



JÉSSICA SANTANA DOS REIS

**MICROMINERAIS BIOCOMPLEXADOS EM
DIETAS PARA GATOS EM CRESCIMENTO**

LAVRAS – MG

2016

JÉSSICA SANTANA DOS REIS

**MICROMINERAIS BIOCOMPLEXADOS EM DIETAS PARA GATOS
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 Doutora.

Orientadora

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad

Coorientadores

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo

Dra. Priscila Vieira e Rosa

LAVRAS - MG

2016

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

Reis, Jéssica Santana dos.

Microminerais biocomplexados em dietas para gatos em
crescimento / Jéssica Santana dos Reis. – Lavras : UFLA, 2016.
146 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.
Orientadora: Flávia Maria de Oliveira Borges Saad.
Bibliografia.

1. Desempenho. 2. Felinos. 3. Oligoelementos. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

JÉSSICA SANTANA DOS REIS

**MICROMINERAIS BIOCOMPLEXADOS EM DIETAS PARA GATOS
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 Doutora.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2016.

Dra. Ananda Portella Felix	UFPR
Dr. Antonio Carlos C. Lacrete Junior	UFLA
Dra. Priscila Vieira e Rosa	UFLA
Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA
Dra. Renata Ribeiro Alvarenga	UFLA

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad
Orientadora

LAVRAS - MG

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem sua vontade nada seria possível!

Aos meus pais, José Américo dos Reis Filho (*in memoriam*) e Márcia Stania Santana dos Reis pelo apoio, confiança, educação, amor, preocupação, ajuda e por sacrificar seus objetivos em prol dos meus.

À minha irmã, Jennifer Santana dos Reis, que sempre me apoiou.

Ao meu noivo, Moacyr Brotas Bussular, pelo amor, amizade, compreensão e por abrir mão de muitas oportunidades para estar ao meu lado.

À minha cadela, Bianca, por ser minha amiga, companheira, confidente, meu porto seguro; e à minha gata (e parcela experimental) Mafalda por ter me ensinado a amar os gatos e enxergar como eles são especiais.

A todos os meus familiares que, mesmo longe, sempre estiveram em minha torcida.

À minha orientadora, Flávia Borges, pela orientação.

À Universidade Federal de Lavras que me deu oportunidade para que realizasse o Doutorado.

A todos os professores da Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia e Medicina Veterinária que contribuíram com o meu conhecimento, especialmente, ao meu Coorientador, Márcio Zangerônimo, que me orientou nas inúmeras vezes em que o procurei.

À professora, Izabela Regina Cardoso de Oliveira, do departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras no auxílio às análises estatísticas.

Ao CnPQ pela concessão da bolsa de estudos durante todo o Doutorado e Doutorado sanduíche na Kansas State University, onde vivi os melhores dias da minha vida.

Ao Dr. Sajid Alavi, meu orientador na Kansas State University, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe durante o período em que fiquei no doutorado sanduíche.

À empresa Alltech pelo financiamento deste projeto.

À Rosana Claudio Silva Ogoshi pelo apoio nas horas em que mais precisei, pelas longas conversas e que, além de colegas de trabalho, é uma grande amiga.

A todos os integrantes do NENAC, em especial ao Caíque Argento, Claudine Abreu, Daniel de Souza Dias, Isis Kischka, Ítalo Ferreira, Izadora Alves, Karl William, Luiz Eduardo de Oliveira, Maiara Rodrigues, Maria Alice, Moara Marina, Thaianne da Silva, os quais me ajudaram a concretizar este trabalho e fizeram meus dias mais felizes durante esta longa jornada.

Aos técnicos laboratoristas da Universidade Federal de Lavras (Cristina Ribeiro, Geila Carvalho, João Gualberto e Márcio Nogueira), que contribuíram nas análises químicas deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Everything in life is temporary. So if things are going good, enjoy it because it won't last forever. And if things are going bad, don't worry.

It can't last forever either. (autor desconhecido)

RESUMO GERAL

Estudos em outras espécies sugerem que microminerais proteínatos podem substituir, em menor quantidade, os suplementos inorgânicos em dietas de gatos em crescimento. Desse modo, para a realização do presente estudo, trinta gatos filhotes, aos 80 dias de idade, foram usados com o objetivo de determinar os efeitos de fontes inorgânicas vs. biocomplexadas e diminuição suplementar de cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) biocomplexado no desempenho, parâmetros hematológicos e metabólicos e status mineral por um período de 140 dias. Microminerais inorgânicos (ING) foram comparados a quatro níveis de microminerais biocomplexados (BIO) sob a forma de proteínatos (Bioplex[®]TR Se). A dieta 100%ING foi suplementada com 8,4mgCu/kg (sulfato), 80mg de Fe/kg (sulfato), 4,80mg de Mn/kg (sulfato), 0,30mg de Se/kg (selenito) e 75mg de Zn/kg, com base nas recomendações do National Research Council (NRC). O Bioplex[®]TR Se foi usado como substituto na mesma concentração mineral (100%BIO) ou em menores quantidades (80%BIO, 60%BIO e 40%BIO) nas demais dietas, totalizando cinco tratamentos. Os gatos foram alimentados, durante 140 dias, com as dietas em delineamento inteiramente ao acaso, totalizando 6 repetições por tratamento. Nenhuma diferença ($p>0,05$) foi encontrada entre as fontes ING e BIO, nos seus diferentes níveis, para peso corporal; consumo alimentar diário; altura de cernelha; comprimento corporal; crescimento do pelo; densidade mineral óssea; excreção fecal de Fe e Se; absorção, excreção urinária, retenção e concentração de Cu, Fe e Zn na pele; concentração de Cu, Fe, Se e Zn em gônada; Fe e Zn em pelo; Cu, Fe, Se e Zn em plasma; atividade das enzimas SOD, GPx e fosfatase alcalina; níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA); Fe sérico; concentração de transferrina; capacidade latente e total de ligação do Fe; índice de saturação da transferrina; hemograma (exceto hemoglobina corpuscular média-HCM), leucócitos e linfócitos totais. Foi observada diferença entre as fontes ($p<0,05$) para a concentração de Cu e Zn em fezes; Se absorvido, na urina e pele; concentração de Mn em gônada; Cu, Mn e Se em pelo e atividade da ceruloplasmina. Conclui-se que a suplementação de até 40% da recomendação do NRC (2006) de Cu, Fe, Mn, Se e Zn, sob a forma de proteínato (Bioplex[®]TR Se), durante a fase de crescimento de gatos, não afeta, negativamente, o desempenho, parâmetros metabólicos e status mineral dos mesmos.

Palavras-chave: Desempenho. Felinos. Oligoelementos. Proteínatos.

GENERAL ABSTRACT

Studies with other species suggest that proteinate trace elements can substitute, in small amounts, inorganic supplements in growing cat diets. Thus, for conducting the present study, 30 kittens with 80 days of age were used in order to determine the effects of inorganic vs. bio-complexed sources and the supplement decrease of bio-complexed copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), selenium (Se) and zinc (Zn) over performance, hematological and metabolism parameters and mineral status, for a period of 140 days. Inorganic trace elements (ING) were compared to four levels of bio-complexed minerals (BIO) under the form of proteinates (Bioplex[®]TR Se). The diet 100%ING was supplemented with 8.4 mg Cu/kg (sulfate), 80 mg of Fe/kg (sulfate), 4.8 mg of Mn/kg (sulfate), 0.30 mg Se/kg (selenite) and 75 mg of Zn/kg, based on recommendations of the National Research Council (NRC). The Bioplex[®]TR Se was used as substitute in the same mineral concentrations (100%BIO) or in smaller amounts (80%BIO, 60%BIO and 40%BIO) in the remaining diets, totalizing five treatments. The kittens were fed the diets during 140 days in a completely randomized design, totalizing six replicates per treatment. No difference ($p>0.05$) was observed between the ING and BIO sources for body weight, regarding the different levels; daily food intake; withers height; body length; fur growth; mineral bone density; fecal excretion of Fe and Se; absorption, urinary excretion, retention and skin concentration of Cu, Fe and Zn; concentration of Cu, Fe, Se and Zn in the gonad; Fe and Zn in the fur; Cu, Fe, Se and Zn in the plasma; activity of the enzymes SOD, GPx and alkaline phosphatase; plasma levels of malondialdehyde (MDA); serum Fe; concentration of transferrin; latent capacity and total Fe linkage; transferrin saturation index; blood count (except for mean corpuscular hemoglobin – MCH), leucocytes and total lymphocytes. We verified difference between the sources ($p<0.05$) for the concentration of Cu and Zn in feces; absorbed Se, on urine and skin; concentration of Mn in the gonad; Cu, Mn and Se in the fur; and ceruloplasmin activity. In conclusion, supplementation of up to 40% of the levels of Cu, Fe, Mn, Se and Zn recommended by the NRC (2006), in the form of proteinate (Bioplex[®]TR Se), during the growth phase of cats, does not negatively affect their performance, metabolic parameters and mineral status.

Keywords: Performance. Felines. Oligo-elements. Proteinates.

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para gatos filhotes.	57
Tabela 2	Quantidades suplementares de microminerais das fontes inorgânicas (ING) ou biocomplexada (BIO) utilizadas experimentalmente em dietas para gatos filhotes.	58
Tabela 3	Quantidade de microminerais de fonte inorgânica (ING) e biocomplexada (BIO) nas dietas experimentais para gatos filhotes e premixes após análise laboratorial.	58
Tabela 4	Peso corporal (PC) e consumo alimentar diário (CAD) de gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.	64
Tabela 5	Altura de cernelha (AC), comprimento corporal (CC) e crescimento de pelo (CP) de gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.	65
Tabela 6	Densidade mineral óssea (em milímetro de alumínio – mmAl) de gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.	66
Tabela 7	Concentração de cobre em amostras coletadas em gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de cobre BIO.	67

Tabela 8	Regressão do percentual de suplementação do biocomplexo vs. concentração do mineral em amostras coletadas em gatos filhotes suplementados com diferentes níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.	68
Tabela 9	Concentração de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) no plasma de gatos filhotes em jejum (0h), 2 e 6h após a alimentação com diferentes concentrações desses elementos de fonte inorgânica (ING) e biocomplexada (BIO).	70
Tabela 10	Concentração de ferro em amostras coletadas em gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de ferro.	73
Tabela 11	Concentração de manganês em amostras coletadas em gatos filhotes alimentados com fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de manganês BIO.	74
Tabela 12	Concentração de selênio em amostras coletadas em gatos filhotes alimentados com fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de selênio BIO.	76
Tabela 13	Concentração de zinco em amostras coletadas em gatos filhotes alimentados com fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis suplementares de zinco BIO.	78

ARTIGO 2

Tabela 1	Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para gatos filhotes.	108
Tabela 2	Quantidades suplementares de microminerais de fontes inorgânicas (ING) ou biocomplexadas (BIO) utilizadas experimentalmente em dietas para gatos filhotes.	109

Tabela 3	Quantidade de microminerais de fonte inorgânica (ING) e biocomplexada (BIO) nas dietas experimentais para gatos filhotes e premixes após análise laboratorial.	109
Tabela 4	Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) e cocntração de dialdeído malônico (MDA) de gatos filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.....	114
Tabela 5	Atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA) e ceruloplasmina (CP) de gatos filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.....	114
Tabela 6	Capacidade de ligação do ferro (ferro sérico, concentração de transferrina, capacidade latente de ligação do ferro - CLLFe, capacidade total de ligação do ferro - CTLFe, índice de saturação da transferrina - IST) de gatos em crescimento, alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.....	116
Tabela 7	Contagem de hemácias, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos totais e linfócitos totais de gatos em crescimento alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.....	117

LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS

BIO	Biocomplexado
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLLFe	Capacidade latente de ligação do ferro
CTLFe	Capacidade total de ligação do ferro
Cu	Cobre
FA	Fosfatase alcalina
Fe	Ferro
GPx	Glutathiona peroxidase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
ING	Inorgânico
IST	Índice de saturação da transferrina
MDA	Dialdeído malônico
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MS	Matéria seca
NRC	<i>National Research Council</i>
SAS	<i>Statistical Analysis Software</i>
Se	Selênio
SOD	Superóxido dismutase
VCM	Volume corpuscular médio
Zn	Zinco

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 14
2	REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1	Microminerais biocomplexados 19
2.2	Cobre 23
2.3	Ferro 28
2.4	Manganês 30
2.5	Selênio 32
2.6	Zinco 36
	REFERÊNCIAS 41
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 50
	ARTIGO 1 Efeito da suplementação de microminerais inorgânicos e biocomplexados no desempenho e estado mineral de gatos filhotes 50
	ARTIGO 2 Suplementação de microminerais inorgânicos e biocomplexados na atividade de metaloenzimas, metabolismo de ferro e índices hematológicos e imunológicos de gatos em crescimento 102
	ANEXOS 131

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Para a obtenção de uma boa nutrição, é necessário que o animal receba quantidades adequadas de nutrientes, incluindo os minerais, os quais são considerados de grande importância para cães e gatos, uma vez que participam de todos os processos bioquímicos corporais. De forma geral, os minerais são importantes na formação dos ossos, na manutenção do equilíbrio acidobásico (pH) do sangue, no balanço de água corporal, pressão osmótica, excitação de neurônios e músculos, regulação da permeabilidade das membranas, transporte de nutrientes pela membrana, além de fazerem parte da composição de inúmeras enzimas.

Os minerais são divididos entre macrominerais, associados à grande inclusão na dieta e microminerais, associados à pequena inclusão na dieta. Ainda que os macrominerais sejam, na maioria das vezes, de maior abordagem nutricional, não se deve esquecer que os microminerais, também, desempenham diversas funções no organismo, que são de vital importância para o crescimento adequado dos animais e na manutenção das vias metabólicas.

Embora estejam presentes na maioria dos ingredientes, a quantidade e biodisponibilidade deles variam consideravelmente. Diante disso, esses elementos são, tradicionalmente, incluídos na dieta, na forma de premix de sais inorgânicos, mas, ainda assim, podem ter aproveitamento reduzido quando ingerido pelo animal. Dessa forma, tem-se sugerido o uso de microminerais biocomplexados (assim denominados por serem constituídos por íons metálicos ligados a substâncias orgânicas), uma vez que melhoram a absorção, disponibilidade e estabilidade física do mineral quando comparado aos sais inorgânicos. Mesmo produzidos desde a década de 70 pelas indústrias

brasileiras, a utilização dos minerais biocomplexados na nutrição animal é recente e a discussão de sua importância está baseada em suas ações específicas nas células e sua maior biodisponibilidade em relação a fontes inorgânicas. O principal obstáculo, para seu uso em larga escala pelas indústrias de alimentos para animais, ainda, é o alto custo em relação aos microminerais inorgânicos. Entretanto, em virtude de sua maior biodisponibilidade, menor quantidade pode ser adicionada à dieta, sem qualquer efeito negativo sobre o desempenho, contribuindo, potencialmente, para a redução da excreção de minerais no ambiente, mas também com custo equivalente ao de microminerais inorgânicos.

Objetivou-se, com o presente estudo, determinar os efeitos da substituição de microminerais inorgânicos (Cu, Fe, Mn, Se e Zn) por microminerais proteínatos, bem como sua redução, em dietas de gatos em crescimento, sobre o desempenho, parâmetros hematológicos e metabólicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os minerais são elementos essenciais para processos metabólicos corporais. Um sistema de classificação geral divide esses nutrientes em macro e microminerais. Por definição, macrominerais são requeridos pelos animais, na dieta em valores percentuais, sendo os responsáveis pela maior parte do conteúdo mineral do organismo. Já os microminerais, também denominados minerais traço ou oligoelementos, são necessários em mg/kg ou partes por milhão (ppm), ou seja, em quantidades muito pequenas na dieta, estando também presentes no organismo em concentrações muito baixas (CASE et al., 2010). Há sete macrominerais (cálcio, fósforo, sódio, magnésio, potássio, cloro e enxofre) e ao menos onze oligoelementos (ferro, zinco, cobre, iodo, selênio, manganês, cobalto, molibdênio, flúor, boro e cromo). No presente estudo, os macrominerais não serão abordados e, dos microminerais, somente o cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) serão discutidos, por terem sido avaliados.

A função primária dos elementos traço tem sido considerada como moduladora da atividade de enzimas, em particular alterando a atividade daquelas que estão envolvidas no metabolismo da maioria dos nutrientes, como carboidratos, aminoácidos e lipídeos. Além disso, tem sido também cada vez mais discutido seu papel estrutural em componentes celulares, como em membrana celular e núcleo (SHENKIN, 1993). Sendo assim, por se tratar de grande número de elementos com as mais diversas e complexas funções, os sinais clínicos decorrentes do seu desequilíbrio na dieta não são específicos (ARAÚJO et al., 2008), podendo os sintomas serem confundidos até mesmo com aqueles causados por deficiência energética e proteica ou por doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários (VEIGA; CARDOSO, 2005).

O tipo e o tempo de desenvolvimento de sinais e sintomas de deficiência podem ser diferentes entre os microminerais. A deficiência nutricional pode ser classificada como do tipo I ou II. A do tipo I é caracterizada como redução na concentração tecidual do nutriente e um defeito nas vias metabólicas específicas, em que existe perda de função com a presença de sinais clínicos específicos, mas não há efeito primário sobre o crescimento. O atraso no desenvolvimento da deficiência leva em consideração o número de variáveis que afetam o metabolismo do mineral, o que inclui o *turnover* no tecido e o seu controle homeostático. Entretanto, quando a deficiência se desenvolve, ela é relativamente fácil de diagnosticar clínica e bioquimicamente. Como exemplo, esse pode ser o caso da deficiência de Fe, que pode desenvolver ao longo de várias semanas; de Cu, ao longo de vários meses; e de Se, em meses ou anos. A deficiência do tipo II apresenta-se com a redução primária ou cessação do crescimento sem a redução na concentração tecidual do elemento. Isto não seria normalmente associado com sinais clínicos específicos, assim, é normalmente difícil de ser diagnosticada. A deficiência do Zn pode se enquadrar nessa situação (SHENKIN, 1993).

Segundo Underwood e Suttle (1999), um modelo geral de eventos fisiopatológicos, durante o esgotamento mineral, pode ser descrito e auxilia no diagnóstico diferencial de alterações decorrentes do desequilíbrio de minerais. Esse modelo divide os eventos em quatro fases. A primeira fase “depleção” ocorre quando estoques de armazenamento do mineral são reduzidos. Na segunda fase, “deficiência”, os estoques de transporte do mineral são reduzidos. Na terceira fase, “disfunção”, as funções dependentes de minerais tornam-se limitantes para uma via metabólica particular. E a quarta “doença”, em que anormalidades clínicas são visualmente aparentes. Vale ressaltar que, para elementos com armazenamento pequeno ou mobilizados lentamente, como, por exemplo, o Cu e Zn, as fases 1 e 2 são sobrepostas ou interpostas.

Os ingredientes usados na produção de alimentos pet, tais como milho, trigo, farelo de soja, dentre outros, contêm oligoelementos que são necessários a animais; no entanto, estes são, muitas vezes, indisponíveis. Além disso, mesmo se os elementos fossem totalmente disponíveis, em muitos casos, eles não estariam em concentrações adequadas para atender a exigência do animal (MILES; HENRY, 2000). Dessa forma, torna-se necessária a suplementação, a qual é feita por meio da adição de premix mineral, seja ele inorgânico ou biocomplexado.

A absorção de microminerais inorgânicos é, na maioria das vezes, o maior limitante da sua utilização. O transporte de íons metálicos para o interior das células intestinais se dá pela difusão passiva ou transporte ativo, a depender da demanda do organismo. No caso do transporte ativo, o qual ocorre com maior frequência e que se faz necessário o transportador de membrana, o íon pode não se ligar ao transportador por este estar ligado a outro íon que compete pelo mesmo mecanismo de transporte ou pelo fato do íon estar ligado a outra molécula, como, por exemplo, o fitato. A ligação do mineral a outras moléculas é decorrente da dissociação dos minerais em ambiente de baixo pH, deixando-os susceptíveis à formação de complexos insolúveis com outros componentes da digesta (ACDA; CHAE, 2002; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Na tentativa de aumentar a disponibilidade para o animal, observa-se, na prática, que os níveis de minerais fornecidos nas dietas são geralmente superiores aos mínimos exigidos (RUTZ; PANE; XAVIER, 2007). Porém, a suplementação extra pode causar diarreia e desequilíbrios associados à redução da disponibilidade de outros minerais e aumento da poluição ambiental pelos elementos (LEESON; SUMMERS, 1997). Já os microminerais biocomplexados usam as vias de absorção das moléculas orgânicas que os ligam e não transportadores intestinais clássicos de minerais, evitando a competição entre minerais pelos mesmos mecanismos de absorção (RUTZ; PANE; XAVIER, 2007).

Ainda assim, embora sejam absorvidos, os microminerais inorgânicos podem não ser utilizados, o que torna suas biodisponibilidades reduzidas (ACDA; CHAE, 2002). O termo biodisponibilidade tem sido, então, definido como o grau com que um nutriente ingerido a partir de uma determinada fonte é absorvido em uma forma que possa ser utilizado no metabolismo do animal (AMMERMAN; BAKER; LEWIS, 1995).

Considerando-se esses princípios relacionados aos microminerais inorgânicos, tem sido crescente o interesse em determinar os fatores que aumentam a absorção ou metabolização dos elementos traço. Nesse sentido, as fontes organicamente complexadas, ou biocomplexadas, têm sido utilizadas devido à hipótese de serem mais biodisponíveis (KEIFER, 2005; SECHINATO; ALBUQUERQUE; NAKADA, 2006).

2.1 Microminerais biocomplexados

Os minerais biocomplexados são o resultado do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante. O ligante é a substância orgânica a qual está ligada ao metal (LEESON; SUMMERS, 1997), sendo este geralmente um ânion ou uma molécula que tenha um átomo com um par de elétrons em valências disponíveis (VIEIRA, 2004). A *Association of American Feed Control Officials* (ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS, 2007), que define as normas e padrões dos alimentos destinados à produção animal, classificam os minerais biocomplexados da seguinte forma:

- a) Complexo metal-aminoácido: é o produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido. Um exemplo é o complexo ferro aminoácido (Fe-aminoácido).

- b) Complexo metal-aminoácido específico: é o produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido específico. Exemplos desse complexo são zinco-metionina (Zn-Met), zinco-lisina (Zn-Lis), manganês-metionina (Mn-Met) e cobre-lisina (Cu-Lis).
- c) Metal proteínato: é o produto resultante da quelação de um sal metal solúvel com aminoácidos e/ou proteína parcialmente hidrolisada.
- d) Complexo metal polissacarídeo: é o produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com uma solução de polissacarídeos. Um exemplo é o complexo Zn-polissacarídeo.
- e) Quelato metal aminoácido: é o produto resultante da reação de um íon metálico obtido de um sal metálico solúvel com aminoácidos na relação de um mol de metal para um a três moles de aminoácidos formando ligações covalentes coordenadas.

Os minerais organicamente complexados podem ser sintetizados por meio de um processo biossintético, como é o caso da selenometionina, a partir de uma cultura de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) enriquecida com Se inorgânico. A semelhança química entre o Se e o enxofre favorece a incorporação do Se em substituição ao enxofre na metionina ou cisteína pela levedura durante a formação dos compostos celulares (RUTZ; PANE; XAVIER, 2007). A adição de sais de Se solúveis em água, por exemplo, o selenito, como um componente do meio de cultura de levedura resulta em quantidade significativa de Se absorvida pela levedura (SUHAJDA et al., 2000), com consequente conversão do selenito a uma espécie bioativa altamente segura com melhores propriedades nutricionais (CREWS et al., 1996).

