. 287-291, 2001.

PAYNE, R.; SOUTHERN, L. Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers. **Poultry Science**, v. 84, n. 6, p. 898-902, 2005.

RAHAL, S. C. et al. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Ciência Rural**, p. 421-425, 2002.

REIS, J. S. **Microminerais biocomplexados em dietas para gatos em crescimento**. 2016. 146 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2016.

SALTMAN, P. D.; STRAUSE, L. G. The role of trace minerals in osteoporosis. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 384-389, 1993.

SECHINATO, A. D. S.; DE ALBUQUERQUE, R.; NAKADA, S. Efeito da suplementação dietética com micro minerais orgânicos na produção de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 159-166, 2006.

TUDERMAN, L.; MYLLYLÄ, R.; KIVIRIKKO, K. I. Mechanism of the Prolyl Hydroxylase Reaction: 1. Role of Co-substrates. **European Journal of Biochemistry**, v. 80, n. 2, p. 341-348, 1977.

WANG, Y.-B.; XU, B.-H. Effect of different selenium source (sodium selenite and selenium yeast) on broiler chickens. **Animal feed science and technology**, v. 144, n. 3-4, p. 306-314, 2008.

WHITE, C. L.; HOEKSTRA, W. G. The metabolism of selenite and selenomethionine in mouse fibroblasts grown in tissue culture. **Biological trace element research**, v. 1, n. 3, p. 243-257, 1979.

YILDIZ, A.; CUFADAR, Y.; OLGUN, O. Effects of dietary organic and inorganic manganese supplementation on performance, egg quality and bone mineralisation in laying hens. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 162, n. 10, p. 482-488, 2011.

YOON, I.; WERNER, T.; BUTLER, J. Effect of source and concentration of selenium on growth performance and selenium retention in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, n. 4, p. 727-730, 2007.

## ANEXOS

### ANEXO A - Análise de variância

Tabela 1A. Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de ferro

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	3550,100482	1183,366827	1,766	0,190
Resíduo	18	12062,799177	670,155510		
CV(%)	19,04				
Média geral	135,94				

Tabela 2A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de ferro nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	3659,088611	1219,696204	1,426	0,268
Resíduo	18	15391,960067	855,108893		
CV(%)	34,68				
Média geral	83,1				

Tabela 3A. Análise de variância e coeficiente de variação para absorção de ferro

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	2419,079906	806,359969	0,729	0,548
Resíduo	18	19922,459203	1106,803289		
CV(%)	64,45				
Média geral	52,12				

Tabela 4A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de ferro na urina

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,425400	0,141800	0,556	0,651
Resíduo	18	4,595200	0,255300		
CV(%)	92,06				
Média geral	0,22				

Tabela 5A. Análise de variância e coeficiente de variação para retenção de ferro

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	2462,79124	820,93004	0,74400	0,540
Resíduo	18	19857,03389	1103,16855		
CV(%)	64,62				
Média geral	51,40				

Tabela 6A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro na pele

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	495505,488100	165168,496000	5,301	0,009
Resíduo	18	560895,001300	31160,833400		
CV(%)	53,83				
Média geral	318,87				

Tabela 7A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro na gônada

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	196346,959900	65448,986600	1,815	0,181
Resíduo	18	649189,000000	36066,097700		
CV(%)	61				
Média geral	306,64				

Tabela 8A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	80996,959200	26998,986400	0,594	0,627
Resíduo	18	817840,686400	45435,986400		
CV(%)	53,17				
Média geral	403,99				

Tabela 9A. Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de zinco

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	478,579921	159,526640	2,011	0,149
Resíduo	18	1428,148610	79,341589		
CV(%)	19,08				
Média geral	46,68				

Tabela 10A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de zinco nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	413,120381	137,706794	1,947	0,158
Resíduo	18	1272,815101	70,711950		
CV(%)	22,2				
Média geral	37,87				

Tabela 11A. Análise de variância e coeficiente de variação para absorção de zinco

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	44,600062	14,866873	0,699	0,565
Resíduo	18	382,820410	21,267801		
CV(%)	52,35				
Média geral	8,80				