O desenvolvimento industrial e o marketing sobre os microminerais biocomplexados são feitos, em grande parte, baseados na teoria da sua maior

biodisponibilidade ou da maior similaridade às formas que ocorrem no organismo do animal, já que os microminerais estão no corpo e exercem sua função quase que completamente como complexos ou quelatos orgânicos e não como íons inorgânicos livres. A indústria preconiza, ainda, que essa forma de mineral apresenta maior solubilidade, estrutura química estável e natureza eletricamente neutra na passagem pelo trato gastrointestinal, portanto não participam de reações que o transformariam em íon metálico livre e, conseqüentemente, em complexos insolúveis indesejáveis. Ainda assim, a molécula manteria a estrutura íntegra até a chegada ao local de absorção e pode estimular certos processos biológicos ou pode estar presente em compartimentos no organismo diferentemente das formas inorgânicas (SPEARS, 1996).

Os minerais biocomplexados são conhecidos, também, por usarem as vias de absorção das moléculas orgânicas que os ligam e não transportadores intestinais clássicos de minerais, evitando a competição entre os elementos pelos mesmos mecanismos de absorção (RUTZ; PANE; XAVIER, 2007). A absorção dos minerais quelatados pode, portanto, ocorrer de duas formas: ligado à borda em escova, sendo absorvido pela célula epitelial, ou ainda pela absorção do agente ligante, o qual carrega consigo o metal (KRATZER; VOHRA, 1996).

Embora todo o marketing sobre os microminerais biocomplexados tenha sido desenvolvido, esses pontos, ainda, são controversos, uma vez que, ainda, há estudos em outras espécies, como em suínos e aves, em que se relataram pequena ou nenhuma diferença na biodisponibilidade entre as fontes organicamente complexadas comparado à inorgânica (RICHARDS et al., 2010; SCHIAVON et al., 2000). Mas esses resultados contrastantes, também, podem ser resultado de alguns minerais organicamente complexados não serem hábeis em permanecerem quelatados ou complexados no ambiente de baixo pH no trato gastrointestinal (GI) anterior (BROWN; ZERINGUE, 1994; GUO et al., 2001), pelo fato de diferenças na biodisponibilidade poderem ser mascaradas pelo

delineamento experimental (RICHARDS et al., 2010); ou até mesmo devido à variabilidade das características químicas dos complexos de metais utilizados. Um exemplo desse último caso são os proteinatos comerciais que diferem consideravelmente no grau de hidrólise proteica e perfil de aminoácidos conforme a fonte proteica usada e os processos de fabricação (SCHIAVON et al., 2000).

Considerando a possibilidade da sua maior biodisponibilidade, acredita-se que os minerais organicamente complexados podem substituir as fontes inorgânicas em níveis mais baixos, mantendo as funções fisiológicas e taxa de crescimento em animais jovens e, ainda assim, possibilitando a redução da poluição ambiental por minerais (BAO et al., 2007). No entanto, o nível ideal de sua redução, nas dietas de animais, em especial ao que diz respeito a cães e gatos, é inexistente, já que os estudos nessas espécies, ainda, estão sendo realizados visando comparar o desempenho das fontes biocomplexadas em relação às inorgânicas de cada micromineral isoladamente.

Nenhum estudo em gatos e apenas um estudo em cães foi encontrado comparando fontes biocomplexadas e inorgânicas de um conjunto de microminerais sobre o desenvolvimento do animal. Kuhlman e Rompala (1998), comparando Cu, Mn e Zn quelatado e inorgânico, em cadelas em gestação e lactação, assim como nos filhotes nascidos, não relataram diferença significativa no peso corporal e concentração dos minerais no pelo das cadelas; bem como na taxa de crescimento dos filhotes. Entretanto, em imagens obtidas por microscopia de varredura foi revelado que os animais suplementados com o quelato apresentaram pelos mais suaves e menos fragmentados.

Já, em outras espécies de não ruminantes, têm sido realizados estudos não somente comparando os efeitos das fontes dos elementos traço, mas, sim, o desempenho dos animais frente à redução da suplementação de um conjunto de microminerais, quando eles estão sob a forma organicamente complexada. Em

frangos de corte, Leeson (2003) relatou a possibilidade de redução em 30% da fração mineral, na forma biocomplexada, sem alterar o desempenho dos animais. Da mesma forma, Fremaunt (2005) relatou que os melhores resultados de desempenho dos suínos foram obtidos quando o Cu, Fe, Mn e Zn foram reduzidos em 30% dos níveis normais e adicionados na forma de biocomplexo. Já Burkett et al. (2005) verificaram que os melhores resultados foram obtidos, quando houve redução de 50% dos níveis normais dos minerais traços, que foram adicionados na forma de biocomplexo na dieta de suínos.

Em suínos, as conclusões dos estudos são de que a absorção mais eficiente de minerais organicamente complexados, em comparação com os minerais, a partir de fontes inorgânicas, potencialmente, reduz as quantidades de minerais suplementares necessários para a produção ótima suína, sem afetar negativamente o desempenho dos animais ao longo do desenvolvimento (CREECH et al., 2004). Além disso, reduz as concentrações de minerais em dejetos, reduzindo o seu impacto sobre o meio ambiente (ASHMEAD; SAMFORD; ASHMEAD, 2008; CREECH et al., 2004).

2.2 Cobre

O organismo de cães e gatos apresenta quantidade muito pequena de Cu. Em gatos foi relatada a quantidade de 2 e 3mg/kg de peso corporal, em filhotes e adultos, respectivamente (KIENZLE; STRATMANN; MEYER, 1991), enquanto em cães encontrou-se a quantidade de 3,8 e 7,3mg/kg de peso corporal em recém-nascidos e adultos jovens, respectivamente (MEYER, 1984). O Cu é necessário à respiração celular, formação dos ossos, função cardíaca, desenvolvimento de tecido conectivo, mielinização da medula espinhal, queratinização e pigmentação da pele, por ser componente essencial de diversas

enzimas importantes fisiologicamente, tais como monoamina oxidase, lisil oxidase, ferroxidase e citocromo oxidase (MCDOWELL, 1992).

O metabolismo e as funções desse mineral estão intimamente ligados às do Fe, uma vez que o Cu desempenha papel importante na absorção e mobilização desse elemento. Desse modo, níveis séricos de Fe tendem a ser menores na deficiência de Cu. A ceruloplasmina, uma glicoproteína sintetizada no fígado e contendo seis átomos de Cu por molécula, é necessária para a oxidação do Fe, permitindo que esse se ligue a proteína transportadora de Fe, transferrina (MCDOWELL, 1992). Ou seja, para ser armazenado como ferritina ou para ser transportado pela transferrina, o Fe deve ser convertido à forma Fe^{3+} (CURZON, 1961), reação realizada pela ceruloplasmina.

Dependendo da espécie animal, o Cu pode ser absorvido em todos os segmentos do trato gastrintestinal, embora locais, na porção cranial do intestino delgado, pareçam desempenhar maior papel na absorção desse elemento. Verifica-se, também que, geralmente, não mais do que 5-10% do Cu dietético é absorvido por animais adultos, enquanto animais jovens podem absorver de 15-30%. Assim como outros minerais, sua absorção intestinal é influenciada pela sua forma química e pelas interações com outros fatores dietéticos, de forma que fitatos, altos níveis de cálcio (Ca), Fe, Zn, cádmio (Cd) ou molibdênio (Mo) reduzem a absorção (MCDOWELL, 1992).

A homeostase é afetada pelo controle da taxa de absorção, que, por sua vez, é regulada pela mucosa intestinal. Há evidência de que a absorção do Cu é regulada pela necessidade do organismo e que a metalotioneína nas células intestinais pode desempenhar papel crucial na regulação. Alta ingestão de Zn pode inibir a absorção do Cu, uma vez que estimula a produção de metalotioneína, o que bloqueia a absorção transcelular de Cu. Já, quando a ingestão de Cu é alta, não ocorre redução da absorção do Zn, embora também

induza a produção de metalotioneína. Isso porque o Zn é um indutor mais forte da metalotioneína comparado ao Cu (LEONE; PAVLAKIS; HAMER, 1985).

Depois da absorção no intestino, o Cu é ligado à albumina sérica e transportado até o fígado, onde é incorporado à ceruloplasmina, sendo posteriormente levado aos tecidos pela circulação (SILVA; MURA, 2010). A ceruloplasmina é o transportador de Cu a partir do fígado para tecidos alvos, sendo capaz de transportar até seis átomos em cada molécula. O fígado é o órgão de maior armazenamento desse mineral, bem como é o órgão central do seu metabolismo, de modo que a concentração desse mineral reflete sua ingestão e o estado no organismo (CASE et al., 2010). Embora o fígado seja o principal órgão homeostático e tenha um teor elevado desse mineral, seus níveis no soro e na urina não se correlacionam bem com a concentração de Cu hepático (EVANS; NEWMAN; SHERLOCK, 1978), mascarando, possivelmente, a deficiência (BURKHEAD; LUTSENKO, 2013). Sua excreção é primariamente através das fezes, sendo o excesso desse mineral excretado na bile (CASE et al., 2010). Quantidades intermediárias são excretadas através da urina e leite (MCDOWELL, 1992).

A deficiência de Cu pode afetar múltiplos órgãos (fígado, coração, intestino, cérebro), entretanto, o fígado e o sistema cardiovascular parecem ser mais profundamente comprometidos. Além disso, essa carência tem sido conhecida por alterar o metabolismo lipídico embora os mecanismos moleculares que determinam o efeito sobre o colesterol sérico ainda não foram investigados detalhadamente (BURKHEAD; LUTSENKO, 2013).

Em humanos consumindo dietas, contendo baixo teor de Cu, foi observada redução da ceruloplasmina e de atividade da superóxido dismutase (SOD) em enterócitos, assim como elevação no colesterol sérico, parâmetro esse mais sensível aos níveis de Cu do que alterações hematológicas (KLEVAY et al., 1984). Estas observações sugerem que os níveis desse mineral podem ser

fatores dietéticos modificadores significativos nos distúrbios associados ao desequilíbrio de lipídeos. Em humanos adultos com doença cardiovascular, a suplementação com o mineral aumentou a atividade de duas enzimas Cu-dependentes, a SOD eritrocitária e ceruloplasmina, e reduziu níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) séricos (DISILVESTRO et al., 2012)

Al-Othman, Rosenstein e Lei (1994) observaram menor peso corporal, hematócrito e concentração hepática, renal e cardíaca de Cu, bem como aumento na concentração plasmática de colesterol e triacilgliceróis de ratos alimentados com dieta deficiente e com teor mínimo do mineral após sete semanas.

Em gatos filhotes, Doong et al. (1983), no primeiro ensaio, em que testaram os níveis de 1,98 (dieta basal); 2,60; 5,06 e 9,64 μ g de Cu/g de alimento, observaram que animais alimentados com dieta suplementada com Cu (sulfato de Cu) cresceram em ritmo ligeiramente mais rápido do que aqueles alimentados com a dieta basal, embora não tenha ocorrido diferença significativa na ingestão alimentar. Também não foi observada diferença significativa no hematócrito durante o período de 10 semanas. Sinais de deficiência de Cu foram evidentes devido à observação na redução da atividade de SOD (Cu, Zn-SOD) e relativa diminuição na concentração do mineral no fígado dos filhotes alimentados com a dieta basal, quando comparados àqueles suplementados.

Em um segundo ensaio, analisando os níveis 0,58 (basal); 1,98; 3,62; 5,92; 9,84 μ g de Cu/g de dieta, Doong et al. (1983) relataram que filhotes de gato alimentados com dieta contendo pelo menos 3 μ g de Cu/g cresceram mais rapidamente. A ingestão de alimentos não foi significativamente diferente entre os grupos; e os valores de hematócrito variaram entre 26-36% independente da ingestão do mineral. Durante o período de 10 semanas, os valores de Cu plasmáticos de filhotes alimentados com a dieta contendo 9,84 μ g Cu/g substancialmente aumentaram (2 a 3 vezes). A concentração desse elemento no fígado foi menor com a dieta basal. Com relação à forma biocomplexada, tem

sido reportado maior deposição de Cu em fígado de ratos alimentados com Cu-proteinato e Cu-lisina quando comparado a sulfato (DU et al., 1996).

Sinais de deficiência em gatos inclui pior eficiência reprodutiva, perda fetal precoce, deformidades fetais, canibalismo, hipopigmentação do pelo, cauda torcida e carpo torcido (WEDEKIND et al., 2010). A deficiência resulta no metabolismo anormal ósseo e anormalidades esqueléticas, não devido à alteração no metabolismo de cálcio ou mineralização óssea, mas, sim, devido à formação incompleta da matriz de colágeno do osso, decorrente da reduzida atividade da enzima lisil oxidase, a qual contém o Cu em sua composição (RUCKER et al., 1996). Desse modo, a perda da atividade dessa enzima resulta em menor força e estabilidade do colágeno do osso (GRIDER, 2006). Podem, também, ser observados neutropenia (falta de circulação de neutrófilos/granulócitos) (PERCIVAL, 1995), bem como menor número de linfócitos T (FAILLA; HOPKINS, 1997). Evidências preliminares sugerem que a perda de linfócitos e neutrófilos resulta da reduzida produção de novas células em vez da morte excessiva ou precoce de células existentes (GRIDER, 2006).

A determinação da sua concentração no sangue ou no plasma reflete o estado do mineral, embora o intervalo de referência seja bastante amplo. Todd (1970) relatou que a estimativa de ceruloplasmina fornece vantagem sobre determinações de Cu no plasma ou sangue total. A enzima SOD pode ser, também, importante sinalizador do estado do mineral no organismo. Em ratos, suínos e pintos, a atividade da SOD é severamente deprimida na deficiência do mineral (DISILVESTRO; MARTEN, 1990; O'DELL, 1984). Em humanos foi observado que ceruloplasmina e citocromo C oxidase, em plaquetas e células mononucleadas brancas, foram indicadores mais sensíveis do estado do mineral do que a concentração no plasma e a atividade da SOD (MILNE; KLEVAY; HUNT, 1988).

2.3 Ferro

No organismo do animal, o Fe é o mineral traço mais abundante, compondo cerca de 0,005% do peso corporal total (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006), embora sua quantidade no animal sofra variações do nascimento à maturidade. Aproximadamente 67% desse mineral são encontrados na hemoglobina, 27% em macrófagos, 4% no músculo como mioglobina e o restante em várias enzimas, com pequena quantidade na forma instável (CASE et al., 2010). É um cofator essencial de várias enzimas, particularmente as que envolvem reações de oxidação-redução e o transporte do oxigênio (CHERUKURI et al., 2005). O grande desafio, para a maioria dos organismos, é a aquisição de quantidades adequadas desse mineral para os processos biológicos críticos, evitando problemas associados com o Fe livre (ANDREWS; SCHIMIDT, 2007) como, por exemplo, a formação de radicais livres pela reação de Fenton, que ocorre quando o Fe excessivo reage com oxigênio, gerando radicais hidroxil. Mas, para alcançar níveis apropriados desse elemento na célula e evitar sobrecarga, proteínas de transporte, de armazenamento e regulatórias estão envolvidas (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2006).

Não existe nenhuma via fisiológica, para excreção do excesso desse elemento (MCCOWN; SPECHT, 2011), portanto, sua homeostase plasmática é mantida por estreita regulação da absorção no intestino e liberação dos locais de armazenamento no baço e fígado, principalmente em resposta a alterações agudas na necessidade desse mineral (CHERUKURI et al., 2005). Diminuição na absorção e disponibilidade plasmática são observadas na sobrecarga e quadros inflamatórios, ao passo que o aumento pode ser observado em resposta à deficiência do mineral, eritropoiese acelerada e hipóxia (ANDREWS, 2005).

Muito pouco é adquirido a partir da absorção intestinal (ANDREWS, 2005) e a principal fonte consiste na reciclagem dentro do organismo. Os

eritrócitos velhos e danificados são fagocitados por macrófagos, principalmente no baço, de modo que a porção heme é catabolizada pela heme oxigenase à biliverdina e, subsequentemente, à bilirrubina, a qual é secretada na bile e excretada do organismo, ao passo que o Fe retorna à circulação ligada à transferrina (ANDREWS; SCHMIDT, 2007; SILVA; MURA, 2010). A quantidade do mineral que passa através deste sistema de reciclagem de macrófagos todos os dias se aproxima do valor necessário para a eritropoiese (ANDREWS, 2005).

O Fe, ao ser absorvido, é rapidamente ligado à proteína carreadora de alta afinidade, denominada transferrina (ANDREWS; SCHMIDT, 2007), para ser transportada pelo organismo entregando o mineral às células ou à medula óssea (SILVA; MURA, 2010). Essa proteína liga dois átomos de Fe, mantendo-o solúvel e impedindo que o íon Fe^{3+} precipite no plasma, assim como também evita sua reação com outras moléculas, atenuando sua atividade redox (ANDREWS, 2005). Sob circunstâncias normais, a transferrina transporta quase todo o Fe no soro. Quantidades muito pequenas, também, podem ser vagamente associadas com albumina ou moléculas pequenas (ANDREWS; SCHMIDT, 2007). Em humanos saudáveis, o mineral ocupa cerca de 30% dos locais de ligação na transferrina no plasma. Em ratos, a saturação da transferrina é mais elevada, tipicamente variando de 60% a 80%, mas observa-se que essa saturação pode variar em um ciclo diurno (UCHIDA et al., 1983) e rapidamente responde às circunstâncias locais (ANDREWS; SCHMIDT, 2007).

O excesso é armazenado como ferritina e hemossiderina no fígado, medula óssea e baço (FAIRWEATHER-TAIT; HURRELL, 1996), de modo que a concentração de ambas reflete o estado do mineral no animal (MC DOWELL, 1992). A ferritina é um polímero com a função de aceitar o excesso do elemento e permitir a mobilização, quando necessário, com a capacidade de acomodação de até 4500 átomos de Fe (ANDREWS; SCHMIDT, 2007). Embora os

enterócitos tenham capacidade de armazenar o mineral proveniente da dieta, eles não são considerados como parte do sistema de armazenamento, uma vez que o Fe que eles retêm deixa o corpo quando as células senescem e são descartadas para dentro do lúmen intestinal (ANDREWS, 2005). Na urina, quantidades insignificantes podem ser detectadas e, nas fezes, é predominantemente decorrente da não absorção ou descamação de células epiteliais, porém é continuamente perdido no suor, pelo e unhas (WEDEKIND et al., 2010).

A deficiência causa anemia, pelo áspero, apatia e redução no crescimento. O tipo de anemia é microcítica hipocrômica, no entanto, anemia hipocrômica pode ocorrer, também, quando a quantidade total de Fe do organismo está normal. Em humanos e animais se observa que, na anemia por deficiência de Fe, as células vermelhas têm menor tamanho e contêm menor quantidade de hemoglobina que o normal. Entretanto, valores de hemoglobina e hematócrito não são indicadores sensíveis da deficiência de Fe precoce, sendo úteis somente quando o estoque do mineral é severamente deprimido (MCDOWELL, 1992). A porcentagem de saturação de transferrina é o melhor método de avaliação da deficiência na eritropoiese decorrente da carência de Fe (UNDERWOOD, 1977). Via de regra, na deficiência desse mineral, pode ser observada reduzida saturação da transferrina e baixos níveis de Fe sérico e de hemoglobina (MCDOWELL, 1992).

2.4 Manganês

Assim como outros microminerais, o Mn funciona como um ativador de enzima ou como um constituinte de metaloenzimas. Embora existam somente poucas metaloenzimas contendo esse mineral, dentre elas arginase, piruvato carboxilase e SOD, muitas enzimas são ativadas por Mn, incluindo hidrolases, quinases, descarboxilases e transferases. Trata-se de um mineral essencial ao

desenvolvimento dos ossos e cartilagem, uma vez que exerce papel crucial no desenvolvimento dos ossos (MCDOWELL, 1992), além de estar envolvido na reprodução e metabolismo lipídico, este último justificado pela sua participação na biossíntese de colina e colesterol (CASE et al., 2010; WEDEKIND et al., 2010). Relata-se que a distribuição desse elemento é razoável e uniforme, em todos os tecidos, com talvez maior concentração no fígado e ossos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

Cerca de 1-5% do Mn ingerido é absorvido normalmente. Sua absorção no trato gastrintestinal é influenciada por alguns fatores, tais como a concentração na dieta, eliminação através da bile, presença de outros minerais e fitatos (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Há relato em humanos que a absorção desse elemento é elevada durante o período neonatal (KEEN; BELL; LONNERDAL, 1986) e que, comparado a adultos, bebês têm maior retenção de manganês durante o período neonatal inicial (ZLOTKIN; ATKINSON; LOCKITCH, 1995).

A homeostase é mantida através da regulação da absorção e excreção. A absorção aparentemente é igual ao longo do intestino delgado em um processo rapidamente saturável (WEDEKIND et al., 2010). O Mn compete diretamente com o Fe pelos sítios de ligação (MCDOWELL, 1992). Uma vez absorvido, pode permanecer livre ou rapidamente ligar-se a α_2 -macroglobulina antes de seguir para o fígado (HURLEY; KEEN; MERTZ, 1987). No entanto, algumas moléculas do mineral ligado a α_2 -macroglobulina podem entrar na circulação sistêmica, tornando-se oxidadas ao seu estado mangânico (Mn^{3+}) e se ligarem à transferrina para serem levadas aos tecidos (MCDOWELL, 1992).

Sua excreção ocorre, principalmente, pela via biliar, mas também o suco pancreático e intestino delgado proporcionam eficiente mecanismo homeostático para regulação dos níveis no tecido (WEDEKIND et al., 2010). A excreção urinária é geralmente baixa. Em seres humanos adultos relata-se que,

independentemente do nível de ingestão desse mineral, suas concentrações nos tecidos mantêm-se geralmente estáveis, em decorrência da regulação rigidamente controlada das taxas de absorção e excreção (ASCHNER; ASCHNER, 2005). A ocorrência natural de deficiência do mineral não foi relatada em cães ou gatos (CASE et al., 2010); entretanto, verifica-se que provoca retardo de crescimento, má formação óssea e defeitos esqueléticos, comprometimento da fertilidade e natalidade, e alteração do metabolismo lipídico e de carboidratos (ASCHNER; ASCHNER, 2005).

Nenhum teste diagnóstico permite a detecção precoce da deficiência em animal. Os valores de Mn no sangue, ossos e fígado declinam em animais privados do mineral, mas eles não fornecem o critério de diagnóstico da mesma forma que o plasma e o fígado fazem quando se trata de outros elementos. Segundo McDowell (1992), há relato de que a atividade da enzima SOD reflete a ingestão dietética do mineral. Pelo e cabelo aparentemente refletem o status dietético, mas seu valor diagnóstico é duvidoso, pelo menos em doses marginais (UNDERWOOD, 1981).

2.5 Selênio

O Se é conhecido por ser incorporado na enzima glutathione peroxidase (GPx) plasmática e selenoproteínas. A GPx é uma enzima antioxidante que catalisa a redução de hidroperóxidos. A selenoproteína é uma glicoproteína com dez moléculas de selenocisteína incorporada na sua sequência de aminoácidos e parece ser responsável pelo transporte de Se no organismo. Em estudo administrando ⁷⁵Se (isótopo com vida média de 119,78 dias) em ratos, a maior parte do elemento radioativo foi incorporado à fração selenoproteína, com a segunda maior quantidade na GPx e a menor quantidade na albumina (DEAGEN et al., 1993).