Tabela 12A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de zinco na urina

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	3,818700	1,292700	1,440	0,264
Resíduo	18	16,158900	0,897700		
CV(%)	87,4509				
Média geral	0,67				

Tabela 13A. Análise de variância e coeficiente de variação para retenção de zinco

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	40,968974	13,656325	0,687	0,572
Resíduo	18	357,890228	19,882790		
CV(%)	53,7				
Média geral	8,30				

Tabela 14A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco na pele

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	22765,352902	7588,451230	1,673	0,208
Resíduo	18	81645,820813	4535,878900		
CV(%)					
Média geral	173,65				

Tabela 15A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco na gônada

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	9318,181800	3106,060600	0,817	0,501
Resíduo	18	68436,222800	3801,956800		
CV(%)	37,37				
Média geral	165,73				

Tabela 16A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	2478,342659	826,114221	1,220	0,331
Resíduo	18	12176,949251	676,497206		
CV(%)	14,61				
Média geral	177,75				

Tabela 17A. Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de cobre

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	67,626631	22,542210	6,716	0,003
Resíduo	18	60,415723	3,356423		
CV(%)	20,03				
Média geral	9,06				

Tabela 18A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de cobre nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	21,443252	7,147714	4,025	0,236
Resíduo	18	31,967141	1,775902		
CV(%)	17,86				
Média geral	7,46				

Tabela 19A. Análise de variância e coeficiente de variação para absorção de cobre

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	15,307600	5,102512	3,751	0,030
Resíduo	18	24,480851	1,362156		
CV(%)	69,17				
Média geral	1,68				

Tabela 20A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de cobre na urina

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,015023	0,005012	0,984	0,423
Resíduo	18	0,091963	0,005139		
CV(%)	82,6863				
Média geral	0,035				

Tabela 21A. Análise de variância e coeficiente de variação para retenção de cobre

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	15,040932	5,013633	3,680	0,032
Resíduo	18	24,448512	1,358211		
CV(%)	70,58				
Média geral	1,65				

Tabela 22A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre na pele

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	40,874400	13,624800	2,411	0,100
Resíduo	18	101,574600	5,643000		
CV(%)	43,59				
Média geral	2,29				

Tabela 23A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre na gônada

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	7,936100	2,645400	0,624	0,609
Resíduo	18	76,296300	4,238700		
CV(%)	69,62				
Média geral	2,96				

Tabela 24A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	5,405963	1,802310	0,271	0,846
Resíduo	18	119,719523	6,651120		
CV(%)	28,85				
Média geral	8,94				

Tabela 25A. Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de selênio

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,002812	0,000937	1,126	0,365
Resíduo	18	0,014982	0,000832		
CV(%)	24,67				
Média geral	0,12				

Tabela 26A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de selênio nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,005509	0,001836	7,187k	0,098
Resíduo	18	0,004600	0,000256		
CV(%)	20,63				
Média geral	0,08				

Tabela 27A. Análise de variância e coeficiente de variação para absorção de selênio

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,002325	0,000775	1,910	0,341
Resíduo	18	0,011713	0,000651		
CV(%)	64,58				
Média geral	0,04				

Tabela 28A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de selênio na urina

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,003498	0,001166	18,697	0,000
Resíduo	18	0,001123	0,000062		
CV(%)	49,78				
Média geral	0,01				

Tabela 29A. Análise de variância e coeficiente de variação para retenção de selênio

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,003361	0,001120	1,708	0,040
Resíduo	18	0,011807	0,000656		
CV(%)	78,15				
Média geral	0,024				

Tabela 30A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio na pele

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,343216	0,114398	2,048	0,143
Resíduo	18	1,004600	0,055813		
CV(%)	24,61				
Média geral	0,96				

Tabela 31A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio na gônada

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,113500	0,037821	0,816	0,502
Resíduo	18	0,833974	0,046366		
CV(%)	29,69				
Média geral	0,73				

Tabela 32A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,702851	0,234311	2,556	0,087
Resíduo	18	1,649862	0,091775		
CV(%)	20,61				
Média geral	1,47				