A GPx é responsável por catalisar a oxidação da glutathiona reduzida e permite a redução do peróxido de hidrogênio para a água, prevenindo a peroxidação lipídica e danos celulares. O sítio catalítico dessa enzima inclui o resíduo selenocisteína, no qual o Se sofre um ciclo redox envolvendo o selenol como a forma ativa que reduz peróxidos de hidrogênio e peróxidos orgânicos.

O Se, na forma de selenocisteína, também, age em duas deiodinases, as quais são importantes na formação e degradação de triiodotironina, a forma ativa do hormônio tireoideano (LARSEN; BERRY, 1995). Uma delas é a iodotironina 5'-deiodinase tipo I, a qual é responsável pela conversão de tiroxina (T4) em 3,3',5' triiodotironina (T3), hormônios necessários para a iniciação da fase anágena (de crescimento) do ciclo do pelo (YU et al., 2006).

A absorção ocorre, principalmente no duodeno (WEDEKIND et al., 2010), sendo, posteriormente, transportado no plasma ligado a proteínas até entrar no tecido. Quando a ingestão é suficiente, os rins contêm a maior concentração do mineral, seguidos pelo fígado e outros tecidos, tais como baço e pâncreas. O pelo pode ter relativamente altas concentrações desse elemento. A retenção é influenciada pelo estado e forma química do selênio administrado. Em geral, esse elemento é depositado em tecidos em maiores concentrações quando na forma biocomplexada. As rotas primárias de excreção são urina, fezes e exalação (quando concentrações tóxicas são consumidas), sendo a maior via em monogástricos a urina. Ainda assim, a quantidade de Se excretada está intimamente relacionada à ingestão dietética (MCDOWELL, 1992), como observado em ratos e humanos (LEVANDER, 1986), em que a excreção desse mineral, via urina, aumenta proporcionalmente ao aumento da ingestão do mesmo. Já a excreção fecal, permanece constante sobre uma vasta ingestão de Se (WEDEKIND et al., 2010).

O Se melhora a saúde da pele, reduzindo a descamação e pele seca; desempenha importante papel no crescimento do pelo; melhora a qualidade da

pelagem fazendo-a ficar mais macia e brilhante. Como resultado de uma pelagem mais saudável, há também a possibilidade de menor perda de pelo (SHARADAMMA et al., 2011). Yu et al. (2006), avaliando o efeito de níveis de Se dietético (0,04; 0,09; 0,12; 0,54; 1,03 e 5,04mg de Se/kg na matéria seca) sobre o crescimento de pelo e concentração do mineral no sangue de cães adultos, observaram que a baixa (0,04mg de Se/kg) e a alta (5,04mg de Se/kg) concentração desse mineral reduziram a taxa de crescimento de pelo dos animais, sendo a maior taxa em cães alimentados com 0,12 a 1,03mg de Se/kg. A concentração sérica do elemento, comparado a valores iniciais, diminuiu em cães alimentados com dieta contendo 0,04mg de Se/kg, aumentou em cães alimentados com mais de 0,5mg de Se/kg e foi inalterado em cães que receberam alimento contendo 0,09 a 0,12mg de Se/kg nas semanas 12 e 24 do estudo.

Em suínos, estudo realizado por Mahan (1995) demonstrou que o Se inorgânico (selenito de sódio) e Se biocomplexado (levedura contendo selênio) foram igualmente efetivos em suportar a atividade da GPx. No entanto, o armazenamento muscular e hepático foi maior quando o Se biocomplexado foi fornecido. Em gatos, Todd et al. (2012), investigando a resposta a altos níveis de Se biocomplexado (produto comercial contendo selenometionina, selenocisteína e outras selenoproteínas e compostos de Se biocomplexado - 8,6µg de Se/g na MS) e inorgânico dietético (selenito de sódio - 8,4µg de Se/g na MS), não observaram mudança na atividade da enzima GPx em resposta à maior ingestão do mineral das diferentes formas. Além disso, a absorção não foi diferente entre as duas fontes e a excreção urinária aumentou mais de 50 vezes em gatos alimentados com dietas suplementadas em relação a animais consumindo a dieta controle (0,6µg de selênio/g na MS). Gatos alimentados com a fonte inorgânica tiveram maior liberação de Se urinário do que na suplementação com a fonte

biocomplexada, mas a fonte não influenciou a concentração de Se hepático de gatos suplementados.

Shiobara, Yoshida e Suzuki (1998), em estudo com ratos, observaram que o nível de Se em urina, soro e pelo, produzido pelo selenito de sódio, foi sempre menor ou comparável ao produzido pela selenometionina nos grupos alimentados com concentração de Se adequados. Quando a ingestão passou a ser excessiva, a SeMet produziu aumento na concentração de Se distinta da causada pelo selenito de sódio, incluindo aumento dramático no pelo e aumento substancial no soro e urina. Segundo os autores, as concentrações de Se nessas amostras biológicas sugeriram que a SeMet é incorporada em proteínas no lugar da metionina. Os resultados indicaram, também, que o Se absorvido independente da forma química foi excretado principalmente pela urina, dependendo da dose de Se.

Em quadros de deficiência o animal, pode vir a apresentar distrofia muscular, falência reprodutiva, diminuição de a ingestão alimentar, edema subcutâneo e mineralização renal. Do mesmo modo, toxicidade a esse mineral, também, não foi observada nessas espécies, apesar de altas concentrações (superior a 4mg de Se/kg de alimento) em frutos do mar e peixes contidos em alimentos para gatos.

Exame histopatológico fornece evidência definitiva da deficiência de vitamina E e/ou Se. Outro teste laboratorial que auxilia no diagnóstico da deficiência de Se inclui análise do mineral em sangue e tecidos. A baixa concentração tecidual de GPx é um bom indicador do seu status porque a atividade dessa enzima no fígado e plasma aumenta ou diminui rapidamente durante a repleção ou depleção. Contudo, os níveis de GPx não irão revelar as reservas totais de Se ou se o elemento foi consumido em nível tóxico. A atividade da enzima parece alcançar um platô em torno de 0,10ppm de Se na

dieta em diversas espécies. Em muitas espécies, as concentrações de Se no fígado, córtex renal e sangue retratam o status mineral (MCDOWELL, 1992).

2.6 Zinco

O Zn tem sido amplamente reconhecido por uma variedade de funções essenciais decorrentes do seu papel como grupo prostético de metaloenzimas ou como efetor de enzimas alostéricas. Durante muito tempo acreditou-se que esse elemento era constituinte apenas da metaloenzima anidrase carbônica, porém, atualmente, observa-se que mais de 200 enzimas, envolvidas em diversas funções fisiológicas, necessitam desse mineral. Dentre elas destacam-se a fosfatase alcalina, Cu-Zn SOD e Zn endopeptidases (BETTGER; O'DELL, 1993). Com base em sua função em enzimas, o Zn está presente no metabolismo de ácido nucleico, síntese de proteína, metabolismo de carboidrato, imunocompetência, saúde da pele, cicatrização de ferida, divisão e diferenciação celular, crescimento e reprodução (CASE et al., 2010; WEDEKIND et al., 2010).

Esse mineral exerce função essencial na formação e mineralização óssea, além do esqueleto conter grande quantidade do conteúdo total do mineral no corpo (FONG et al., 2009). Além disso, as atividades de metaloproteínas de matriz que remodelam a matriz extracelular colagenosa do osso são dependentes de Zn e essa atividade é importante tanto durante o desenvolvimento, como na fase adulta, para a manutenção da homeostase dos ossos. Há, também, evidência de que o elemento tem duplo papel na formação de osso, promovendo a diferenciação e atividade dos osteoblastos, suprimindo simultaneamente osteoclastogênese e reabsorção (MOONGA; DEMPSTER, 1995; YAMAGUCHI, 2010; YAMAGUCHI; WEITXMANN, 2011).

A homeostase desse mineral é controlada pela absorção e excreção. Em monogástricos, a absorção ocorre no intestino delgado, principalmente, no duodeno (MCDOWELL, 1992), sendo ainda pouco absorvida no estômago (WEDEKIND et al., 2010). Durante a digestão é, geralmente, convertido na sua forma iônica, a qual pode formar complexos com vários ligantes inorgânicos e orgânicos, como aminoácidos, fosfato e sulfato (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

Aproximadamente 66% do Zn plasmático total estão ligados à albumina e 33% ligados à globulina (α_2 -macroglobulina) (GIROUX; CASEY; KREBS, 1976). Em torno de 30-40% do Zn que entra na veia porta hepática é captado pelo fígado pelo qual é, subseqüentemente, liberado no sangue. O que permanece circulante é incorporado em diferentes taxas dentro de vários tecidos extra-hepáticos, os quais têm diferentes taxas de *turnover* (HAMBIDGE; CASEY; KREBS, 1986). A metalotioneína age como a maior forma de armazenamento de Zn no fígado e é mobilizada durante a necessidade metabólica, entretanto, a fração SOD também é sugerida como forma de armazenamento desse elemento (MCDOWELL, 1992). A concentração desse mineral no osso tem sido utilizada para mensurar a absorção de Zn e/ou seu estado em animais em crescimento, enquanto a concentração plasmática é somente um índice de confiança sob condições experimentais controladas. A excreção se dá primariamente nas fezes através do suco pancreático, bile e outras secreções digestivas (WEDEKIND et al., 2010). É considerado como pouco absorvido, sendo a eficiência do processo de absorção entre 15 a 40% (KEIFER, 2005).

A deficiência foi relatada em cães alimentados com alimento seco, baseados em cereais, os quais podem conter significantes concentrações de fitato, mesmo quando o conteúdo de Zn, presente no alimento, excede à recomendação mínima preconizada pelo NRC (MORRIS; ROGERS, 1994;

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006). Além disso, essa carência, também, pode ser causada pela baixa concentração dos minerais na dieta ou absorção prejudicada (SCHULTHEISS et al., 2002).

Os sinais patológicos da deficiência dietética em animais dependem do tempo e severidade da deficiência, a idade, sexo, espécies, condições ambientais e a presença ou ausência de fatores iatrogênicos (BETTGER; O'DELL, 1993). Em razão de seu papel na síntese de proteínas, a deficiência está normalmente associada ao retardo no crescimento em animais jovens. Em tecidos de rápido crescimento, há redução na síntese de DNA, RNA e proteínas, prejudicando a divisão celular, crescimento e reparo. Em situações de deficiência grave, pode-se observar depressão significativa na atividade da fosfatase alcalina; do álcool desidrogenase no fígado, retina e testículo; timidina quinase fetal e em tecido conectivo e carboxipeptidase A pancreática (MCDOWELL, 1992).

Em cães e gatos, alterações em pelo e pele são normalmente os primeiros sinais clínicos da deficiência desse mineral, sendo descritos alopecia, pelagem grossa e eritema focal em volta dos olhos, ouvidos, nariz, boca e pontos de pressão (CASE et al., 2010; COLOMBINI, 1999). Outros sinais são anorexia, atrofia testicular, comprometimento na eficiência reprodutiva, disfunção do sistema imune, conjuntivite e o desenvolvimento de lesões de pele (CASE et al., 2010).

Métodos de avaliação do seu estado são relativamente insensíveis. A concentração plasmática é o índice mais usado para avaliar seu estado em animais, entretanto, juntamente a esse, pode, também, ser avaliada a concentração de Zn em leucócitos, pelo e ossos, declínio tecidual da atividade da fosfatase alcalina e alteração na metalotioneína (MCDOWELL, 1992). Na prática clínica, a concentração de Zn urinário tem sido proposta como sendo um marcador sensível ao estado do mineral, mesmo sua concentração sendo baixa. Durante a deficiência, a diminuição da excreção urinária ocorre no início e é

observada antes de qualquer alteração na sua concentração no soro (PORTELA; WEISSTAUB, 2000).

Estudos comparando fontes biocomplexadas e inorgânicas do Zn são inúmeros, mas diferentes respostas têm sido encontradas. França et al. (2008), objetivando avaliar fontes suplementares de Zn (Zn-aminoácido, sulfato de Zn e óxido de Zn) em dose terapêutica (30mg de Zn adicional) para gatos adultos, observaram que animais que receberam fonte suplementar de Zn quelatado e óxido de Zn apresentaram maior concentração do mineral na pele; já, no pelo, animais que consumiram a fonte quelatada e na forma de sulfato apresentaram maior concentração.

Jamikorn e Preedapattarapong (2008), objetivando avaliar os efeitos da suplementação com Zn (120ppm) biocomplexado sob a forma de Zn metionilglicinato comparado ao sulfato de zinco, em alimento comercial para cães sobre as características de pelagem e concentração do mineral no plasma, pelo e fezes, observaram que cães suplementados com Zn biocomplexado apresentaram maior taxa de crescimento de pelo, maior nível de deposição do mineral no pelo, maior absorção e concentração plasmática. Além disso, o pelo dos cães suplementados com o biocomplexo parecia ser mais suave e menos fragmentado do que em cães que foram suplementados com a fonte inorgânica.

Brinkhaus et al. (1998), com o objetivo de comparar a absorção e disponibilidade de uma fonte biocomplexada (propionato de Zn) e uma fonte inorgânica (óxido de Zn) de Zn em cães, por meio da determinação dos níveis séricos do elemento, durante um período de seis horas, após a administração, relataram que os níveis plasmáticos de Zn entre as fontes foram significativamente diferentes, exceto 0 e 2 horas após a administração. Os níveis do elemento no plasma sanguíneo foram significativamente mais elevados ao longo das 6 horas de mensuração quando o propionato de Zn foi fornecido. Um pico pronunciado, nos níveis plasmáticos do mineral, foi observado uma hora,

após a administração do propionato de Zn, seguido por uma redução lenta, ao passo que o óxido de Zn não conseguiu elevar significativamente os níveis plasmáticos do mineral ao longo do período de 6 horas. Esses resultados permitem concluir que o Zn, a partir de propionato de Zn é, significativamente, mais biodisponível que o Zn a partir de óxido de Zn, quando administrado a cães em jejum, o que apoia a visão de que os biocomplexos podem ser mais eficazes no cumprimento das novas exigências do animal de estimação do que fontes inorgânicas.

Lowe, Wiseman e Cole (1994), avaliando três fontes de Zn (quelato aminoácido-zinco, complexo zinco-polissacarídeo e óxido de zinco), adicionados à formulação de uma dieta comercial, relataram maior excreção do mineral em cães alimentados com óxido de Zn do que com as duas fontes biocomplexadas desse elemento; assim como maior taxa de crescimento de pelo e maior quantidade de zinco depositado no pelo em cães alimentados com dieta contendo Zn quelatado com aminoácido do que em cães alimentados com óxido de Zn ou com complexo zinco-polissacarídeo. Esses resultados indicam que o zinco quelatado com aminoácido pode ser mais biodisponível em cães.

Lowe e Wiserman (1998), em estudo com cães alimentados com Zn na forma quelatada (metionina+glicina+zinco) ou na forma de complexo polissacarídeo, em diferentes níveis de inclusão (50ppm, 75ppm ou 100ppm), relataram que a fosfatase alcalina não respondeu à suplementação com Zn, entretanto, a concentração de Zn no pelo e a taxa de crescimento do pelo refletiu aumento para a fonte de Zn quelatado. Em observação mais minuciosa, a maior parte do mineral depositado foi em virtude do aumento no crescimento do pelo com pequena contribuição da concentração dele no pelo.

REFERÊNCIAS

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

AL-OTHMAN, A. A.; ROSENSTEIN, F.; LEI, K. Y. Pool size and concentration of plasma cholesterol are increased and tissue copper levels are reduced during early stages of copper deficiency in rats. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 124, n. 5, p. 628-635, May 1994.

AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J. Introduction. In: _____. **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, and vitamins**. New York: Academic Press, 1995. p. 01-03.

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

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

ARAUJO, J. A. de et al. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, Pau dos Ferros, v. 2, n. 3, p. 53-60, 2008.

ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 26, n. 4-5, p. 353-362, Aug./Oct. 2005.

ASHMEAD, H. D. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metals salts. In: _____. **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**. New Jersey: Noyes, 1993. p. 47-51.

ASHMEAD, H. D.; SAMFORD, R. A.; ASHMEAD, S. D. Feeding amino acid chelated copper and zinc to reduce mineral pollution from swine manure. **The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 31-37, 2008.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **Official publication**. Oxford: AAFCO, 2007.

BAO, Y. M. 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**, Athens, v. 16, p. 448-455, 2007.

BETTGER, W. J.; O'DELL, B. L. Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 4, p. 194-207, 1993.

BRINKHAUS, F. et al. Bioavailability of zinc propionate in dogs. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 128, suppl.12, p. 2596-2597, 1998.

BROWN, T. F.; ZERINGUE, L. K. Laboratory evaluations of solubility and structural integrity of complexed and chelated trace mineral supplements. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p.181-189, Jan. 1994.

BURKETT, J. L. et al. Growth comparison and fecal mineral excretion of inorganic and organic trace mineral supplementation in swine. **Iowa State University Animal Industry Report**, Iowa, p. 1- 8, 2005.

BURKHEAD, J. L.; LUTSENKO, S. The role of copper as a modifier of lipid metabolism. In: BAEZ, R. V. **Lipid Metabolism**. Hard Cover: InTech, 2013. p. 39-60.

CASE, L. P. et al. Minerals. In: _____. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals**. 3. ed. Missouri: Mosby, 2010. p. 37-44.

CHERUKURI, S. et al. Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 2, n. 5, p. 309-319, Nov. 2005.

COLOMBINI, S. Canine zinc-responsive dermatitis. **Dermatology**, New York, v. 29, n. 6, p. 1373-1383, June 1999.

CREECH, B. L. 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**, Champaign, v. 82, n. 7, p. 2140-2147, July 2004.

CREWS, H. M. et al. Investigation of selenium speciation in in vitro gastrointestinal extracts of cooked cod by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry. **Journal of Analytical and Atomic Spectrometry**, London,

v. 11, p. 1177-1182, 1996.

CURZON, G. Some properties of coupled iron-caeruloplasmin oxidation systems. **The Biochemical Journal**, London, v. 79, n. 3, p. 656–663, June 1961.

DEAGEN, J. T. et al. Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, albumin in plasma. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 208, n. 1, p. 176-181, Jan. 1993.

DI SILVESTRO, R. A. et al. A randomized trial of copper supplementation effects on blood copper enzyme activities and parameters related to cardiovascular health. **Metabolism: clinical and experimental**, New York, v. 61, n. 9, p. 1242-1246, Sept. 2012.

DI SILVESTRO, R. A.; MARTEN, J. T. Effects of inflammation and copper intake on rat liver and erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase activity levels. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 120, n. 10, p.1223-1227, Oct. 1990.

DOONG, G. et al. Selected features of copper metabolism in the cat. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 113, n. 10, p. 1963-1983, Oct. 1983.

DU, Z. et al. Utilization of copper in copper proteinate, copper lysine, and cupric sulfate using the rat as an experimental model. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 7, p. 1657-1663, July 1996.

DUNN, L. L.; RAHMANTO, Y. S.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 93-100, Feb. 2006.

EVANS, J.; NEWMAN, S.; SHERLOCK, S. Liver copper levels in intrahepatic cholestasis of childhood. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 75, n. 5, p. 875-878, Nov. 1978.

FAILLA, M. L.; HOPKINS, R. G. Copper and immunocompetence. In: FISCHER, R. W. F. et al. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRACE ELEMENTS IN MAN AND ANIMALS, 9., 1997, Ottawa. **Proceedings...** Ottawa: NRC Research Press, 1997. p. 425-428.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; HURRELL, R. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 9, p. 295-324, 1996.

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

FRANÇA, J. et al. Fontes suplementares de zinco para gatos adultos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 449-459, jul./set. 2008.

FREMAUNT, D. **Trace mineral proteinates in modern pig production: reducing mineral excretion without sacrificing performance**. Ghent: Technical University Ghent, 2005. Disponível em: <http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=125>. Acesso em: 15 abr. 2015.

GIROUX, E. L.; DURIEUX, M.; SCHECHTER, P. J. A study of zinc distribution in human serum. **Bioinorganic Chemistry**, New York, v. 5, n. 3, p. 211-218, 1976.

GRIDER, A. Zinc, copper and manganese. In: STIPANUK, M. H. **Biochemical physiological molecular aspects of human nutrition**. 2. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 1043-1067.

GUO, R. et al. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic copper sources for poultry. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 1132-1141, May 2001.

HAMBIDGE, K. M.; CASEY, C. E.; KREBS, N. F. Zinc. In: MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. 5. ed. New York: Academic Press, 1986. p. 196-233.

HURLEY, L. S.; KEEN, C. L.; MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. New York: Academic Press, 1987. 185 p.

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**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 9-16, 2008.

KEEN, C. L.; BELL, J. G.; LONNERDAL, B. The effect of age on manganese uptake and retention from milk and infant formulas in rats. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 116, n. 3, p. 395–402, Mar. 1986.

KEIFER, C. Minerais quelatados na nutrição de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 206-220, maio/jun. 2005.

KIENZLE, E.; STRATMANN, B.; MEYER, H. Body composition of cats as a basis for factorial calculation of energy and nutrient requirements for growth. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 121, supl.11, p. 122-123, 1991.

KLEVAY, L. et al. Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion. **Metabolism**, New York, v. 33, n. 12, p. 1112-1118, Dec. 1984.

KRANE, S. M.; INADA, M. Matrix metalloproteinases and bone. **Bone**, Elmsford, v. 43, n. 1, p. 7-18, July 2008.

KRATZER, F. H.; VOHRA, P. Chelates and chelation. In: KRATZER, F. H.; VOHRA, P. **Chelates in nutrition**. Florida: CRC Press, 1996. p. 5-33.

KUHLMAN, G.; ROMPALA, R. E. The influence of dietary source of zinc, copper and manganese on canine reproductive performance and hair mineral content. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 128, supl. 12, p. 2603-2605, Dec. 1998.

LARSEN, P. R.; BERRY, M. J. Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinase. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 15, p. 323-352, 1995.

LEESON, S. A new look at trace mineral nutrition of poultry: can we reduce the environmental burden of poultry manure? In: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A. **Nutritional biotechnology in the feed and food industries**. United Kingdom: Nottingham University Press, 2003. p. 125-131.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Commercial poultry nutrition**. 2. ed. Ontario: University Books, 1997. 414 p.

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

LEVANDER, O. A. Selenium. In: MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. San Diego: Academic Press, 1986. p. 209-279.

LOWE, J. A.; WISEMAN, J. A comparison of the bioavailability of three dietary zinc source using four different physiologic parameters in dogs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 128, n. 12, p. 2809-2811, Dec. 1998.

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**, Rockville, v. 124, n. 12, p. 2575-2576, 1994.

MAHAN, D. C. Selenium metabolism in animals: what role does selenium yeast have? In: ANNUAL SYMPOSIUM ALLTECH'S, 11., 1995, New York. **Proceedings...**New : Alltech Technical, 1995. p. 257-267.

MCCOWN, J. L.; SPECHT, A. J. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, v. 47, n. 3, p. 151-160, May/June 2011.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. 2. ed. California: Academic Press, 1992. 524 p.

MEYER, H. Mineral metabolism and requirements in bitches and suckling pups. In: ANDERSON, R. **Nutrition and behavior in dogs and cats**. Oxford: Pergamon Press, 1984. p. 13-24.

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

MILNE, D. B.; KLEVAY, L. M.; HUNT, J. R. Comparison of indices of copper status in men and women fed diets marginal in copper. In: HURLEY, L. S. et al. **Trace element metabolism in man and animals (Tema-6)**. New York: Plenum Press, 1988. p. 451-452.

MOONGA, B. S.; DEMPSTER, D. W. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone-resorption in-vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 10, n. 3, p. 453-457, Mar. 1995.