Tabela 33A. Análise de variância e coeficiente de variação para consumo de manganês

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	47,103807	15,701269	2,625	0,082
Resíduo	18	107,654591	5,980811		
CV(%)	20,11				
Média geral	12,17				

Tabela 34A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de manganês nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	49,877077	16,625692	2,453	0,097
Resíduo	18	122,022020	6,779001		
CV(%)	34,67				
Média geral	7,51				

Tabela 35A. Análise de variância e coeficiente de variação para absorção de manganês

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	1,636128	0,545376	0,071	0,975
Resíduo	18	137,712851	7,650714		
CV(%)	59,44				
Média geral	4,65				

Tabela 36A. Análise de variância e coeficiente de variação para excreção de manganês na urina

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,140816	0,046939	1,965	0,155
Resíduo	18	0,429881	0,023882		
CV(%)	84,54				
Média geral	0,11				

Tabela 37A. Análise de variância e coeficiente de variação para retenção de manganês

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	2,145561	0,715187	0,090	0,965
Resíduo	18	142,906803	7,939267		
CV(%)	62,09				
Média geral	4,54				

Tabela 38A. Análise de variância e coeficiente de variação para manganês na pele

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	3	2349,708354	783,236118	2,759	0,072
Resíduo	18	5110,315933	283,906441		
CV(%)	58,25				
Média geral	28,92				

Tabela 39A. Análise de variância e coeficiente de variação para manganês na gônada

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	52,780102	17,593367	0,872	0,474
Resíduo	18	363,371574	20,187310		
CV(%)	4204				
Média geral	10,68				

Tabela 40A. Análise de variância e coeficiente de variação para manganês no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	7,543813	2,514604	0,425	0,737
Resíduo	18	106,620008	5,923334		
CV(%)	38,02				
Média geral	6,4				

Tabela 41A. Análise de variância para peso corporal

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,1746	0,0582	1,0374	0,3876
Erro A	18	1,0102	0,0561		
Período	5	5,7854	1,1571	62,6802	0
Tratamento x período	15	0,2514	0,0168	0,9078	0,5582
Erro B	90	1,6614	0,0185		

Tabela 42A. Análise de variância para comprimento corporal

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,8086	0,2695	0,5169	0,6732
Erro A	18	9,3827	0,5213		
Período	5	41,1542	8,2308	9,5758	0
Tratamento x período	15	11,6114	0,7741	0,9006	0,5659
Erro B	90	77,3592	0,8595		

Tabela 43A. Análise de variância para altura de cernelha

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	0,3307	0,1102	0,9323	0,435
Erro A	18	2,1272	0,1182		
Período	5	3,2084	0,6417	4,2265	0,0017
Tratamento x período	15	2,1835	0,1456	0,9588	0,5044
Erro B	90	13,6642	0,1518		

Tabela 44A. Análise de variância e coeficiente de variação para densidade mineral óssea do úmero

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	2,185900	0,728640	4,879	0,019
Resíduo	12	1,792200	0,149350		
CV (%)	17,5				

Tabela 45A. Análise de variância e coeficiente de variação para densidade mineral óssea do rádio

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	2,590600	0,863530	3,645	0,045
Resíduo	12	2,842800	0,236900		
CV (%)	22,69				

Tabela 45A. Análise de variância e coeficiente de variação para densidade mineral óssea da ulna

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	2,952200	0,984050	5,147	0,016
Resíduo	12	2,294400	0,191200		
CV (%)	21,36	5,246500			

Tabela 46A. Análise de variância e coeficiente de variação para atividade da enzima superóxido dismutase

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	3,401500	1,133800	0,838	0,491
Resíduo	18	24,353200	1,353000		
CV (%)	24,16	27,754700			

Tabela 47A. Análise de variância e coeficiente de variação para atividade da enzima glutationala peroxidase

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	32689,521200	10896,507100	2,422	0,100
Resíduo	18	80975,933300	4498,663000		
CV (%)	1,17				

Tabela 48A. Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de malondialdeído

Efeito	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	3	6,621200	2,207100	0,064	0,978
Resíduo	18	623,708300	34,650500		
CV (%)	32,17				