MORRIS, J. G.; ROGERS, Q. R. Assessment of the nutritional adequacy of pet food through the life cycle. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 124, supl. 12, p. 2520-2534, Dec. 1994.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academies Press, 2006. 424 p.

O'DELL, B. L. **Nutrition reviews**: present knowledge in nutrition. 5. ed. Washington: The Nutrition Foundation, 1984. 506 p.

PERCIVAL, S. S. Neutropenia caused by copper deficiency: possible mechanisms of action. **Nutrition Review**, Washington, v. 53, n. 3, p. 59-66, Mar. 1995.

PORTELA, M. L. de; WEISSTAUB, A. R. Basal urinary zinc/creatinine ratio as an indicator of dietary zinc intake in healthy adult women. **The Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 19, n. 3, p. 413-417, June 2000.

RICHARDS, J. D. et al. Trace mineral nutrition in poultry and swine. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Elmsford, v. 23, n. 11, p. 1527-1534, 2010.

ROSSI, P. et al. Influence of graded levels of organic zinc on growth performance and carcass traits of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 16, p. 219-225, 2007.

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

RUTZ, F.; PANE, A.; XAVIER, G. B. Efeito de minerais orgânicos sobre o metabolismo e desempenho de aves. **AveWorld**, Londrina, 2007. Disponível em: <<http://www.aveworld.com.br/index.php?documento=141>>. Acesso em: 11 jun. 2013.

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

SCHULTHEISS, P. C. et al. Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 14, n. 5, p. 395-402, Sept. 2002.

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

SHARADAMMA, K. C. et al. Role of selenium in pets health and nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**, Elmsford, v. 5, n. 1, p. 64-70, July 2011.

SHENKIN, A. Current concepts on trace element requirements in nutrition. **Clinical Nutrition**, Pleasantville, v. 12, supl. 1, p. 114-118, 1993.

SHIOBARA, Y.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, K. T. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. **Toxicology and applied Pharmacology**, New York, v. 152, n. 2, p. 309-314, Oct. 1998.

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

SPEARS, J. W. Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 151-163, Apr. 1996.

SUHAJDA, A. et al. Preparation of selenium yeast I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 43-47, Apr. 2000.

TODD, J. R. Trace element metabolism animal. In: MILLS, C. F. **Proceedings from international symposium**. Livingstone: WAAAP, 1970. 448 p.

TODD, S. E. et al. Selenium status in adult cats and dogs fed high levels of dietary inorganic and organic selenium. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 2549-2555, Aug. 2012.

UCHIDA, T. et al. Relationship among plasma iron, plasma iron turnover, and reticuloendothelial iron release. **Blood**, New York, v. 61, n. 4, p. 799-802, Apr. 1983.

UNDERWOOD, E. J. **The mineral nutrition of Livestock**. Bureau: Commonwealth Agricultural, 1981. 587 p.

UNDERWOOD, E. J. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4. ed. New York: Academic Press, 1977. 545 p.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. Natural sources of minerals. In: _____. (Ed.). **The mineral nutrition of Livestock**. 3 ed. New York: CABI Publishing, 1999. p. 17-46.

VEIGA, J. B.; CARDOSO, E. C. **Criação de gado leiteiro na zona bragantina**. Belém: Embrapa, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiro/ZonaBraganGado/paginas/apresentacao.htm>>. Acesso em: 9 jun. 2013.

VIEIRA, S. L. Minerais quelatados na nutrição animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2004. p. 51-70.

WEDEKIND, K. J. et al. Micronutrients: minerals and vitamins. In: HAND, M. S. et al. **Small animal clinical nutrition**. 5. ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2010. p. 107-148.

YAMAGUCHI, M. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 338, n. 1-2, p. 241–254, May 2010.

YAMAGUCHI, M.; WEITZMANN, M. N. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF-kappa B activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 355, n. 1-2, p. 179–186, Sept. 2011.

YU, S. et al. Primary hair growth in dogs depends on dietary selenium concentrations. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 90, n. 3, p. 146-151, Apr. 2006.

ZLOTKIN, S. H.; ATKINSON, S.; LOCKITCH, G. Trace elements in nutrition for premature infants. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 223–240, Mar. 1995.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Efeito da suplementação de microminerais inorgânicos e biocomplexados no desempenho e estado mineral de gatos filhotes

Artigo formatado segundo as normas do *Animal Feed Science and Technology*

Resumo

Trinta gatos filhotes aos 80 dias de idade ($919,16 \pm 120,34\text{g}$) foram usados com o objetivo de determinar os efeitos de fontes inorgânicas vs. biocomplexada e diminuição suplementar de cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) biocomplexado no desempenho e estado mineral. Microminerais inorgânicos (ING) foram comparados a quatro níveis de microminerais biocomplexados (BIO) sob a forma de proteinatos (Bioplex[®]TR Se). A dieta 100%ING foi suplementada com 8,4mgde Cu/kg (sulfato), 80mg de Fe/kg (sulfato), 4,80mg de Mn/kg (sulfato), 0,30mg de Se/kg (selenito) e 75mg de Zn/kg (sulfato); e o Bioplex[®]TR Se foi usado como substituto na mesma concentração mineral (100%BIO) ou em proporções menores (80%BIO, 60%BIO e 40%BIO) nas demais dietas, totalizando cinco tratamentos. Os gatos foram alimentados durante 140 dias com as dietas em delineamento inteiramente ao acaso, totalizando seis repetições por tratamento. Para o Cu, maior concentração fecal e menor concentração no pelo foram observados em 100%BIO e 60%BIO, respectivamente, ambos em relação a 100%ING ($p < 0,05$). O consumo e concentração fecal de Cu reduziram linearmente com a diminuição da suplementação do biocomplexo, ao passo que no pelo houve diminuição quadrática. O consumo de Fe reduziu linearmente e a concentração de Fe em pelo reduziu quadraticamente com a diminuição dos níveis suplementares na forma BIO. A quantidade de Mn consumido foi maior em 100%BIO e menor em 60%BIO; a concentração em gônada menor em 60%BIO e 40%BIO; e a concentração em pelo menor em 80%BIO e 60%BIO, todos em relação a 100%ING. Redução quadrática no consumo e na concentração de Mn em pelo; bem como redução linear na concentração do mineral em gônada foi observado com a redução do fornecimento do biocomplexo. Comparado ao grupo 100%ING, o consumo e absorção de Se foi menor em 60%BIO e 40%BIO; maior concentração de Se urinário nos grupos 100%BIO e 80%BIO; menor

retenção e concentração do mineral em pele foram em 80%BIO, 60%BIO e 40%BIO; e maior concentração e Se em pelo em todos os grupos BIO. O consumo, absorção, concentração na urina e retenção de Se reduziram linearmente; e a concentração na pele quadraticamente, ambos com a diminuição da suplementação do biocomplexo. Menor consumo de Zn foi observado em 60%BIO e 40%BIO; e menor concentração fecal desse mineral em 40%BIO, ambos em relação a fonte ING. Em ambos os parâmetros, foi observada redução linear com a diminuição da suplementação. Nos demais parâmetros avaliados, não foram observados efeitos da fonte ou níveis suplementares da fonte biocomplexada. Desse modo, conclui-se que a suplementação de até 40% da recomendação do *National Research Council* de Cu, Fe, Mn, Se e Zn sob a forma de proteinato (Bioplex[®]TR Se) durante a fase de crescimento de gatos não afeta negativamente o desempenho e estado mineral dos mesmos.

Palavras-chave: biodisponibilidade. desempenho. felinos. mineral. proteinato.

Abreviações: BIO, biocomplexado; Cu, cobre; Fe, ferro; Mn, manganês; Se, selênio; Zn, zinco; ING, inorgânico; NRC, *National Research Council*

1. Introdução

O processo de desenvolvimento de um animal, embora seja fator determinado principalmente pela genética, é influenciado por nutrição adequada que inclui a presença, dentre outros nutrientes, de microminerais como cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn). Muitos desses elementos são conhecidos por serem cofatores essenciais em enzimas ou como parte delas (Bao et al., 2007), as quais estão envolvidas em reações metabólicas importantes para o crescimento e manutenção (Ott e Johnson, 2001).

Os microminerais têm sido considerados de grande importância na formação e homeostase da estrutura óssea. O Cu é um cofator da enzima lisil oxidase, necessária na ligação cruzada de colágeno e elastina durante a síntese da

cartilagem (Chou et al., 1969). O Fe é um cofator das enzimas prolil e lisil hidroxilases, na síntese de colágeno nas etapas que antecedem a ligação cruzada realizada pela lisil oxidase (Tuderman et al., 1977). O Mn é cofator das glicosiltransferases, enzimas importantes na formação e alongação da cadeia de glicosaminoglicanos (Tsopanakis e Herries, 1978), que formam a substância fundamental do modelo de cartilagem (Dibner et al., 2007).

O Se, embora os mecanismos pelos quais sua deficiência induz a inibição do crescimento não seja totalmente elucidado (Moreno-Reyes et al., 2001), parece estar associado ao *turnover* do osso e cartilagem (Tsukahara et al., 1996) ou, até mesmo, no distúrbio do metabolismo de colágeno (Seibel et al., 1992). Além disso, tem sido relatada associação da concentração de Se dietético à concentração de 5 α -deiodinase, uma selenoproteína, e conseqüentemente do hormônio T3 (Jianhua et al., 2000), em que esse último faz-se necessário para a iniciação da fase anágena do crescimento do pelo (Yu et al., 2006).

Já o Zn tem demonstrado efeito estimulatório na formação osteoblástica e mineralização, no estímulo da síntese protéica celular, estimula a expressão gênica de fatores transcricionais relacionados a diferenciação dentro de células osteoblásticas, bem como inibe a reabsorção óssea osteoclástica (Yamaguchi, 2010). Assim, o ganho de peso e o desenvolvimento dos ossos têm sido usados como critérios principais em ensaios que avaliam microminerais (Miles e Henry, 2000).

Para determinar quão eficientemente um animal utiliza elementos minerais da dieta, é preciso conhecer a sua biodisponibilidade. Ao ser ingerido, a sua biodisponibilidade é influenciada por propriedades específicas do mineral, como por exemplo, o estado de valência do elemento e a sua forma molecular (inorgânicos vs. biocomplexada). Devido a estas propriedades, o mineral pode formar complexos com outros componentes no intestino, impedindo ou

auxiliando a absorção pela mucosa, transporte ou metabolismo (Miles e Henry, 2000).

A avaliação das fontes de minerais, não considera apenas o conteúdo total mineral ou concentração na dieta, mas também o quanto é absorvido pela mucosa intestinal e utilizado pelas células e tecidos do organismo. Os ensaios de digestibilidade têm valor limitado devido as fezes serem consideradas uma via importante na excreção de muitos minerais, contendo também minerais que foram previamente absorvidos (Underwood e Suttle, 1999). Destarte, o acúmulo de minerais em vários órgãos-alvo tem sido utilizada como critério de resposta para a biodisponibilidade (Milese Henry, 2000).

Na dieta de gatos, a forma de suplementação dos microminerais ainda é feita em sua maioria sob a forma de sais inorgânicos, tais como sulfatos e óxidos, principalmente em decorrência do seu baixo custo e a falta de dados precisos que determinam a indicação adequada de outras fontes de microminerais como, por exemplo, as organicamente complexadas. Conforme observado em outras espécies (Burkett et al., 2009; Nollet et al., 2007), comparado aos inorgânicos, os microminerais biocomplexados parecem ter maior biodisponibilidade, o que implica que podem ser adicionados em menor concentração na dieta, sem afetar o desempenho dos mesmos.

Estudos envolvendo a substituição de microminerais inorgânicos por biocomplexos, em diferentes níveis para a determinação da melhor suplementação dessa fonte para gatos filhotes, são inexistentes. Sendo assim, objetivou-se avaliar os efeitos da completa substituição de Cu, Fe, Mn, Se e Zn inorgânico pela forma biocomplexada, quer quando incluído em níveis usuais ou a níveis reduzidos, sobre o desempenho e estado mineral em gatos filhotes.

2. Material e métodos

Todo o procedimento experimental acordou com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões/ Permanentes/PRP-UFLA- Protocolo nº 049/13).

2.1. Animais

Trinta gatos filhotes saudáveis, sendo 15 machos e 15 fêmeas foram distribuídos de forma semelhante entre as dietas experimentais. Os filhotes aos 80 dias de idade e com peso inicial de $919,16 \pm 120,34\text{g}$, foram alojados em gaiolas suspensas com dimensões de 0,8 x 0,8 x 1,0m (altura x profundidade x largura). As vacinas foram realizadas aos 60, 90 e 120 dias de idade (Nobivac Feline, MSD Saúde Animal Inc., Alemanha) e vermifugação aos 30 e 45 dias de idade (Basken Suspensão, König Inc., Argentina). O estudo foi conduzido durante 140 dias.

2.2. Dietas experimentais e manejo alimentar

Os filhotes foram distribuídos em cinco tratamentos (dietas experimentais secas extrusadas): (1) 100% ING [100% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte inorgânica]; (2) 100%BIO [100% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada]; (3) 80%BIO [80% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada]; (4) 60%BIO [60% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada]; (5) 40%BIO [40% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada] (Tabela 1).

As recomendações de microminerais indicadas pelo NRC (2006) para dietas de gatos filhotes são: 8,4mg de Cu/kg; 80mg de Fe/kg; 4,8mg de Mn/kg;

0,3mg de Se/kg e 75mg de Zn/kg, na matéria seca, considerando um alimento com aproximadamente 4000kcal de energia metabolizável/kg. As dietas foram isoenergéticas e isoproteicas, diferenciando apenas na quantidade e fonte de microminerais suplementados (Tabelas 2 e 3).

Os microminerais inorgânicos foram suplementados como sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, selenito de sódio e sulfato de zinco. A fonte de mineral biocomplexada foi fornecida por fontes proteinadas disponíveis comercialmente (Bioplex[®]TR Se Gatos, Alltech Inc., Estados Unidos), obtida a partir de proteína de soja hidrolisada enzimaticamente; exceto o Se biocomplexado que foi a partir de uma proteína de levedura, principalmente como selenometionina. Os alimentos foram fornecidos diariamente na quantidade de 150gramas, possibilitando a obtenção de sobra. Água foi fornecida *ad libitum*.

2.3. Desempenho dos gatos e crescimento do pelo

Os gatos foram pesados no primeiro dia de fornecimento das dietas (dia 0) e posteriormente a cada quatro semanas, sempre pela manhã antes do fornecimento do alimento, em balança digital (Modelo Prix III, Toledo Scale Co., Estados Unidos). Para a determinação do consumo alimentar, as sobras foram pesadas diariamente em balança digital (Modelo Prix III, Toledo Scale Co., Estados Unidos).

Tabela 1 Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para gatos filhotes.

Ingredientes (g/kg na matéria natural)	100% ING	100% BIO	80% BIO	60% BIO	40% BIO
Farinha de vísceras de frango	243,33	243,33	243,33	243,33	243,33
Arroz quirera	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Soja farelo 45%	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Milho grão	94,90	94,90	94,90	94,90	94,90
Farinha de peixe	82,21	82,21	82,21	82,21	82,21
Óleo de frango	60,39	60,39	60,39	60,39	60,39
Farelo de trigo	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Palatabilizante	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Semente de linhaça	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Premix vitamínico ^a	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Acidificante	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mananoligossacarídeo	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
DL-metionina	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Taurina	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67
Corante	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Propionato de cálcio	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Extrato de <i>Yucca schidigera</i>	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Premix inorgânico ^b	2,00	-	-	-	-
Premix biocomplexo ^c	-	2,00	1,60	1,20	0,80
Inerte (caulim)	-	-	0,40	0,80	1,20

^a Premix vitamínico forneceu os seguintes níveis de vitaminas por quilograma de alimento: vitamina A (18000UI), vitamina D3 (1200UI), vitamina E (200UI), vitamina K (0,15mg), tiamina (25mg), riboflavina (15mg), ácido pantotênico (35mg), niacina (150mg), piridoxina (10mg), ácido fólico (2mg), biotina (0,2mg) vitamina B12 (0,07mg), colina (2200mg).

^b Premix mineral inorgânico continha no mínimo, por quilograma do premix: 40500mg de ferro (sulfato de ferro), 4200mg de cobre (sulfato de cobre), 2400mg de manganês (sulfato de manganês), 37500mg de zinco (sulfato de zinco), 1820mg de iodo (iodato de cálcio), 150mg de selênio (selenito de sódio).

^c Premix mineral biocomplexado continha no mínimo, por quilograma do premix: 40500mg de ferro (proteinato de ferro), 4200mg de cobre (proteinato de cobre), 2400mg de manganês (proteinato de manganês), 37500mg de zinco (proteinato de zinco), 1820mg de iodo (iodato de potássio), 150mg de selênio (levedura enriquecida com selênio).

Tabela 2 Quantidades suplementares de microminerais das fontes inorgânicas (ING) ou biocomplexada (BIO) utilizadas experimentalmente em dietas para gatos filhotes.

Dietas	mg/kg de alimento na matéria seca				
	Cobre	Ferro	Manganês	Selênio	Zinco
100% ING ^a	8,40	80,00	4,80	0,30	75,00
100% BIO ^b	8,40	80,00	4,80	0,30	75,00
80% BIO	6,72	64,80	3,84	0,24	60,00
60% BIO	5,04	48,60	2,88	0,18	45,00
40% BIO	3,36	32,40	1,92	0,12	30,00

^a ING (fontes inorgânicas) - sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, selenito de sódio e sulfato de zinco.

^b BIO (fontes biocomplexadas) - proteinato de cobre, proteinato de ferro, proteinato de manganês, levedura enriquecida com selênio, proteinato de zinco.

Tabela 3 Quantidade de microminerais de fonte inorgânica (ING) e biocomplexada (BIO) nas dietas experimentais para gatos filhotes e premixes após análise laboratorial.

Dietas	mg/kg na matéria seca				
	Cobre	Ferro	Manganês	Selênio	Zinco
100% ING	25,77	433,85	37,98	0,38	149,66
100% BIO	26,42	412,90	37,71	0,40	156,53
80% BIO	24,10	353,47	36,21	0,37	137,45
60% BIO	22,32	343,15	35,13	0,28	125,67
40% BIO	20,17	326,17	34,31	0,23	108,13
Premix ING	3929,62	43685,43	4104,64	95,99	38769,56
Premix BIO	4243,53	47739,07	4026,54	188,73	42416,17

A altura de cernelha e comprimento corporal foram mensurados nos dias 0, 40, 80 e 120 do período experimental. A altura de cernelha foi determinada tomando por base a distância vertical entre o final do pescoço do animal (cernelha) e o solo. O comprimento corpóreo foi feito tomando como ponto inicial de posicionamento da fita métrica a base da nuca (articulação atlân-to-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).

Aos 140 dias, para a determinação do desenvolvimento ósseo por meio da densitometria óssea, os animais tiveram o membro anterior direito radiografado em projeção médio lateral, em decúbito lateral direito. 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 11 degraus, tendo o primeiro degrau 0,5mm de espessura, variando a seguir de 0,5 em 0,5mm.

Os filmes radiográficos foram revelados em processadora automática (modelo Vision Line, Lotus Co., Brasil) e posteriormente escaneados com *scanner* de mesa (modelo Deskjet F4480, Hewlett Packard Inc., Estados Unidos) com auxílio do software Vue Scan x32 (Hamrick Software, Estados Unidos). Para o escaneamento, o padrão utilizado foi o de resolução espacial correspondente a 600dpi e intensidade de 8bits, sendo as imagens arquivadas em JPEG. As imagens digitalizadas dos ossos e do penetrômetro foram 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.

Para a determinação do crescimento do pelo, no primeiro dia de fornecimento da dieta experimental (Dia 0), realizou-se a tricotomia de uma área de 24,5cm² (7,0cm x 3,5cm) de pelo da região toracolombar esquerda de cada

animal com um cortador eletrônico (Modelo QC5115, Philips Inc., Holanda). O pelo foi armazenado em sacos plásticos identificados para cada animal e pesados em balança analítica (Modelo AUW220, Shimadzu Co., Japão). A cada 40 dias a mesma região foi tricotomizada, sendo também realizado o recolhimento e pesagem dos pelos removidos (adaptado de Yu et al., 2006; Jamikorn e Preedapattarapong, 2008; Lowe e Wiseman, 1998).

2.4. Estado mineral

Do 80° ao 110° dia experimental a mensuração da ingestão alimentar e a coleta de fezes e urina foram feitas diariamente. As fezes foram coletadas individualmente duas vezes ao dia, pesadas e em seguida armazenadas a -20°C. Ao final do período de coleta, as amostras foram homogeneizadas, secas em estufa a 65°C durante 72 horas e moídas em moinho (Thomas[®] Wiley Mills modelo 4, Thomas Scientific Inc., Estados Unidos) com peneira de 1,0mm. Para coleta de amostras de urina, foi adicionado ácido clorídrico (6mol/L) às bandejas higiênicas dos gatos uma vez ao dia, no intuito de evitar contaminação microbiológica. A coleta e a mensuração do volume de urina foram realizadas a cada 24 horas, sendo em seguida armazenadas a -20°C para posterior análise.

Amostras de pelo da região toracolombar esquerda de cada animal no dia 120, coletadas para determinação do crescimento, foram armazenadas à temperatura ambiente após pesagem, até análise. Para a remoção de amostras de pele e gônada no 140° dia, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico, onde foram pré-anestesiados com Acepromazina 0,2% (Acepran 0,2%, Vetnil Inc., Brasil) na dose de 0,1mg/kg de peso corporal via intramuscular e posteriormente anestesiados com Cloridrato de zolazepan e Cloridrato de tiletamina (Telazol, Zoetis Inc., Brasil) na dose de 12,5mg/kg de peso corporal via intramuscular. Os tecidos testicular ou ovariano foram removidos conforme protocolo descrito por Crane (1996) e Fingland (1996),

respectivamente. Nesse momento procedeu-se também a remoção, no local da incisão, de um fragmento de pele de um centímetro de largura de cada animal. As amostras foram armazenadas a -20°C até análise.

Para a determinação da concentração plasmática dos microminerais, amostras de sangue foram coletadas no 110º dia experimental. As coletas foram feitas antes do fornecimento das dietas experimentais (animal em jejum de 12 horas) e, sequencialmente, duas e seis horas após a alimentação do animal. Sangue total foi coletado da veia jugular por venopunção em tubos Vacutainer com heparina sódica e livres de microminerais (NH Trace Elements Sodium Heparin, Greiner Bio-one Inc., Austria). Uma vez coletado, o sangue foi centrifugado a $3000\times g$ durante 15 minutos a 6°C para a retirada do plasma (modelo 2K-15 Sigma Laborzentrifugen, Sigma, Alemanha), o qual foi armazenado em microtubos tipo eppendorf a -20°C até a análise dos microminerais (Brinkhaus et al., 1998).

Amostras de pelo foram lavadas três vezes com água destilada a 60°C e secos em estufa de ventilação forçada para remoção superficial de minerais que podem ser descritos como contaminantes da amostra. As dietas, amostras fecais, de urina, pelo, pele e gônadas passaram por um processo de digestão em forno de microondas (MARSXpress, Cem Inc., Estados Unidos) sob ação de ácido nítrico (Sigma-Aldrich Inc., Estados Unidos), conforme metodologia USEPA 3051A (USEPA, 1998). Após essa digestão, os elementos Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados em espectrofotometria de absorção atômica em chama (modelo 800 Perkin-Elmer Instruments Inc., Estados Unidos); ao passo que a determinação do Se foi realizado no mesmo espectrofotômetro, porém atomizada em forno de grafite. As amostras de plasma não sofreram prévia digestão em forno de microondas, sendo feita a determinação direta após diluição das amostras com água deionizada.

2.4. Análises estatísticas

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado, de modo que 30 gatos foram distribuídos em cinco tratamentos, totalizando assim seis animais por tratamento, sendo a unidade experimental cada gato. Todos os dados foram previamente analisados para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e quando necessário eles foram transformados em log antes de serem analisados estatisticamente. Peso corporal, consumo alimentar, altura de cernelha, comprimento corporal, crescimento de pelo foram avaliados por meio de análise de variância com medidas repetidas, utilizando o procedimento MIXED do programa SAS (SAS, Inst., Inc., Cary, NC) com o método de estimação de máxima verossimilhança restrita. Os dados da concentração plasmática dos microminerais em estudo foram submetidos à análise de covariância, sendo os valores no tempo 0 as covariáveis, também pelo procedimento MIXED do programa SAS. Para ambos os casos, foram avaliados os efeitos de dietas, tempo e da interação dieta x tempo, considerando estruturas da matriz de variâncias adequadas. O efeito das dietas sobre as variáveis de densidade mineral óssea e estado mineral foi avaliado por análise de variância. Nos casos em que esse efeito foi significativo, utilizou-se o Teste de Dunnet para comparação de cada nível de suplementação do biocomplexo (BIO) com o grupo ING e análise de regressão polinomial entre os níveis do suplemento sob a forma biocomplexada. Todas essas análises foram realizadas utilizando o procedimento GLM (SAS, Inst., Inc., Cary, NC). Significância foi declarada a $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Desempenho dos gatos e crescimento do pelo

Nos parâmetros peso corporal, consumo alimentar (Tabela 4), altura de cernelha, comprimento corporal e crescimento de pelo (Tabela 5) não foi

observada interação dieta x tempo ($p>0,05$) e diferença entre as fontes e níveis suplementares do biocomplexo ($p>0,05$), mas em todos esses parâmetros foi observada diferença entre os tempos de coleta ($p<0,05$). A densidade mineral dos ossos úmero, rádio e ulna (Tabela 6) não diferiram entre os grupos experimentais ($p>0,05$).

Tabela 4 Peso corporal (PC) e consumo alimentar diário (CAD) de gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

Item	Tempos (semanas)	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ^a			EPM ^b
			100%	80%	60%	40%	D x T	D	T	
PC (g)	0	926	919	916	919	916	0,72	0,67	<0,01	56,51
	4	1313	1441	1373	1308	1353				
	8	1731	1848	1897	1689	1847				
	12	2116	2273	2244	2095	2212				
	16	2466	2699	2602	2422	2670				
	20	2813	3032	2869	2732	3038				
CAD (g/dia)	1	41	41	40	39	36	0,89	0,69	<0,01	1,48
	4	54	61	57	50	55				
	8	67	68	73	64	72				
	12	71	71	76	68	71				
	16	77	84	81	72	84				
	20	89	87	78	79	83				

^a D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo.

^b EPM = erro padrão da média

Tabela 5 Altura de cernelha (AC), comprimento corporal (CC) e crescimento de pelo (CP) de gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

Item	Tempos (dias)	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ^a			EPM ^b
			100%	80%	60%	40%	D x T	D	T	
AC (cm)	0	18	18	18	17	18	1,00	0,42	<0,01	0,29
	40	22	22	22	22	22				
	80	23	24	24	24	24				
	120	26	26	26	26	26				
CC (cm)	0	43	43	43	42	42	0,41	0,86	<0,01	0,70
	40	54	55	52	52	53				
	80	59	58	59	58	59				
	120	62	61	62	61	61				
CP (g/24,5cm ²)	0	0,24	0,25	0,23	0,25	0,19	0,36	0,80	<0,01	0,01
	40	0,32	0,26	0,37	0,28	0,43				
	80	0,31	0,35	0,32	0,33	0,39				
	120	0,19	0,21	0,18	0,22	0,20				

^a D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo.

^b EPM = erro padrão da média

Tabela 6 Densidade mineral óssea (em milímetro de alumínio – mmAl) de gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

Item	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ANOVA	EPM ^a
		100%	80%	60%	40%		
Úmero	6,07	5,96	5,93	4,99	5,66	0,45	0,21
Rádio	3,57	3,76	3,59	3,60	3,76	0,92	0,08
Ulna	3,88	3,95	3,93	3,71	3,99	0,87	0,09

^a EPM = erro padrão da média

3.2. Status mineral

3.2.1 Cobre

O consumo de Cu não diferiu entre as fontes (Tabela 7), mas diminuiu linearmente com a redução da suplementação do biocomplexo (Tabelas 7 e 8). A excreção fecal do elemento foi maior ($p < 0,05$) no grupo 100%BIO em relação ao 100%ING (Tabela 7) e reduziu linearmente ($p < 0,05$) com a diminuição da suplementação do Cu biocomplexado (Tabelas 7 e 8). A absorção, excreção na urina, retido, presente na pele e gônada não diferiram ($p > 0,05$) entre as fontes e não houve efeito dos níveis suplementares. No pelo, o grupo 60%BIO apresentou menor concentração de Cu quando comparado ao grupo 100%ING e entre os níveis biocomplexados, a concentração reduziu quadraticamente ($p < 0,05$) com a diminuição da suplementação (Tabelas 7 e 8). No plasma não foi observada interação dieta x tempo, assim como não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre as dietas e entre os tempos de coleta (Tabela 9).

Tabela 7 Concentração de cobre em amostras coletadas em gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de cobre BIO.

Item	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ANOVA	p-valor ^a		EPM ^b
		100%	80%	60%	40%		L	Q	
Consumo (mg/kg/dia)	1,62	2,09	1,98	1,64	1,60	0,03	0,01	0,74	0,07
Fezes (mg/kg/dia)	1,41	1,90*	1,84	1,52	1,43	0,02	<0,01	0,91	0,06
Absorção (mg/kg/dia)	0,21	0,19	0,14	0,12	0,17	0,13	-	-	0,01
Urina (mg/kg/dia)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,31	-	-	0,00
Retenção (mg/kg/dia)	0,20	0,18	0,13	0,11	0,16	0,10	-	-	0,01
Pele (mg/kg)	8,28	10,72	4,51	5,05	10,14	0,19	-	-	1,04
Gônada (mg/kg)	10,27	12,43	3,51	4,59	8,97	0,26	-	-	1,47
Pelo (mg/kg)	9,28	8,30	7,76	6,97*	9,44	0,01	0,21	<0,01	0,27

Médias seguidas de asterisco (*) nas linhas diferem da média do controle (100%ING) pelo teste de Dunnett (p<0,05)

^a L = modelo linear; Q = modelo quadrático

^b EPM = erro padrão da média

Tabela 8 Regressão do percentual de suplementação do biocomplexo vs. concentração do mineral em amostras coletadas em gatos filhotes suplementados com diferentes níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

Item	Regressão ^a	R ²
Cobre		
Consumo	$y = 1,19733 + 0,00901x$	0,91
Fezes	$y = 1,06919 + 0,00860x$	0,93
Pelo	$y = 17,34251 - 0,27726x + 0,00189x^2$	0,81
Ferro		
Consumo	$y = 20,83772 + 0,17992x$	0,74
Pelo	$y = 320,95260 - 7,26381x + 0,05617x^2$	0,96
Manganês		
Consumo	$y = 4,13191 - 0,06430x + 0,00064026x^2$	0,98
Gônada	$y = 0,37938 + 0,01247x$	0,91
Pelo	$y = 4,35341 - 0,12094x + 0,00087951x^2$	0,96
Selênio		
Consumo	$y = 0,35903 + 0,24067x$	0,97
Absorção	$y = -3,63873 + 0,23453x$	0,97
Urina	$y = -1,92729 + 0,10217x$	0,94
Retenção	$y = -1,71142 + 0,13236x$	0,95
Pele	$y = 2611,42432 - 86,01448x + 0,75581x^2$	0,96

Continuação

“Tabela 8, conclusão”

Item	Regressão ^a	R ²
Zinco		
Consumo	$y = 4,20046 + 0,12146x$	0,88
Fezes	$y = 3,73084 + 0,09959x$	0,87

^a Onde x é o percentual de suplementação do biocomplexo (%) e o y é a concentração do mineral estimada (mg/kg ou µg/kg para selênio) na amostra coletada.

Tabela 9 Concentração de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) no plasma de gatos filhotes, 2 e 6h após a alimentação com diferentes concentrações desses elementos de fonte inorgânica (ING) e biocomplexada (BIO).

Item	Tempo (horas)	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ^a			EPM ^b
			100%	80%	60%	40%	D x T	D	T	
Cobre (mg/L)	2	1,91	1,64	1,19	1,35	1,21	0,19	0,23	0,05	0,07
	6	1,85	1,61	1,09	1,26	1,27				
Ferro (mg/L)	2	-	-	1,24	0,96	0,24	0,09	0,34	0,01	0,09
	6	-	-	1,61	0,95	0,74				
Selênio (µg/L)	2	315,28	373,52	419,29	421,30	411,19	0,95	0,73	0,83	11,00
	6	305,65	404,12	403,68	436,70	417,27				
Zinco (mg/L)	2	0,48	0,50	0,42	0,41	0,33	0,92	0,17	<0,001	0,02
	6	0,55	0,58	0,48	0,48	0,42				

^a D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo.

^b EPM = erro padrão da média

3.2.2 *Ferro*

O consumo de Fe não diferiu entre as fontes, mas reduziu linearmente ($p < 0,05$) com a diminuição da suplementação do Fe biocomplexado (Tabelas 8 e 10). A concentração de Fe nas fezes, absorvido, na urina, retido, na pele e em gônada não diferiram entre as duas fontes e não houve efeito dos níveis suplementares sob a forma biocomplexada (Tabela 10). No pelo a concentração do mineral foi semelhante entre as fontes ($p > 0,05$) e reduziu quadraticamente ($p < 0,05$) com a diminuição da suplementação do Fe biocomplexado (Tabelas 8 e 10). A concentração de Fe no plasma foi inferior ao limite de detecção (LD) do aparelho (LD=0,19) nos grupos suplementados com 100%ING e 100%BIO (Tabela 9). Entre os demais grupos, não houve interação dieta x tempo, e efeito da dieta ($p > 0,05$), entretanto, houve diferença ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (Tabela 9).

3.2.3 *Manganês*

O maior consumo desse elemento foi observado em 100%BIO e o menor em 60%BIO, ambos em relação a 100%ING; já entre os níveis do biocomplexo, foi quadraticamente reduzido com a diminuição da suplementação (Tabelas 8 e 11). As concentrações de Mn encontrados nas fezes, urina, pele e plasma foram abaixo do limite de detecção do aparelho, ou seja, foi inferior a 0,04mg/kg e, com isso, não foi possível determinar a absorção e retenção diária desse mineral. Nas gônadas as menores concentrações de Mn foram nos grupos 60%BIO e 40%BIO ($p < 0,05$), ambos em relação ao grupo 100%ING (Tabela 11); e redução linear ($p < 0,05$) do mineral foi observada com o decréscimo do fornecimento do biocomplexo (Tabelas 8 e 11). No pelo a deposição do Mn foi menor nos grupos 80%BIO e 60%BIO quando comparados ao grupo 100%ING (Tabela 11); já entre os níveis suplementares biocomplexados, o teor de

manganês foi quadraticamente reduzido ($p < 0,05$) com a diminuição da suplementação (Tabelas 8 e 11).

Tabela 10 Concentração de ferro em amostras coletadas em gatos filhotes suplementados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de ferro.

Item	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ANOVA	p-valor ^a		EPM ^b
		100%	80%	60%	40%		L	Q	
Consumo (mg/kg/dia)	34,57	40,57	33,65	28,28	30,80	0,03	<0,01	0,07	1,37
Fezes (mg/kg/dia)	28,13	32,06	27,37	25,72	24,77	0,32	-	-	1,17
Absorção (mg/kg/dia)	6,44	8,50	6,28	2,57	6,02	0,19	-	-	0,77
Urina (mg/kg/dia)	0,22	0,44	0,28	0,27	0,28	0,58	-	-	0,05
Retenção (mg/kg/dia)	6,22	8,06	6,00	2,30	5,74	0,20	-	-	0,76
Pele (mg/kg)	106,1	238,46	169,12	180,1	210,75	0,59	-	-	27,77
Gônada (mg/kg)	97,39	187,02	179,1	151,26	178,14	0,39	-	-	16,60
Pelo (mg/kg)	126,6	153,81	106,71	79,96	122,73	0,01	0,05	<0,01	7,10

^a L = modelo linear; Q = modelo quadrático

^b EPM = erro padrão da média

Tabela 11 Concentração de manganês em amostras coletadas em gatos filhotes alimentados com fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de manganês BIO.

Item	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ANOVA	p-valor ^a		EPM ^b
		100%	80%	60%	40%		L	Q	
Consumo (mg/kg/dia)	3,22	4,07*	3,20	2,47*	2,62	<0,01	<0,01	0,01	0,13
Gônada(mg/kg)	1,74	1,70	1,25	1,05*	0,97*	<0,01	<0,01	0,20	0,09
Pelo(mg/kg)	1,28	1,03	0,39*	0,35*	0,96	<0,01	0,29	<0,01	0,11

Médias seguidas de asterisco (*) nas linhas diferem da média do controle (100%ING) pelo teste de Dunnett (p<0,05)

^a L = modelo linear; Q = modelo quadrático

^b EPM = erro padrão da média

3.2.4. Selênio

Menor consumo e absorção de Se ($p < 0,05$) ocorreram nos animais suplementados com 60%BIO e 40%BIO, ambos comparados a 100%ING (Tabela 12). O consumo e absorção de Se reduziram linearmente ($p < 0,05$) com a diminuição da suplementação do biocomplexo (Tabelas 8 e 12). Nas fezes a concentração do elemento não diferiu entre as fontes e não houve efeito dos níveis da forma biocomplexada ($p > 0,05$) (Tabela 12). Maiores concentrações de Se na urina ($p < 0,05$) foram observados nos gatos que consumiram as dietas 100%BIO e 80%BIO em relação à fonte inorgânica (Tabela 12) e, entre os níveis biocomplexados, ocorreu redução linear ($p < 0,05$) com a diminuição suplementar (Tabelas 8 e 12).

A retenção desse mineral foi menor ($p < 0,05$) nos níveis biocomplexados 80%, 60% e 40% quando comparados à fonte inorgânica (Tabela 12); e efeito linear decrescente ($p < 0,05$) foi observado com a redução dos níveis suplementares (Tabelas 8 e 12). Menores concentrações de Se na pele foram encontradas em 80%, 60% e 40%BIO em relação ao 100%ING (Tabela 12); e entre os grupos suplementados com biocomplexo, observou-se redução quadrática ($p < 0,05$) com a diminuição da suplementação (Tabelas 8 e 12). Não houve diferença significativa entre as fontes e efeito dos níveis suplementares de Se biocomplexado para a concentração do mineral em gônada (Tabela 12).

No pelo, a menor concentração foi no grupo inorgânico em relação a todos os demais grupos, mas não houve efeito entre os níveis do biocomplexo (Tabela 12). Não houve interação dieta x tempo ($p > 0,05$) para a concentração plasmática, bem como efeito da dieta e tempo (Tabela 9).

Tabela 12 Concentração de selênio em amostras coletadas em gatos filhotes alimentados com fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de selênio BIO.

Item	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ANOVA	p-valor ^a		EPM ^b
		100%	80%	60%	40%		L	Q	
Consumo (µg/kg/dia)	21,34	24,35	20,50	13,26*	10,72*	<0,01	<0,01	0,57	1,14
Fezes (µg/kg/dia)	3,71	4,83	4,25	4,21	4,43	0,37	-	-	0,17
Absorção (µg/kg/dia)	17,63	19,52	16,25	9,05*	6,29*	<0,01	<0,01	0,79	1,11
Urina (µg/kg/dia)	4,42	7,72*	7,25*	3,91	2,02	<0,01	<0,01	0,27	0,53
Retenção (µg/kg/dia)	13,21	11,80	9,00*	5,14*	4,27*	<0,01	<0,01	0,32	0,80
Pele(µg/kg)	1773,34	1615,14	426,25*	312,67*	333,07*	<0,01	<0,01	0,01	169,04
Gônada(µg/kg)	1769,98	1897,66	1797,72	1643,56	1554,30	0,91	-	-	112,22
Pelo(µg/kg)	603,65	1001,29*	950,93*	908,62*	1254,39*	<0,01	-	-	52,21

Médias seguidas de asterisco (*) nas linhas diferem da média do controle (100%ING) pelo teste de Dunnett (p<0,05)

^a L = modelo linear; Q = modelo quadrático

^b EPM = erro padrão da média

3.2.5 Zinco

Os grupos 60%BIO e 40%BIO apresentaram menor consumo do mineral ($p < 0,05$) quando comparados aos que consumiram a fonte inorgânica de Zn (Tabela 13). O consumo desse elemento reduziu linearmente ($p < 0,05$) com a redução dos níveis suplementares do biocomplexo (Tabelas 8 e 13). A excreção fecal do mineral foi menor ($p < 0,05$) nos animais que consumiram 40%BIO, em relação à fonte inorgânica (Tabela 13) e, entre os níveis do biocomplexo, observou-se redução linear nessa excreção com a diminuição do fornecimento do Zn (Tabelas 8 e 13). As fontes e níveis suplementares de Zn biocomplexado não influenciaram ($p > 0,05$) a absorção, concentração na urina, retido, na pele, gônada e pelo (Tabela 13). Na concentração de Zn plasmático, não foi observada interação dieta x tempo ($p > 0,05$) assim como diferença ($p > 0,05$) entre as dietas; entretanto, houve diferença ($p < 0,05$) entre as horas de coleta (Tabela 9).

Tabela 13 Concentração de zinco em amostras coletadas em gatos filhotes alimentados com fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis suplementares de zinco BIO.

Item	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor ANOVA	p-valor ^a		EPM ^b
		100%	80%	60%	40%		L	Q	
Consumo (mg/kg/dia)	13,52	16,39	14,83	9,89*	9,88*	<0,01	<0,01	0,27	0,67
Fezes (mg/kg/dia)	11,53	13,41	12,95	8,54	8,16*	<0,01	<0,01	0,82	0,59
Absorção (mg/kg/dia)	1,99	2,98	1,88	1,35	1,72	0,27	-	-	0,24
Urina (mg/kg/dia)	0,25	0,25	0,32	0,27	0,2	0,43	-	-	0,02
Retenção (mg/kg/dia)	1,74	2,73	1,56	1,08	1,52	0,25	-	-	0,24
Pele(mg/kg)	63,28	101,45	63,24	71,49	63,17	0,55	-	-	8,21
Gônada(mg/kg)	90,61	93,65	90,66	85,47	85,83	0,68	-	-	1,99
Pelo(mg/kg)	220,25	214,00	230,14	203,48	197,66	0,12	-	-	4,31

Médias seguidas de asterisco (*) nas linhas diferem da média do controle (100%ING) pelo teste de Dunnett (p<0,05)

^a L = modelo linear; Q = modelo quadrático

^b EPM = erro padrão da média

4. Discussão

4.1. Desempenho dos gatos e crescimento do pelo

Ainda é inexistente estudos em que a troca total de uma gama de microminerais inorgânicos tenha sido feita pela forma de biocomplexo durante a fase de desenvolvimento de gatos, sendo pesquisas encontradas principalmente em aves (Bao et al., 2007; Nollet et al., 2007; Nollet et al., 2008; Aksu et al., 2010) e suínos (Burkett et al., 2009). No presente estudo, a redução da quantidade de Cu, Fe, Mn, Se e Zn suplementado sob a forma biocomplexada nas dietas não afetaram o desempenho de gatos filhotes de 80 dias aos 220 dias de idade. Vale ressaltar que a combinação entre os tipos de ingredientes podem ter favorecido a inclusão de 40% dos microminerais sem prejuízo ao desempenho dos animais, entretanto, não é possível garantir que esse nível seja ideal para outra formulação dietética. Além disso, baseado nas recomendações do NRC (2006) e as suplementações de microminerais realizadas (Tabela 2), todas as dietas atenderam pelo menos a necessidade mínima de gatos em crescimento.

Considerando que no presente estudo o consumo alimentar dos gatos não diferiu entre os níveis suplementares de microminerais, isso implica que não houve comprometimento do olfato ou paladar dos animais em decorrência da menor suplementação mineral. A deficiência do Zn é conhecida por ser invariavelmente acompanhada por alterações no olfato e paladar e conseqüentemente anorexia e perda de peso, mesmo em indivíduos que consomem uma dieta com quantidades marginais do elemento (Brandão-Neto et al., 1995). Uma metaloenzima responsável pela sensação de paladar foi descoberta e relacionada à hipogeusia (Hambidge et al., 1972; Takeda et al., 2004) e disgeusia (Atkin-Thor et al., 1978) em humanos, as quais foram corrigidas após a terapia com zinco. Segundo resultados obtidos em estudo por Henkin et al. (1975), uma Zn proteína (gustina) é um constituinte normal da

saliva parotídea em indivíduos com acuidade normal do paladar; e o tratamento com Zn pode afetar as concentrações da gustina em quadros de hipogeusia (Shatzman e Henkin, 1981).

Da mesma forma, o Cu também parece desempenhar um papel significativo na sensibilidade do paladar. Esse fato foi observado por Henkin et al. (1967) em que a sensibilidade do paladar prejudicado foi associado a menor concentração de ceruloplasmina induzida por droga, mas que a administração de Cu restaurou essa sensibilidade a níveis normais.

De forma semelhante aos resultados obtidos, Nollet et al. (2008), comparando também o efeito de um nível de inclusão padrão de microminerais inorgânicos (Cu, Fe, Mn e Zn) ao biocomplexado (Bioplex[®]), bem como a redução da suplementação do biocomplexo em até 83%, não observaram diferença no peso corporal, ingestão alimentar diária e ganho de peso de frangos de corte. Creech et al. (2004) também não relataram diferença significativa no ganho de peso e consumo médio diário de suínos alimentados com reduzido teor de microminerais (Cu, Fe, Mn e Zn) de fonte biocomplexada e inorgânica. Ott e Johnson (2001) comparando Cu, Mn e Zn sob a forma de proteinato à forma inorgânica não observaram diferença na ingestão alimentar diária, ganho de peso, comprimento corporal e altura de cernelha de cavalos.

No presente estudo, foi observado que os níveis de Se e Zn não foram limitantes para o crescimento de pelo dos animais durante o período experimental, uma vez que os problemas relacionados à redução das taxas de crescimento de pelos são decorrentes principalmente em função da deficiência desses minerais. A deficiência de Se tem sido associada a anormalidades no pelo, o que pode estar relacionado ao papel desse mineral na atividade da enzima iodotironina 5'-deiodinase tipo I, a qual é responsável pela conversão de tiroxina (T4) em 3,3',5' triiodotironina (T3), hormônios necessários para a iniciação da fase anágena do ciclo de crescimento do pelo (Yu et al., 2006). Em cães, esses

autores demonstraram que a taxa de crescimento do pelo é dependente da concentração de Se dietético, sendo a concentração ótima desse elemento para o crescimento do pelo de 0,12 a 1,03mg/kg, usando como fonte do mineral a seleniometionina. No presente estudo, a suplementação de Se variou de 0,12 a 0,30mg/kg, o que corresponde a concentração ótima sugerida por Yu et al. (2006) em cães.

No caso do Zn, segundo Hambidge (1982), quando a deficiência desse elemento é baixa, a taxa de crescimento de cabelo em humanos parece não ser afetada e as concentrações de Zn declinam acentuadamente; entretanto, quando a deficiência é grave, o crescimento de cabelo é retido ou deprimido e as concentrações de Zn nele podem ser normais.

A análise de densidade mineral óssea por meio da densitometria óptica radiográfica tem sido usada para determinar a matéria mineral óssea em diversas espécies (Louzada et al., 1997; Leal, 2002; Santos, 2002; Sterman, 2002) como diagnóstico eficiente e precoce de determinadas alterações nos ossos (Alves e Sterman, 2010), com custo significativamente menor ao observado em outras técnicas. Além disso, tem se mostrado sensível na avaliação de alterações de densidade óssea de felinos frente à dieta (Gallo et al., 1996) e mais eficiente na avaliação da desmineralização quando comparado a análises bioquímicas séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina em gatos (Rahal et al., 2002). O alumínio tem sido usado na confecção da escala por possuir uma curva de absorção de radiação x semelhante a dos ossos (Duinkerke et al., 1978; Lembo, 2006), assim, os valores densitométricos são expressos em equivalentes a milímetros de alumínio (mmAl).

Lembo (2006) em estudo avaliando a densidade mineral óssea do rádio de gatos adultos saudáveis relataram média de 3,7mmAl em fêmeas inteiras e 4,39mmAl em gatos inteiros. Assim, tomando como base esses resultados observados por esse autor, os valores médios de densidade mineral de rádio e

ulna dos gatos apresentaram-se dentro na normalidade. Em estudos avaliando cada mineral traço individualmente como Cu (Suttle et al., 1972), Fe (Medeiros et al., 2002; Katsumata et al., 2009), Se (Moreno-Reyes et al., 2001), Zn (Eberle et al., 1999) e Mn (Strause et al., 1986) foi relatado que a deficiência de um desses elementos pode causar aumento do risco de desenvolvimento de alterações ósseas como a redução da densidade mineral do osso.

Assim como no presente estudo, Ott e Johson (2001) também não observaram diferença no conteúdo mineral ósseo ou deposição mineral óssea de cavalos após a suplementação com Cu, Mn e Zn sob a forma de proteinatos, comparado à forma inorgânica.

4.2. Estado mineral

4.2.1. Cobre

A homeostase do Cu é mantida pelo equilíbrio entre absorção, distribuição, armazenamento e excreção (Schümann et al., 2002). No mecanismo de absorção, a metalotioneína presente no enterócito parece exercer papel fundamental na limitação da quantidade de Cu que passa pela membrana basolateral (Lönnerdal, 2008), impedindo assim alterações agudas na concentração plasmática de Cu (Arredondo et al., 2000). As metalotioneínas são pequenos peptídeos expressos em resposta ao carregamento com metais de transição divalentes como Cu e Zn, em que acredita ser locais para armazenagem e neutralização desses íons metálicos que poderiam ser prejudiciais (Linder e Hazegh-Azam, 1996).

O Cu, uma vez incorporado na metalotioneína na mucosa não é transportado ao plasma mas sim eliminado na descamação das células intestinais (Bremner e Beattie, 1990). Respostas moleculares que comprovam esses mecanismos que ocorrem em enterócitos frente à suplementação de Cu foram observadas em filhotes de ratos por Bauerly et al. (2004). Os autores observaram

que a suplementação com o mineral aumentou a expressão gênica de transportador em vilosidades do intestino delgado (transportador de cobre 1 - Ctr1) e de metalotioneína, porém a expressão gênica do transportador de Cu na membrana basal, o ATP7, não foi significativamente afetada, demonstrando assim a resposta funcional de células do intestino ao tratamento com Cu.

Sendo assim, com base nesses estudos, a maior excreção fecal de Cu no grupo 100%BIO em relação ao grupo 100%ING pode ter sido decorrente da maior deposição do mineral biocomplexado em células intestinais, já que se trata de uma fonte de fácil passagem pela borda em escova por não competir com outros minerais pelo transporte; mas que posteriormente pode ter sido liberado pelo trato gastrointestinal como descamação. Outra hipótese é que, como a excreção biliar é a via mais importante para esse mineral, maior excreção de Cu por essa via pode ter ocorrido, já que a biodisponibilidade do biocomplexo parece ser mais alta, fazendo com que o excesso do mineral que não foi capturado pelos tecidos a partir da ceruloplasmina tenha sido eliminado na bile.

Com base nos níveis de Cu biocomplexado excretados nas fezes, o resultado foi semelhante ao encontrado por Bao et al. (2007) em estudos com frangos de corte consumindo Bioplex[®] Cu em que a excreção de Cu aumentou linearmente com o aumento da suplementação. Assim, afigura-se que a excreção de Cu é baixa quando o Cu dietético é baixo e aumenta à medida que aumenta sua concentração no alimento (Turnlund et al., 1989; Scott e Turnlund, 1994). As adaptações na absorção e excreção endógena ajuda a prevenir o desenvolvimento de condições de deficiência (quando a entrada é baixa) e a toxicidade do Cu (quando o consumo é elevado) (Turnlund et al., 1998).

Geralmente pouco Cu parece ser armazenado porque é relativamente fácil de ser absorvido e excretado na maioria dos mamíferos (Linder et al., 1998). No presente estudo, os resultados semelhantes na concentração de Cu em pele, gônada, absorvido, excretado na urina e retido entre os grupos podem ter

ocorrido devido ao fato de grande parte do Cu intracelular ser reciclado, e as células poderem se adaptar a reduzida disponibilidade, reduzindo a liberação.

Muitos tecidos, bem como o organismo como um todo, têm uma maneira de manter/reter o Cu, não liberando-o quando confrontado com um *déficit* potencial; assim, não é fácil induzir a deficiência desse elemento em mamíferos e há uma adaptabilidade notável a sua concentração dietética que permite a manutenção da homeostase mesmo com relativamente baixo consumo (Linder et al., 1998). Sendo assim, esses resultados reforçam também a ideia de que o fornecimento sob a forma biocomplexada não leva a sua maior retenção. Isso pode ser decorrente do fato de que mesmo fornecendo Cu sob a forma mais disponível, o fator limitante é ainda a velocidade com que são absorvidos.

A determinação de microminerais em cabelo humano é importante na ciência biológica, médica e ambiental, representando uma matriz biológica interessante, até porque também é uma forma de obtenção de amostra não invasiva e que é relativamente inerte (Druyan et al., 1998). Comparado com outros tipos de amostras, o cabelo tem diferentes usos e até mesmo vantagens, já que são passíveis de demonstrar o estado corporal a longo prazo. Conforme indicado por Wysocki e Klett (1971) e Hopps (1977), secreções das glândulas sebáceas e apócrinas contêm minerais que são adsorvidos pelo cabelo, o que sugere a análise do cabelo poder fornecer informações significativas sobre o estado mineral (Reinhold et al., 1968). Entretanto, o uso dessas amostras enfrenta outros desafios como a contaminação externa, falta de padronização e precisão analítica (Bass et al., 2001).

Partindo-se do princípio de que a concentração de Cu no cabelo/pelo é influenciada pela coloração do mesmo (Sarata, 1935), os resultados encontrados no presente estudo podem ter sido decorrentes da diferença de cor de pelagem dos animais entre os grupos. De fato, o Cu é importante na pigmentação do pelo,

uma vez que foi relatado acelerar a oxidação de dopa pela dopa oxidase, formando um pigmento escuro; em outras palavras, o Cu age como um catalisador local para a formação da melanina (Flesch, 1948). Há relato em humanos que o conteúdo de Cu em pele e cabelo preto é um tanto maior que em marrom, que por sua vez excede o branco (Sarata, 1935). De acordo com Flesch (1949), pelagens de cor preta e cinza de coelhos, porquinhos da Índia e ratos apresentavam maiores teores de Cu que a pelagem branca do mesmo indivíduo. Em bezerros, O' Marray et al. (1970) relataram que o nível de Cu na ração afetou sua concentração no pelo e essa mudança pareceu ser mais consistente em pelos brancos quando comparado ao preto e vermelho.

Assim, os resultados obtidos em gatos poderiam ter sido melhores esclarecidos se tivessem sido realizadas análises que determinassem a prevalência de pigmentos (eumelanina vs. feomelanina) em cada grupo alimentar, como possível justificativa para essa resposta observada.

A concentração de Cu no plasma não foi influenciada pelas fontes e níveis suplementares de Cu biocomplexado. Esse resultado corrobora com o encontrado por Bao et al. (2007) em frangos de corte, mas discorda em partes ao encontrado por Ahola et al. (2004), em que bovinos tiveram a concentração plasmática do elemento impactada pela suplementação, mas não pela fonte.

4.2.2. Ferro

No presente estudo foi observado que a homeostase do Fe foi estreitamente mantida independente da fonte e níveis de microminerais sob a forma biocomplexada. Isso ocorre porque uma gama de mecanismos fisiológicos está envolvida na regulação dos níveis desse elemento e sua distribuição no organismo (McCown e Specht, 2011), já que ele de forma não associada leva a danos pelos radicais livres por meio da reação de Fenton (Dunn et al., 2007). Além disso, pelo fato dos mamíferos não possuírem qualquer via fisiológica para

a excreção de Fe, sua regulação homeostática corporal é feita pela absorção (Papanikolaou e Pantopoulos, 2005).

Segundo Andrews (1999) e Finch (1994), sugerem-se existir três mecanismos regulatórios na manutenção da homeostase do Fe. O primeiro é chamado de regulador dietético, em que depois da ingestão de bolus de Fe dietético, enterócitos passam a ser resistentes na aquisição adicional de Fe por diversos dias (Stewart et al., 1950). O segundo sinal controla a absorção do elemento em resposta ao seu armazenamento no organismo e o terceiro modula a absorção dele em resposta a eritropoiese. Devido a maior parte do Fe corporal ser usado pela medula óssea para hemoglobinação das células vermelhas do sangue, não é surpreendente que esse sinal tenha uma função dominante no controle da homeostase do Fe, assim, o regulador eritropoiético tem maior capacidade de aumentar a absorção do Fe quando comparado ao regulador armazenamento (Andrews, 1999).

Assim como discutido no Cu, a concentração de Fe no pelo também está relacionada à coloração do mesmo. Dutcher e Rothman (1951) relataram em humanos que cabelos avermelhados contêm maior quantidade de Fe quando comparado a outros tipos de tonalidade. Ainda assim, em estudo com coelhos e cães sem raça definida, pigmentos de Fe semelhantes ao encontrados em cabelos vermelhos de humanos e penas de galinha foram extraídos (Flesch, 1968). Desse modo, o resultado obtido com a diminuição quadrática para os níveis suplementares de Fe pode ter sido pelo fato da diferença de cor de pelagem dos animais entre os grupos.

Os níveis de Fe no plasma são determinados tanto pela absorção intestinal quanto pela reciclagem do macrófago de Fe a partir da hemoglobina. Efeitos regulatórios que modulam a absorção desse elemento no intestino provavelmente também modulam a liberação dele a partir de macrófagos teciduais e hepatócitos. A hepcidina é um candidato atrativo como um regulador

solúvel que age para atenuar tanto a absorção do ferro intestinal e liberação de Fe pelo macrófago (Hentze et al., 2004). Da mesma forma como no presente estudo, Bao et al. (2007) não observaram diferença na concentração de Fe plasmático em frangos independente da fonte ou nível de suplementação. Já Schiavon et al. (2000), relataram que sob baixo nível de suplementação de Fe a concentração plasmática do elemento em leitões tendeu a ser maior do que em altos níveis suplementares para ambas as fontes minerais (proteinato e sulfato).

4.2.3. Manganês

A avaliação do estado de Mn é difícil devido a dois fatores: sua baixa concentração em materiais biológicos e facilidade de contaminação com o elemento a partir de fontes externas durante os procedimentos para análise (Versieck, 1985). Dessa forma, a determinação da absorção e armazenamento de Mn não tem sido estudada amplamente. Sua absorção é muito baixa, o que significa ser necessária metodologia altamente sensível e de alta precisão para a determinação da sua biodisponibilidade (Davidson et al., 1995). Assim, a não detecção de Mn na pele, fezes, urina e plasma pode ter sido decorrente do uso da metodologia empregada em relação a quantidade do mineral presente nessas amostras, sendo então sugerido em estudos subsequentes o uso de metodologias de alta precisão como o uso de espectrofotometria de forno de grafite.

Diversos mecanismos fisiológicos existem para manter relativamente constante as concentrações teciduais de Mn em decorrência de flutuações na sua ingestão (Schroeder et al., 1966). Entretanto, nos gatos alimentados com 60% e 40%BIO esses mecanismos não foram suficientes para manter as concentrações na gônada, assim como foi observada redução linear conforme foi reduzindo o fornecimento do mineral sob a forma de biocomplexo. No pelo, Guillard et al. (1984) demonstraram que a concentração de Mn no cabelo escuro é maior do que cabelos grisalhos, fato esse que pode ter ocorrido no presente estudo que

justificam tanto a menor concentração do elemento no pelo de gatos que consumiram 80% e 60%BIO e o comportamento quadrático entre os níveis do biocomplexo.

4.2.4. Selênio

A levedura enriquecida com Se usada na indústria alimentar nem sempre demonstra efeitos positivos, até porque a sua composição é complexa (Zhan et al., 2007). Embora a selenometionina seja a forma de selênio mais predominante em leveduras selenizadas (Polatajko et al., 2003), representando adequadamente 40% do total de análogos de seleno aminoácidos (Kelly e Power, 1995), grande parte pode não estar ligada dentro de proteínas, mas fisicamente associado com um número de macromoléculas, principalmente constituintes da parede celular (Polatajko et al., 2003).

A excreção fecal de Se permanece constante sobre uma vasta ingestão do mineral (Wedekind et al., 2010), fato esse que ocorreu no presente estudo em que independente da quantidade do elemento consumido pelos animais a sua concentração nas fezes foi semelhante. Já quando avaliada a absorção e retenção diária, essas foram menores nos grupos 60% e 40%BIO e 80%, 60% e 40%BIO, respectivamente, ambos em relação ao 100%ING e reduziu linearmente com a diminuição dos níveis suplementares possivelmente em decorrência do consumo do elemento ter apresentado comportamento semelhante.

Por outro lado, a urina é considerada a maior via de excreção do Se em monogástricos; e está intimamente relacionada à ingestão do mesmo (McDowel, 1992), mas não parece estar relacionada à sua forma química dietética (Shiobara et al., 1998). Nos gatos, foi observado que aqueles que consumiram as formas biocomplexadas na mesma concentração (100%BIO), ou próximas (80%BIO) àqueles que o consumiram sob a forma inorgânica (100%ING) apresentaram maior excreção urinária do elemento, sugerindo assim que a forma química do

Se dietético pode vir a influenciar sua excreção pela urina. Ainda assim, a concentração de Se na urina foi relacionada à ingestão dietética, uma vez que houve aumento linear na excreção de Se urinário com o aumento da suplementação BIO.

Comparado com a forma inorgânica, o Se organicamente complexado tem mostrado ter maior deposição tecidual em diversas espécies (Zhan et al., 2007; Kim e Mahan, 2001; Wang e Xu, 2008; Wang et al., 2007; Juniper et al., 2009); além do que, existe diferença na capacidade de mudança da concentração de Se entre os tecidos frente a fonte e nível suplementar do elemento (Zhan et al., 2007; Wang e Xu, 2008; Juniper et al., 2009). Nos gatos, a pele, quando comparado à gônada, pareceu refletir melhor o efeito das fontes e níveis suplementares.

No pelo foi observado maior concentração de Se em todos os grupos de animais suplementados com fonte BIO quando comparado aqueles animais que consumiram minerais de fonte inorgânica. Isso possivelmente ocorreu devido a um metabolismo mais eficiente da fonte biocomplexada, 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 (Allan et al., 1999; Behne e Kyriakopoulos, 2001). Uma característica consistente de todas as análises do pelo é o elevado teor do aminoácido contendo enxofre, cistina, na quantidade que se aproxima de 10%; e a metionina é o substituto mais eficiente para a cistina em diversas espécies, podendo esse aminoácido ainda ser convertido à cistina no organismo (Ryder, 1958). Assim como no presente estudo, Kim e Mahan (2001) também observaram maior concentração de Se no pelo quando fornecida a suínos a fonte biocomplexada (levedura enriquecida com Se) após 12 semanas de suplementação, quando comparado ao inorgânico (selenito de sódio), o que foi justificado pelo fato do Se biocomplexado ter sido

convertido a partir da selenometionina em selenocisteína através da via cistationina (Esaki et al., 1981). Shiobara et al. (1998) também relataram concentrações extremamente mais altas de Se em pelo de ratos alimentados com Se-metionina quando comparado a selenito de sódio.

Quanto à concentração de Se no plasma, em estudos com outras espécies (Kim e Mahan, 2001; Cao et al., 2014; Shiobara et al., 1998; Wang et al., 2011; Payne e Southern, 2005), foi observada maior concentração plasmática de Se em animais suplementados com o mineral biocomplexado em relação a inorgânica. Mas, em contraste ao que foi observado em gatos, há relatos de que a concentração plasmática desse elemento pode ser comportar de forma dose-dependente (Shiobara et al., 1998; Goehring et al., 1984; Kim e Mahan 2001).

4.2.5. Zinco

A excreção de Zn nas fezes é regulada de acordo com mudanças na absorção e status de Zn, o que é importante na manutenção da homeostase do elemento (Hambidge, 2003). Foi observado nesse estudo que o grupo 40%BIO apresentou menor excreção fecal do mineral em relação ao grupo 100%ING, o que pode ter sido decorrente do consumo de Zn ter sido também significativamente menor. Entretanto a absorção, concentração na urina, retido e presente na pele, gônada e pelo não diferiram entre as fontes e níveis suplementares, o que mostra o estreito controle da homeostase desse elemento no corpo, feito principalmente pelos mecanismos de absorção e excreção. Em outras palavras, a ingestão do Zn tem demonstrado induzir a síntese de metalotioneína intestinal (Sandoval et al., 1997), de forma que o aumento nessa síntese está associada a redução na absorção, o que influencia a regulação da absorção do elemento e possivelmente a resposta do animal a diferentes níveis suplementares (Sahraei e Janmohammadi, 2014).

No plasma, a fonte e os níveis suplementares não influenciaram a concentração do Zn. Esses resultados discordam do encontrado por Liu et al. (2013) em que tanto a fonte (sulfato vs. proteinato) quanto os níveis influenciaram a concentração plasmática do elemento.

Com base nos resultados obtidos, a completa substituição de microminerais de fonte inorgânica por biocomplexados na forma de proteinatos reduzindo-os em até 60% da recomendação do NRC (2006) não interfere no desenvolvimento e estado mineral de gatos filhotes.

Referências

- Ahola, J.K., Baker, D.S., Burns, P.D., Mortimer, R.G., Enns, R.M., Whittier, J.C., Geary, T.W., Engle, T.E., 2004. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. *J. Anim. Sci.* 82, 2375–2383.
- Aksu, D., Aksu, T., Özsoy, B., Baytok, E., 2010. The effects of replacing inorganic with a lower level of organically complexed minerals (Cu, Zn and Mn) in broiler diets on lipid peroxidation and antioxidant. *Asian-Australasian J. Anim. Scis.* 23, 1066–1072.
- Allan, C.B., Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C., 1999. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 1–16.
- Alves, J.D.S., Serman, F.A., 2010. Determinação da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio de cães da raça rottweiler, por meio da densitometria óptica radiográfica. *Veterinária e Zootecnia* 17, 229–237.
- Andrews, N.C., 1999. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341, 1986–1995.
- Arredondo, M., Uauy, R., González, M., 2000. Regulation of copper uptake and transport in intestinal cell monolayers by acute and chronic copper exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1474, 169–176.

- Atkin-Thor, E., Goddard, B.W., O’Nion, J., Stephen, R.L., Kolff, W.J., 1978. Hypogeusia and zinc depletion in chronic dialysis patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 31, 1948–1951.
- Bao, Y.M., Choct, M., Iji, P. a., Bruerton, K., 2007. Effect of organically complexed copper, iron, manganese, and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. *J. Appl. Poult. Res.* 16, 448–455.
- Bass, D. A., Hickok, D., Quig, D., Urek, K., 2001. Trace element analysis in hair: Factors determining accuracy, precision, and reliability. *Alternative Medicine Review* 6, 472–481.
- Bauerly, K. A., Kelleher, S.L., Lönnerdal, B., 2004. Functional and molecular responses of suckling rat pups and human intestinal Caco-2 cells to copper treatment. *J. Nutr. Biochem.* 15, 155–162.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A., 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 453–473.
- Brandão-Neto, J., Stefan, V., Mendonça, B.B., Bloise, W., Castro, A.V.B., 1995. The essential role of zinc in growth. *Nutrition Research* 15, 335–358.
- Bremner, I., Beattie, J.H., 1990. Metallothionein and the trace minerals. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 63–83.
- Brinkhaus, F., Mann, J., Zorich, C., Greaves, J.A., 1998. Nutrition for health bioavailability of zinc propionate in dogs. *J. Nutr.* 128, 2596–2597.
- Burkett, J.L., Stalder, K.J., Powers, W.J., Bregendahl, K., Pierce, J.L., Baas, T.J., 2009. Effect of inorganic and organic trace mineral supplementation on the performance, carcass characteristics, and fecal mineral excretion of phase-fed, grow-finish swine. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 22, 1279–1287.
- Cao, J., Guo, F., Zhang, L., Dong, B., Gong, L., 2014. Effects of dietary selenomethionine supplementation on growth performance, antioxidant status, plasma selenium concentration, and immune function in weaning pigs. *J. Anim. Sci. and Biotechnology* 5, 1–7.

- Chou, W.S., Savage, J.E., O'Dell, B.L., 1969. Role of copper in biosynthesis of intramolecular cross-links in chick tendon collagen. *J. Biol. Chem.* 244, 5785–5789.
- Crane, S.W., 1996. Orquiectomia de testículos descidos e retidos no cão e no gato, in: Bojrab, M. J. (Ed.), *Tecnicas atuais em cirurgia de pequenos animais*, Roca, São Paul, pp. 391-396.
- Creech, B.L., Spears, J.W., Flowers, W.L., Hill, G.M., Lloyd, K.E., Armstrong, T. a., Engle, T.E., 2004. 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. *J. Anim. Sci.* 82, 2140–2147.
- Davidsson, L., Almgren, A., Juillerat, M.A., Hurrell, R.F., 1995. Manganese absorption in humans: The effect of phytic acid and ascorbic acid in soy formula. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 984–987.
- Dibner, J.J., Richards, J.D., Kitchell, M.L., Quiroz, M. A., 2007. Metabolic challenges and early bone development. *J. Appl. Poult. Res.* 16, 126–137.
- Druyan, M.E., Bass, D., Puchyr, R., Urek, K., Quig, D., Harmon, E., Marquardt, W., 1998. Determination of reference ranges for elements in human scalp hair. *Biol. Trace Elem. Res.* 62, 183–197.
- Duinkerke, A.S.H., Van de Poel, A.C.M., Van der Linden, F.P.G.M., Doesburg, W.H., Lemmens, W.A.J.G., 1978. Compensation of differences in density of radiographs by densitometry. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 45, 637–642.
- Dunn, L.L., Rahmanto, Y.S., Richardson, D.R., 2007. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 17, 93–100.
- Dutcher, T.F., Rothman, S., 1951. Iron, Copper and Ash Content of Human Hair of Different Colors I. *J. Invest. Dermatol.* 17, 65–68.
- Eberle, J., Schmidmayer, S., Erben, R.G., Stangassinger, M., Roth, H.P., 1999. Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 13, 21–26.

- Esaki, N., Nakamura, T., Tanaka, H., Suzuki, T., Morino, Y., Soda, K., 1981. Enzymatic synthesis of selenocysteine in rat liver. *Biochemistry* 20, 4492–4496.
- Finch, C., 1994. Regulators of iron balance in humans. *Blood* 84, 1697–1702.
- Fingland, R.B., 1996. Ovarioisterectomia, in: Bojrab, M. J. Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais. Roca, São Paulo, pp. 375-380.
- Flesch, P. Chemical studies of the iron pigments of red hair and feathers., 1968. *J. Soc. Cosmetic Chemist.* 19, 675–681.
- Flesch, P., 1949. The role of copper in mammalian pigmentation. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 70, 79–80.
- Flesch, P., 1948. Studies on the role of copper in mammalian pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 11, 157–159.
- Gallo, R.N., Rahal, S.C., Vulcano, L.C., 1996. Avaliação da densidade óssea em gatos em crescimento submetidos a dois tipos de ração. In: *Proc. Congresso Panamericano de Ciências Veterinária*, 15, pp.78.
- Goehring, T.B., Palmer, I.S., Olson, O.E., Libal, G.W., Wahlstrom, R.C., 1984. Toxic effects of selenium on growing swine fed corn-soybean meal diets. *J. Anim. Sci.* 59, 733–737.
- Guillard, O., Brugier, J.C., Piriou, A., Ménard, M., Gombert, J., Reiss, D., 1984. Improved determination of manganese in hair by use of a mini-autoclave and flameless atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction: an evaluation in unexposed subjects. *Clin. Chem.* 30, 1642–1645.
- Hambidge, K.M., 1982. Hair analyses: worthless for vitamins, limited for minerals. *Am. J. Clin. Nutr.* 36, 943–949.
- Hambidge, K.M., Hambidge, C., Jacobs, M., Baum, J.D., 1972. Low levels of zinc in hair, anorexia, poor growth, and hypogeusia in children. *Pediatr. Res.* 6, 868–874.
- Hambidge, M., 2003. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J. Nutr.* 133, 948S–955S.

- Henkin, R., Keiser, H., Jaffe, I., Sternlieb, I., Scheinberg, I.H., 1967. Decreased taste sensitivity after D-penicillamine reversed by copper administration. *Lancet*. 290, 1268–1271.
- Henkin, R.I., Lippoldt, R.E., Bilstad, J., Edelhoeh, H., 1975 A zinc protein isolated from human parotid saliva. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 72, 488–492.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Andrews, N.C., 2004. Balancing acts : molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 117, 285–297.
- Hopps, H.C., 1977. The biologic bases for using hair and nail for analyses of trace elements. *Sci. Total Environ*. 7, 71–89.
- Jamikorn, U., Preedapattarapong, T., 2008. Comparative effects of zinc methionylglycinate and zinc sulfate on hair coat characteristics and zinc concentration in plasma, hair, and stool of dogs. *Thai J. Vet. Med*. 38, 9–16.
- Jianhua, H., Ohtsuka, A.; Hayashi, K., 2000. Selenium influences growth via thyroid hormone status in broiler chickens. *Brit. Poult. Sci.* 84, 727-732.
- Juniper, D.T., Phipps, R.H., Ramos-Morales, E., Bertin, G., 2009. Effects of dietary supplementation with selenium enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol*. 149, 228-239.
- Katsumata, S., Katsumata-Tsuboi, R., Uehara, M., Suzuki, K., 2009. Severe iron deficiency decreases both bone formation and bone resorption in rats. *J. Nutr*. 139, 238–243.
- Kelly, M.P., Power, R.F., 1995. Fractionation and identification of the major selenium compounds in selenized yeast. *J. Dairy Sci*. 78, 237.
- Kim, Y.Y., Mahan, D.C., 2001. Effect of dietary selenium source, level, and pig hair color on various selenium indices. *J. Anim. Sci*. 79, 949–955.
- Leal, A.C.R. (Master's thesis) 2002. 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. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.

- Lembo M. (Master's thesis) 2006. Estudo comparativo da densidade mineral óssea (DMO) em gatos domésticos (*Felis catus*) castrados e não castrados, por meio da técnica de densitometria óptica radiográfica. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Linder, M.C., Hazegh-Azam, M., 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 797S-811S.
- Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N., 1998. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 965–971.
- Liu, S.B., Li, S.F., Lu, L., Xie, J.J., Zhang, L.Y., Wang, R.L., Luo, X.G., 2013. The effectiveness of zinc proteinate for chicks fed a conventional corn-soybean meal diet. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 396–403.
- Lönnerdal, B., 2008. Intestinal regulation of copper homeostasis: A developmental perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 846–850.
- Louzada, M.J.Q., Pelá, C.A., Belangero, W.D., Santos-Pinto, R., 1997. Densidade de peças ósseas de frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. *Veterinária e Zootecnia.* 9, 95-109.
- Lowe, J.A., Wiseman, J., 1998. A comparison of the bioavailability of three dietary zinc sources using four different physiologic parameters in dogs. *J. Nutr.* 128, 2809S–2811S.
- McCown, J.L., Specht, A.J., 2011. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47, 151–160.
- McDowell, L.R., 1992. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. second ed. Academic Press, California.
- Medeiros, D.M., Plattner, A., Jennings, D., Stoecker, B., 2002. Bone morphology, strength and density are compromised in iron-deficient rats and exacerbated by calcium restriction. *J. Nutr.* 132, 3135–3141.
- Michel, C., 1993. Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. *Laboratory animals.* 27, 278–280.
- Miles, R.D., Henry, P.R. 2000 Relative trace mineral bioavailability. *Ciênc. Anim. Bras.* 2, 73-93.

- Moreno-Reyes, R., Egrise, D., Nève, J., Pasteels, J.L., Schoutens, A., 2001. Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1556–1563.
- Muller, D.C.D.M., Schossler, J.E., Pinheiro, M., 2008. Adaptação do índice de massa corporal humano para cães. *Ciência Rural* 38, 1038–1043.
- Nollet, L., Huyghebaert, G., Spring, P., 2008. Effect of different levels of dietary organic (bioplex) trace minerals on live performance of broiler chickens by growth phases. *J. Appl. Poult. Res.* 17, 109–115.
- Nollet, L., Van Der Klis, J.D., Lensing, M., Spring, P., 2007. The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. *J. Appl. Poult. Res.* 16, 592–597.
- NRC.(National Research Council).Nutrient Requirements of Dogs and Cats. Washington, DC: National Academies Press, 2006.
- O'Mary, C.C., Bell, M.C., Sneed, N.N., Butts, W.T..J., 1970. Influence of ration copper on minerals in the hair of Hereford and Holstein calves. *J. Anim. Sci.* 31, 626–630.
- Ott, E.A., Johnson, E.L., 2001. Effect of trace mineral proteinates on growth and skeletal and hoof development in yearling horses. *J. Equine Vet. Sci.* 21, 287–291.
- Papanikolaou, G., Pantopoulos, K., 2005. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 199–211.
- Payne, R.L., Southern, L.L., 2005. Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers. *Poult. Sci.* 84, 898–902.
- Połatajko, A., Śliwka-Kaszyńska, M., Dernovics, M., Ruzik, R., Ruiz Encinar, J., Szpunar, J., 2004.A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast. *J. Anal. At.Spectrom.*19, 114.
- Rahal, S.C., Mortari, A.C., Caporali, E.H.G., Vulcano, L.C., dos Santos, F.A.M.; Takahira, R.K., Crocci, A.J., 2002.Densitometria ópticardiográfica na

- avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. *Ciência Rural*. 32, 421-425
- Reinhold, J.G., Kfoury, G.A. Arslanian, M. 1968. Relation of zinc and calcium concentrations in hair to zinc nutrition in rats. *J. Nutr.* 96, 519–524.
- Ryder, M.L. 1958. Nutritional factors influencing hair and wool growth. In: Montagna, W., Ellis, R.A. (Eds.), *The Biology of Hair Growth*. Academic Press, New York, pp. 305-334.
- Sahraei, M., Janmohammadi, H., 2014. Relative bioavailability of different zinc sources based on tissue zinc concentration in broiler chickens. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 4, 817-825.
- Sandoval, M., Henry, P.R., Ammerman, C.B., Miles, R.D., Littell, R.C., 1997. Relative bioavailability of supplemental inorganic zinc sources for chicks. *J. Anim. Sci.* 75, 3195–3205.
- Santos, F. A. M. (Master's thesis) 2002. Determinação dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio-ulna em gatos, por meio da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas: correlação entre peso, sexo, idade. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.
- Sarata, U., 1935. Studies in the biochemistry of copper. Copper and pigmentation of skin and hair. *Japanese Journal of Medical Sciences*. II. Biochemistry. 3, 79–84.
- Schiavon, S., Bailoni, L., Ramanzin, M., Vincenzi, R.; Simonetto, A.; Bittante, G. 2000. Effect of proteinate or sulphate mineral sources on trace elements in blood and liver of piglets. *Anim. Sci.* 71, 131–139.
- Schroeder, H.A., Balassa, J.J., Tipton, I.H., 1966. Essential trace metals in man: Manganese. *J. Chron. Dis.* 19, 545–571.
- Schümann, K., Classen, H.G., Dieter, H.H., König, J., Multhaup, G., Rückgauer, M., Summer, K.H., Bernhardt, J., Biesalski, H.K., 2002. Hohenheim consensus workshop: copper. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 469–483.
- Scott, K., 1994. Compartmental model of copper metabolism in adult men. *J Nutr Biochem* 5, 342–350.

- Seibel, M.J., Robins, S.P., Bilezikian, J.P., 1992. Urinary pyridinium crosslinks of collagen Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 3, 263–270.
- Shatzman, A R., Henkin, R.I., 1981. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78, 3867–3871.
- Shiobara, Y., Yoshida, T., Suzuki, K.T., 1998. Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152, 309–314.
- Sterman, F.A. (PhD's dissertation) 2002. Avaliação da densidade óssea de equinos atletas destinados ao Enduro Equestre. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Stewart, W.B., Yuile, C.L., Claiborne, H.A., Snowman, R.T., Whipple, G.H., 1950. Radio iron absorption in anemic dogs; fluctuations in the mucosal block and evidence for a gradient of absorption in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 92, 375–382.
- Strause, L.G., Hegenauer, J., Saltman, P., Cone, R., Resnick, D., 1986. Effects of long-term dietary manganese and copper deficiency on rat skeleton. *J. Nutr.* 116, 135–141.
- Suttle, N.F., Angus, K.W., Nisbet, D.I., Field, A.C., 1972. Osteoporosis in copper-depleted lambs. *J. Comp. Pathol.* 82, 93–97.
- Takeda, N., Takaoka, T., Ueda, C., Toda, N., Kalubi, B., Yamamoto, S., 2004. Zinc deficiency in patients with idiopathic taste impairment with regard to angiotensin converting enzyme activity. *Auris Nasus Larynx.* 31, 425–428.
- Tsopanakis, A., Herries, D. G., 1978. Bovine galactosyl transferase. *Eur. J. Biochem.* 83, 179–188.
- Tsukahara, H., Deguchi, Y., Miura, M., Hata, K., Hori, C., Hiraoka, M., Kusaka, Y., Sudo, M., 1996. Selenium status and skeletal tissue metabolism in young infants. *Eur. J. Pediatr.* 155, 148–149.
- Tuderman, L., Myllylä, R., Kivirikko, K.I., 1977. Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 1. Role of co-substrates. *Eur. J. Biochem.* 80, 341–348.

- Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Anderson, H.L., Acord, L.L., 1989. Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ^{65}Cu . *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 870–878.
- Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Peiffer, G.L., Scott, K.C., 1998. Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope ^{65}Cu . *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1219–1225.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F. 1999. Natural Sources of Minerals, in: Underwood, E.J., Suttle, N.F. (Eds.), *The Mineral Nutrition of Livestock*, CABI Publishing, New York, pp. 17-46.
- Versieck, J., 1985. Trace elements in human body fluids and tissues. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 22, 97–184.
- Wang, Y., Han, J., Li, W., Xu, Z., 2007. Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Anim. Feed Sci. Tech.* 134, 243–251.
- Wang, Y.-B., Xu, B.-H., 2008. Effect of different selenium source (sodium selenite and selenium yeast) on broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Tech.* 144, 306–314.
- Wang, Y.X., Zhan, X. a., Yuan, D., Zhang, X.W., Wu, R.J., 2011. Effects of selenomethionine and sodium selenite supplementation on meat quality, selenium distribution and antioxidant status in broilers. *Czech. J. Anim. Sci.* 56, 305–313.
- Wedekind, K.J., Kats, L., Yu, S., Paetau-Robinson, I., Cowell, C.S. 2010. Micronutrients: Minerals and Vitamins, in: Hand, M.S., Thatcher, C.D., Remillard, R. L., Roudebush, P., Novotny, B. J. *Small Animal Clinical Nutrition*. Mark Morris Institute, Kansas, pp. 107-148.
- Wysocki, A.A., Klett, R.H., 1971. Hair as an indicator of the calcium and phosphorus status of ponies. *J. Anim. Sci.* 32, 74–78.
- Yamaguchi, M., 2010. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol. Cell Biochem.* 338, 241–254.

Yu, S., Wedekind, K.J., Kirk, C. a, Nachreiner, R.F., 2006. Primary hair growth in dogs depends on dietary selenium concentrations. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 90, 146–151.

Zhan, X., Wang, M., Zhao, R., Li, W., Xu, Z., 2007. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 132, 202–211.

(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 2 Suplementação de microminerais inorgânicos e biocomplexados na atividade de metaloenzimas, metabolismo de ferro e índices hematológicos e imunológicos de gatos em crescimento

Artigo formatado segundo as normas da revista *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*

Resumo

Trinta gatos com 80 dias de idade ($919,16 \pm 120,34\text{g}$) foram usados com o objetivo de determinar os efeitos de fontes inorgânicas vs. biocomplexadas e diminuição suplementar de Cu, Fe, Mn, Se e Zn na atividade de metaloenzimas, metabolismo de Fe e índices hematológicos e imunológicos. Microminerais inorgânicos (ING) foram comparados a quatro níveis de microminerais biocomplexados (BIO) sob a forma de proteinatos (Bioplex[®]TR Se). A dieta 100%ING foi suplementada com 8,4mgCu/kg (sulfato), 80mg de Fe/kg (sulfato), 4,80mg de Mn/kg (sulfato), 0,30mg de Se/kg (selenito) e 75mg de Zn/kg (sulfato); e o Bioplex[®]TR Se foi usado como substituto na mesma concentração mineral (100%BIO) ou em proporções menores (80%BIO, 60%BIO e 40%BIO) nas demais dietas, totalizando cinco tratamentos. Os animais foram alimentados durante 140 dias com as dietas em delineamento inteiramente ao acaso, totalizando 6 repetições por tratamento. Não houve diferença ($p>0,05$) entre as fontes ING e BIO, nos seus diferentes níveis, para atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), fosfatase alcalina (FA); níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA); Fe sérico; concentração de transferrina; capacidade latente (CLLFe) e total de ligação do ferro (CTLFe); índice de saturação da transferrina (IST); hemograma (exceto hemoglobina corpuscular média – HCM), leucócitos e linfócitos totais. Comparado com a fonte inorgânica (100%ING), o grupo suplementado com 80%BIO apresentou maior atividade da ceruloplasmina; e todos os grupos que receberam o biocomplexo apresentaram maior hemoglobina corpuscular média (HCM) ($p<0,05$). A atividade da ceruloplasmina aumentou quadraticamente com o aumento da suplementação BIO ($p<0,05$). Conclui-se que a suplementação de níveis menores de microminerais organicamente complexados sob a forma de proteinato (Bioplex[®]TR Se), em vez de suas formas inorgânicas, não afeta negativamente a defesa antioxidante, atividade enzimática, parâmetros

relacionados ao metabolismo de ferro e índices hematológicos de gatos em crescimento.

Palavras-chave: defesa antioxidante, enzimas, filhotes, minerais.

Introdução

Microminerais como cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) são essenciais para a atividade de diversas enzimas celulares, participando então de vários processos bioquímicos. A importância da deficiência de microminerais está relacionada, dentre outros motivos, ao fato deles estarem presentes em diversas enzimas, como as antioxidantes: a superóxido dismutase (Cu, Zn e Mn) e glutatona peroxidase (Se), bem como na ceruloplasmina (Cu) e fosfatase alcalina (Zn). Mas também vale ressaltar que os microminerais desempenham função na manutenção de fatores hematológicos (ferro, cobre e zinco), metabolismo de lipídeos (cobre) e função imunológica (ferro, cobre, selênio e zinco). Assim, a determinação da atividade enzimática ou de componentes essenciais metabólicos têm sido usados como critérios de avaliação da biodisponibilidade de minerais, uma vez que funções fisiológicas são progressivamente afetadas pela deficiência desses elementos (Miles e Henry, 2000).

Nos mecanismos de defesa antioxidante, a SOD é responsável por acelerar a conversão do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é então reduzido pela GPx em água (Finkel e Holbrook, 2000). Isso evita que o radical livre ataque lipídeos de membrana, resultando na produção de outros compostos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA). A ceruloplasmina é uma enzima que possui diversas funções no organismo como: em reações de fase aguda da inflamação (Aggett, 1985; Linder e Hazeg-Azam, 1996); na defesa antioxidante; no transporte de Cu do fígado para outros órgãos (Linder et

al., 1998) e auxilia na liberação ou ligação de Fe de armazenamento para transferrina (Linder e Hazeq-Azam, 1996).

A fosfatase alcalina é uma enzima que requer o Zn como cofator (Adeniyi e Heaton, 1980) na catalização da hidrólise de fosfomonoésteres com a liberação de fosfato inorgânico (Mornet et al., 2001) e é um importante marcador da atividade osteoblástica (Sabokbar et al., 1994).

Nos parâmetros hematológicos o Fe é usado em sua maioria pelas células precursoras eritróides na produção de hemoglobina (McCown e Specht, 2011). O Cu está relacionado à manutenção do fornecimento de Fe funcional devido à importância de proteínas que contêm Cu, como a hefaestina e ceruloplasmina (Bohn, 2015), de modo que a deficiência desse elemento resulta na diminuição da liberação de Fe do enterócito para o plasma e de tecidos de armazenamento de Fe (Harvey, 2008). A redução do fornecimento de Zn tem sido associada a danos (Kraus et al., 1997; Shakoori et al., 1990) ou inibição da formação de eritrócitos (Shakoori et al., 1990).

Quanto ao sistema imunológico, os microminerais são totalmente relevantes e podem ser usados como estratégia para otimizar a função desse sistema, principalmente pela redução do estresse metabólico e oxidativo (Andrieu, 2008; Weiss e Wyatt, 2002). Os microminerais também podem exercer importante função no sistema imune, por meio de mecanismos específicos como, por exemplo, no caso do Zn que afeta a imunidade via seu papel importante na replicação e proliferação celular (Spears e Weiss, 2008).

A suplementação de microminerais nas dietas de gatos filhotes tem sido feita tradicionalmente por meio da utilização de sais inorgânicos como sulfatos e óxidos. No entanto, após a descoberta de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem vir a afetar a biodisponibilidade dos elementos sob essa forma, tentativas têm sido lançadas no intuito de melhorar sua utilização por animais (Buzadźc et al., 2002). Assim, a proposta do uso de minerais

organicamente complexados como, por exemplo, metal proteinato, tem sido de grande interesse na nutrição animal. Ainda assim, devido a sua maior biodisponibilidade, a necessidade de inclusão de microminerais sob a forma biocomplexada na dieta parece ser menor (Richards et al., 2010; Schiavon et al., 2000).

Dessa forma, objetiva-se com o presente estudo determinar os efeitos da redução suplementar de Cu, Fe, Mn, Se e Zn na forma de proteinato sobre a atividade de metaloenzimas, metabolismo de ferro e índices hematológicos e imunológicos de gatos em crescimento.

Material e métodos

Todos os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões/ Permanentes/PRP-UFLA- Protocolo nº 049/13).

Animais

Trinta gatos filhotes saudáveis, sendo 15 machos e 15 fêmeas foram distribuídos de forma semelhante entre as dietas experimentais. Os filhotes aos 80 dias de idade e com peso médio inicial de $919,16 \pm 120,34$ g, foram alojados em gaiolas suspensas com dimensões de 0,8 x 0,8 x 1,0m (altura x profundidade x largura). As vacinas foram realizadas aos 60, 90 e 120 dias de idade (Nobivac Feline, MSD Saúde Animal Inc., Alemanha) e vermifugação aos 30 e 45 dias de idade (Basken Suspensão, König Inc., Argentina). O estudo foi conduzido durante 120 dias.

Dietas experimentais e manejo alimentar

Os filhotes foram distribuídos em cinco tratamentos (dietas experimentais secas extrusadas): (1) 100% ING [100% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte inorgânica]; (2) 100% BIO [100% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada]; (3) 80% BIO [80% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada]; (4) 60% BIO [60% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada]; (5) 40% BIO [40% da suplementação de microminerais recomendada pelo NRC (2006) de fonte biocomplexada] (Tabela 1).

As recomendações de microminerais indicadas pelo NRC (2006) para dietas de gatos filhotes são: 8,4mg de Cu/kg; 80mg de Fe/kg; 4,8mg de Mn/kg; 0,3mg de Se/kg e 75mg de Zn/kg, na matéria seca, considerando um alimento com aproximadamente 4000kcal de energia metabolizável/kg. As dietas foram isoenergéticas e isoproteicas, diferenciando apenas na quantidade e fonte de microminerais suplementados (Tabelas 2 e 3).

Os microminerais inorgânicos foram suplementados como sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, selenito de sódio e sulfato de zinco. A fonte de mineral biocomplexada foi fornecida por fontes proteínicas disponíveis comercialmente (Bioplex[®]TR Se Gatos, Alltech Inc., Estados Unidos), obtida a partir de proteína de soja hidrolisada enzimaticamente; exceto o Se biocomplexado, que foi a partir de uma proteína de levedura, principalmente como selenometionina. Os alimentos foram fornecidos diariamente na quantidade de 150gramas, possibilitando a obtenção de sobra. Água foi fornecida *ad libitum*.

Tabela 1 Ingredientes das dietas experimentais secas extrusadas para gatos filhotes.

Ingredientes (g/kg na matéria natural)	100% ING	100% BIO	80% BIO	60% BIO	40% BIO
Farinha de vísceras de frango	243,33	243,33	243,33	243,33	243,33
Arroz quirera	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Soja farelo 45%	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Milho grão	94,90	94,90	94,90	94,90	94,90
Farinha de peixe	82,21	82,21	82,21	82,21	82,21
Óleo de frango	60,39	60,39	60,39	60,39	60,39
Farelo de trigo	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Palatabilizante	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Semente de linhaça	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Premix vitamínico*	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Acidificante	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mananoligossacarídeo	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
DL-metionina	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Taurina	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67
Corante	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Propionato de cálcio	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Extrato de <i>Yucca schidigera</i>	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Premix inorgânico†	2,00	-	-	-	-
Premix biocomplexado‡	-	2,00	1,60	1,20	0,80
Inerte (caulim)	-	-	0,40	0,80	1,20

*Premix vitamínico forneceu os seguintes níveis de vitaminas por quilograma de alimento: vitamina A (18000UI), vitamina D3 (1200UI), vitamina E (200UI), vitamina K (0,15mg), tiamina (25mg), riboflavina (15mg), ácido pantotênico (35mg), niacina (150mg), piridoxina (10mg), ácido fólico (2mg), biotina (0,2mg) vitamina B12 (0,07mg), colina (2200mg).

†Premix mineral inorgânico continha no mínimo, por quilograma do premix: 40500mg de ferro (sulfato de ferro), 4200mg de cobre (sulfato de cobre), 2400mg de manganês (sulfato de manganês), 37500mg de zinco (sulfato de zinco), 1820mg de iodo (iodato de cálcio), 150mg de selênio (selenito de sódio)

‡Premix mineral biocomplexado continha no mínimo, por quilograma do premix: 40500mg de ferro (proteinato de ferro), 4200mg de cobre (proteinato de cobre), 2400mg de manganês (proteinato de manganês), 37500mg de zinco (proteinato de zinco), 1820mg de iodo (iodato de potássio), 150mg de selênio (levedura enriquecida com selênio)

Tabela 2 Quantidades suplementares de microminerais de fontes inorgânicas (ING) ou biocomplexadas (BIO) utilizadas experimentalmente em dietas para gatos filhotes.

Dietas	mg/kg de alimento na matéria seca				
	Cobre	Ferro	Manganês	Selênio	Zinco
100% ING*	8,40	80,00	4,80	0,30	75,00
100% BIO†	8,40	80,00	4,80	0,30	75,00
80% BIO	6,72	64,80	3,84	0,24	60,00
60% BIO	5,04	48,60	2,88	0,18	45,00
40% BIO	3,36	32,40	1,92	0,12	30,00

*ING (fontes inorgânicas) - sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, selenito de sódio e sulfato de zinco.

†BIO (fontes biocomplexada) - proteinato de cobre, proteinato de ferro, proteinato de manganês, levedura enriquecida com selênio, proteinato de zinco.

Tabela 3 Quantidade de microminerais de fonte inorgânica (ING) e biocomplexada (BIO) nas dietas experimentais para gatos filhotes e premixes após análise laboratorial.

Dietas	mg/kg na matéria seca				
	Cobre	Ferro	Manganês	Selênio	Zinco
100% ING	25,77	433,85	37,98	0,38	149,66
100% BIO	26,42	412,90	37,71	0,40	156,53
80% BIO	24,10	353,47	36,21	0,37	137,45
60% BIO	22,32	343,15	35,13	0,28	125,67
40% BIO	20,17	326,17	34,31	0,23	108,13
Premix ING	3929,62	43685,43	4104,64	95,99	38769,56
Premix BIO	4243,53	47739,07	4026,54	188,73	42416,17

Atividade enzimática e peroxidação lipídica

Nos dias 0 e 120 do período experimental os animais foram submetidos a coletas de sangue para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) e da concentração de malondialdeído (MDA) pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram coletadas com os gatos em jejum de

12 horas, usando como acesso a veia jugular e, posteriormente, colocadas individualmente em mini tubos contendo anticoagulante heparina (Mini Tubos, Labor Import Co., Brasil) e rapidamente preservados imersos no gelo até o processamento 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 microtubos tipo eppendorf e congelado a temperatura de -80°C até a realização das análises, que ocorreu até 30 dias após a coleta. Para o ensaio foram usados os kits comerciais Superóxido Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Co., Estados Unidos), Glutaciona Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical Co., Estados Unidos) e TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Co., Estados Unidos), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Todas as análises foram feitas em duplicata para cada parcela experimental e as leituras das microplacas em espectrofotômetro automático de microplacas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific Inc., Alemanha).

Aos dias 0, 60 e 120 do experimento também foram realizadas coletas sanguíneas, nos animais em jejum de 12 horas, para a determinação da atividade das enzimas fosfatase alcalina e ceruloplasmina. As amostras sanguíneas para fosfatase alcalina foram colocadas individualmente em mini tubos com gel separador de soro (Minicollect® com gel separador de soro, Greiner Bio-One Inc., Austria). A centrifugação foi feita a 3500rpm durante 10 minutos a 20°C (modelo Elektra Ecoline, Laborline, Brasil). No ensaio usou-se a avaliação da atividade catalítica da enzima sobre o substrato p-nitrofenil fosfato sob leitura em espectrofotômetro (modelo Labmax240, Labtest Diagnóstica S/A, Brasil) a 405nm por meio de kit enzimático (Fosfatase alcalina Liquiform, Labtest Diagnóstica S/A, Brasil).

As amostras destinadas a análise de ceruloplasmina foram colocadas em tubos sem anticoagulante (Vacuette® Z Serum Clot Activator, Greiner Bio-one

Inc., Austria), centrifugadas a 3000xg durante 10 minutos (Modelo 2-6, Sigma Laborzentrifugen, Sigma, Alemanha), sendo o soro armazenado em microtubos tipo eppendorfa -20°C até a realização da análise. O ensaio foi feito por meio da oxidação da o-dianisidina di-hidrocloro (o-dianisidine dihydrochloride, Sigma Aldrich Co., Estados Unidos) usando o método de Schosinsky et al. (1974), com adaptações para a espécie. Os ensaios foram conduzidos a 37°C, utilizando um tampão de acetato de sódio 0,1 mol/L. Como o pH ótimo para a atividade de oxidases varia com a espécie (Prohaska, 1991) e a ceruloplasmina em gato tem atividade máxima em pH 5,8 (Fascetti et al., 2002), o tampão usado para análise foi feito a esse pH. A absorbância do produto da reação foi mensurada a 540nm por espectrofotômetro de cubeta (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific Inc., Alemanha). Uma unidade da atividade da ceruloplasmina foi definida como a quantidade de enzima oxidando 1µmol/min de substrato usando um coeficiente de extinção molar de 9600mol/L/cm (Schosinsky et al., 1974).

Capacidade de ligação do ferro

Também nos dias 0, 60 e 120 foram coletadas amostras de sangue para determinação da capacidade de ligação do Fe (Fe sérico, capacidade latente de ligação do Fe, capacidade total de ligação do Fe, índice de saturação do Fe e concentração de transferrina) em mini tubos com gel separador de soro (MiniCollect® com gel separador de soro, Greiner bio-one Inc., Austria). A centrifugação foi feita a 3500rpm durante 10 minutos a 20°C (modelo Elektra Ecoline, Laborline, Brasil).

Para avaliação do Fe sérico e a capacidade latente de ligação do Fe (CLLFe) foi utilizado o método colorimétrico de Goodwin modificado, por meio da adição de Ferrozine®, com reagentes comerciais (Labteste Diagnóstica S/A, Brasil). As leituras foram feitas em espectrofotômetro (modelo Labmax240,

Labtest Diagnóstica S/A, Brasil), na faixa de 560nm. A partir dessas análises foram calculadas a capacidade total de ligação do Fe (CTLFe), índice de saturação da transferrina (IST) e transferrina, conforme segue: CTLFe ($\mu\text{g/dL}$) = Fe sérico + CLLFe; IST (%) = (Fe sérico/CTLFe) x 100; e Transferrina (mg/dL) = CTLFe x 0,70.

Perfil hematológico

Ainda aos dias 0,60 e 120 as amostras sanguíneas foram colocadas em mini tubos com anticoagulante EDTA K2 (Labor Import Co, Brasil) e analisadas por método automatizado por meio de um analisador hematológico veterinário (modelo pocH-100iv-Diff, Sysmex Co, Japão).

Análises estatísticas

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado, de modo que 30 gatos foram distribuídos em cinco tratamentos, totalizando assim seis animais por tratamento, sendo a unidade experimental cada gato. Todos os dados foram previamente analisados para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e quando necessário eles foram transformados em log antes de serem analisados estatisticamente. Os dados foram submetidos à análise de covariância, sendo as medidas no tempo 0 as covariáveis e em seguida à análise de variância com dieta e tempo como fatores, exceto atividade das enzimas SOD, GPx e peroxidação lipídica, os quais foram submetidos à análise de variância, com dieta como único fator. Foi realizado Teste de Dunnet para comparação de cada nível de suplementação do biocomplexo ao grupo inorgânico e procedeu-se análise de regressão para os níveis do suplemento sob a forma de biocomplexo pelo PROC GLM (SAS, Inst., Inc., Cary, NC). Significância foi declarada a $p < 0,05$.

Resultados

Atividade enzimática e peroxidação lipídica

Nenhuma diferença em resposta a fonte e efeito de níveis suplementares da fonte biocomplexada foi observada na atividade das enzimas SOD, GPx e na peroxidação lipídica (concentração de MDA) ($p>0,05$)(Tabela 4). Não foi observada interação dieta x tempo para a atividade das enzimas fosfatase alcalina e ceruloplasmina ($p>0,05$) (Tabela 5). Não houve efeito ($p>0,05$) da dieta sobre a atividade da fosfatase alcalina, mas foi observado efeito do tempo ($p<0,05$). A atividade da enzima ceruloplasmina foi maior ($p<0,05$) nos animais alimentados com 80%BIO quando comparado aqueles alimentados com 100%ING; e entre os níveis BIO, a atividade aumentou quadraticamente ($p<0,05$) com o aumento da suplementação do biocomplexo (Tabela 5).

Tabela 4 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) e concentração de dialdeído malônico (MDA) de gatos filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

Item	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor	EPM
		100%	80%	60%	40%		
SOD (U/mL)	6,14	6,23	4,84	3,8	4,61	0,33	0,42
GPx (nmol/min/mL)	5842	5577	5270	4941	4984	0,46	172,33
MDA (µM)	3,55	2,67	3,66	3,07	3,74	0,18	0,16

EPM= erro padrão da média

Tabela 5 Atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA) e ceruloplasmina (CP) de gatos filhotes alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

Item	Tempo (dias)	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor			EPM
			100%	80%	60%	40%	D x T	D	T	
FA (U/L)	60	102,25	119,50	136,00	106,50	127,67	0,73	0,99	0,01	5,42
	120	95,75	80,17	114,75	86,67	80,83				
CP (U/L)	60	65,19	70,44	81,88	64,50	52,19	0,67	0,03*†	0,65	2,38
	120	57,50	71,58	79,81	76,06	59,69				

*Dieta 80% BIODiferiu significativamente (p<0,05) da dieta 100%ING pelo teste de Dunnett

† $y = -16,43438 + 2,242945x - 0,01531x^2$ ($R^2 = 0,95$)

D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo

EPM= erro padrão da média

Capacidade de ligação do ferro

Para nenhum dos parâmetros analisados do metabolismo de Fe foi observada interação tempo x dieta e efeito das fontes e níveis suplementares da fonte biocomplexada ($p>0,05$) (Tabela 6). Somente o IST diferiu entre os dias de coleta ($p<0,05$).

Perfil hematológico

Não houve interação tempo x dieta para nenhum dos parâmetros analisados ($p>0,05$) (Tabela 7). Nenhuma diferença entre as fontes e efeito dos níveis suplementares do biocomplexo foi observada na contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos totais e linfócitos totais (Tabela 7). Por outro lado, hemoglobina corpuscular média (HCM) foi maior ($p<0,05$) nos grupos de animais alimentados com a fonte de microminerais biocomplexados, independente da quantidade, quando comparado àqueles alimentados com a fonte inorgânica. Contagem de hemácias e concentração de hemoglobina foram significativamente diferentes ($p<0,05$) entre os dias de coleta.

Tabela 6 Capacidade de ligação do ferro (ferro sérico, concentração de transferrina, capacidade latente de ligação do ferro - CLLFe, capacidade total de ligação do ferro - CTLFe, índice de saturação da transferrina - IST) de gatos em crescimento, alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

Item	Tempo (dias)	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor			EPM
			100%	80%	60%	40%	D x T	D	T	
Ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$)	60	63,20	72,00	82,20	70,80	62,60	0,89	0,24	0,28	2,75
	120	57,00	77,80	66,80	61,80	59,20				
Transferrina (mg/dL)	60	222,74	245,82	241,85	257,37	229,48	0,71	0,15	0,90	3,92
	120	234,92	244,68	252,35	240,68	218,75				
CLLFe ($\mu\text{g/dL}$)	60	249,60	279,40	249,00	284,20	225,20	0,38	0,17	0,35	5,78
	120	280,80	263,00	290,20	267,80	239,00				
CTLFe ($\mu\text{g/dL}$)	60	318,20	359,40	331,20	348,40	328,80	0,54	0,20	0,89	5,78
	120	335,60	358,80	357,00	318,60	311,80				
IST (%)	60	19,50	20,80	25,38	20,04	20,03	0,83	0,19	0,01	0,72
	120	16,93	18,20	18,61	17,38	18,03				

D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo

EPM = erro padrão da média

Tabela 7 Contagem de hemácias, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos totais e linfócitos totais de gatos em crescimento alimentados com diferentes fontes (inorgânica - ING ou biocomplexada - BIO) e níveis de microminerais (cobre, ferro, manganês, selênio e zinco) BIO.

	Tempos (dias)	100% ING	Níveis suplementares (BIO)				p-valor			EPM
			100%	80%	60%	40%	D x T	D	T	
Hemácias (milhões/mm ³)	60	8,72	8,71	9,46	8,60	9,14	0,79	0,68	0,01	0,17
	120	9,93	9,75	9,64	9,60	9,64				
Hemoglobina (g/dL)	60	11,28	11,38	12,94	11,60	11,80	0,88	0,33	0,01	0,23
	120	12,78	12,80	13,40	13,28	12,87				
VCM (fL)	60	39,27	39,32	41,30	39,48	38,83	0,79	0,49	0,74	0,33
	120	39,68	39,47	41,46	39,85	39,67				
HCM (pg)	60	13,03	13,26	13,62	13,30	13,05	0,86	0,04*	0,64	0,12
	120	12,93	13,26	13,84	13,55	13,32				
CHCM (%)	60	33,22	33,18	32,95	33,30	33,10	0,83	0,90	0,67	0,14
	120	32,62	33,20	33,70	33,42	33,22				
Leucócitos totais (mil/mm ³)	60	19,64	21,10	15,42	22,60	15,83	0,90	0,28	0,19	0,77
	120	21,92	21,36	19,76	23,57	15,87				
Linfócitos totais (%)	60	48,60	49,00	48,60	44,17	41,33	0,70	0,95	0,93	1,75
	120	48,80	41,00	44,20	47,83	49,83				

*Todas as dietas com microminerais biocomplexados (BIO) diferem da dieta controle (100%ING) pelo teste de Dunnett (p<0,05)

D x T - interação dieta e tempo; D - efeito da dieta; T - efeito do tempo

EPM = erro padrão da média, n=6 animais por alimento

Discussão

Atividade enzimática e peroxidação lipídica

Diversas espécies reativas de oxigênio (EROs) são continuamente produzidas nas células como subproduto do metabolismo aeróbico (Apel e Hirt, 2004). Entretanto, mecanismos de defesa antioxidantes, que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx), protegem a célula contra o dano oxidativo causado pelas EROs (Rikans et al., 1991), mantendo assim a homeostase fisiológica. Contudo, microminerais, tais como Cu, Zn, Mn na SOD e Se na GPx, são importantes cofatores para a regulação da atividade antioxidante dessas enzimas (Karki et al., 2015).

Além disso, o balanço entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes determina o grau de estresse oxidativo, que tem como consequência a peroxidação lipídica. Esse último é um processo pelo qual o radical livre ataca o lipídeo, resultando na produção de outros compostos, como por exemplo, o malondialdeído (MDA), que é um dos principais produtos da oxidação secundária de ácidos graxos poliinsaturados (Aksu et al., 2010) e eficiente biomarcador do estresse oxidativo (Ayala et al., 2014). Conforme resultados obtidos no presente estudo para a atividade da SOD, GPx e níveis de MDA plasmáticos, os menores níveis de fornecimento dos elementos sob a forma biocomplexada foram suficientes na manutenção da proteção contra a oxidação sem efeitos de fatores estressantes. A título de comparação, a atividade da SOD encontrada está dentro dos valores médios de referência encontrados por Fascetti et al. (2002) em gatos saudáveis machos e fêmeas com menos de um ano de idade (2,8 a 16U/L).

Em estudo semelhante, em que frangos foram suplementados com fontes inorgânicas de Cu, Mn e Zn ou biocomplexada (proteinato - Bioplex) em diferentes níveis, foi observado que a atividade da SOD em tecido hepático foi semelhante entre as dietas experimentais. No entanto, a atividade da SOD

eritrocitária foi maior e níveis de MDA plasmático menores nos frangos que consumiram a fonte biocomplexada, independente do nível (Aksu et al., 2010).

Quanto a relação entre o Se e a atividade da GPx, em outras espécies (Wang et al., 2007; Wang e Xu, 2008; Cao et al., 2014), foi observado que animais suplementados com levedura ou Se-metionina apresentaram maior atividade da GPx quando comparados àqueles com selenito de sódio. Mas, assim como no presente estudo, há relato também de que animais suplementados com selenito de sódio ou Se-Metionina apresentam atividade da GPx (Wang et al., 2011) e concentração de MDA no soro semelhantes (Wang et al., 2011; Cao et al., 2014); e que níveis suplementares sob a forma biocomplexada não interferem na atividade da GPx e na concentração de MDA sérica (Cao et al., 2014). A semelhança encontrada na atividade da GPx entre as fontes no presente estudo pode ter sido decorrente do fato do selenito de sódio ter sido metabolizado a Se-cisteína mais eficientemente que a Se-metionina presente na levedura (Sunde e Hoekstra, 1980; White e Hoekstra, 1979).

A fosfatase alcalina é uma enzima responsável pela produção de fosfato inorgânico livre ou transferência de grupo fosforil a álcoois (Kim e Wychoff, 1990). Como apresenta o Zn em sua composição, a carência desse elemento tem sido implicada na redução da atividade da enzima (Eberle et al., 1999; Yousef et al., 2002) e conseqüentemente em alterações ósseas (Ovensen et al., 2001). Isso foi observado por Eberle et al. (1999) em que ratos alimentados com dietas carentes em Zn apresentaram atividade da fosfatase alcalina plasmática 40% menor e osteopenia em relação aqueles suficientemente suplementados. Diferente do resultado encontrado no presente estudo, Yousef et al. (2002) observaram diminuição da atividade enzimática no soro de forma dose-dependente, porém a fonte do mineral usada foi inorgânica.

A ceruloplasmina é uma glicoproteína que contém seis íons de Cu, sendo que três desses formam centros de Cu envolvidos nos processos de

transferência de elétrons e outros três em um único centro trinuclear onde ocorre a ativação de oxigênio durante o ciclo catalítico da enzima (Kaplan e O'Halloran, 1996). Dentre outras funções, essa enzima possui uma atividade ferroxidase, que lhe confere a capacidade de oxidar o Fe no estado ferroso (Fe^{2+}), presente na ferritina intracelular, em ferro ferrico (Fe^{3+}) para que possa se ligar a transferrina (Linder e Hazeg-Azam, 1996). Assim, pode-se afirmar que o metabolismo de Fe e Cu estão interligados (Schümann et al., 2002), de tal modo que a diminuição da atividade ferroxidase dessa enzima é característico da diminuição de fornecimento de Cu para a ceruloplasmina (Suzuki et al., 2002).

Em cães em crescimento já foi observado comprometimento da atividade oxidase da enzima na baixa ingestão de Cu (Zentek e Meyer, 1991). Tomando como base resultados obtidos por Fascetti et al. (2002) em gatos machos e fêmeas saudáveis com menos de um ano de idade em que a atividade dessa enzima variou de 24,1 a 92,5U/L, os valores encontrados ao longo do presente estudo estão dentro da normalidade para a espécie.

Partindo-se da evidencia de que minerais biocomplexados são mais disponíveis e rapidamente absorvidos em relação a fontes inorgânicas, Eckert et al. (1999), comparando a atividade da ceruloplasmina em ovelhas alimentadas com sulfato de Cu ou proteinato de Cu em diferentes níveis, observaram que aos 73 dias a atividade da enzima foi maior naqueles animais alimentados com fonte biocomplexada e que o aumento da concentração de Cu na dieta não interferiu nessa atividade. Já no presente estudo, diferença entre as fontes só foi observada quando a suplementação foi 80%BIO em relação a 100%ING, mas que entre os níveis suplementares do biocomplexo houve aumento quadrático com a diminuição da suplementação. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato da suplementação com até 80% de Cu biocomplexado ser o suficiente na manutenção da atividade enzimática, de modo que quantidades superiores dessa fonte não aumentam a atividade da enzima.

Capacidade de ligação do ferro

Para que grandes quantidades de Fe não fiquem circulantes no sangue, já que esse elemento pode participar da geração de radicais livres (Fang et al., 2002), fatores regulatórios modulam tanto a absorção quanto a liberação de ferro por macrófagos e hepatócitos (Hentze et al., 2004), o que pode justificar a manutenção de níveis séricos de Fe independente da fonte e suplementação do mineral biocomplexado encontrados no presente estudo.

Transferrina é uma molécula que se liga ao Fe^{3+} na circulação mantendo-o solúvel em ambiente aquoso e incapaz de engatar nas reações de Fenton/Haber–Weiss; mas ao mesmo tempo entrega o Fe aos tecidos (Andrews, 2008). A transferrina é mais bem expressa pela capacidade de ligação com o íon, indicada pela CLLFe somada ao Fe sérico, resultando na CTLFe (Pires et al., 2011). De forma mais específica, a CTLFe é a quantidade de Fe que a transferrina sérica pode ligar quando todos os sítios de ligação do Fe estão saturados (Andrews, 2010).

Os níveis séricos de Fe, capacidade latente de ligação do Fe e capacidade total de ligação do Fe em gatos são, respectivamente: 68-215 μ g/dL; 105-205 μ g/dL; 169-325 μ g/dL (Kaneko et al., 2008). Valores de referencia para concentração de transferrina em gatos não foram encontrados para efeito de comparação. A razão da concentração sérica de Fe pela CTLFe é o IST, o que significa a percentagem da capacidade total de ligação do Fe que é na verdade ocupada pelo mineral. Esse índice gira em torno de 20% a 50% e fatores que afetam a concentração sérica de Fe e CTLFe também afetam o IST, de modo que valores abaixo de 20% são sugestivos de deficiência férrica. Quando há deficiência desse mineral, a transferrina pode aumentar, mas na maioria das vezes é normal, a concentração sérica de Fe diminui, a CTLFe é normal ou possivelmente aumentada e o IST é baixo. No caso do presente estudo, os valores médios de Fe sérico, CTLFe e IST estavam dentro dos valores de

referencia; ao passo que a CLLFe apresentou valor médio mais alto em relação aos valores de referência.

Perfil hematológico

O Fe é um componente usado por precursores eritroides na produção de hemoglobina, de forma que alterações em sua homeostase resultam em anemia (McCown e Specht, 2011). Entretanto, alterações na eritropoiese por deficiência de Fe ocorrem quando a concentração sérica do elemento é baixa em uma fase muito tardia. É do tipo microcítica e hipocromica devido à diminuição da síntese de hemoglobina, atraso na maturação celular e divisão mitótica extra (Steinberg e Olver, 2005). A diminuição no VCM precede a diminuição na CHCM (McCown e Specht, 2011). A depleção de Cu também é acompanhada por alterações hematológicas como anemia microcítica hipocrômica (Linder e Hazez-Azam, 1996), como resultado da deficiência funcional do Fe.

Diversos valores normais de referência para filhotes de gato estão disponíveis, mas a conformidade entre os valores de referência de gatos adultos é melhor para média (Rizzi et al., 2010). Segundo Moritz et al. (2004) os valores de hemácias, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM para gatos adultos são 5,92-11,16 milhões/mm³, 8,17 - 15,26g/dL; 36,96-54,98fL; 11,28-17,24pg e 26,25-35,91%, respectivamente. Tomando como base esses valores de referência, e considerando os resultados obtidos em todos os grupos, independente do tempo de coleta, os gatos apresentaram perfil hematológico normal com os valores médios obtidos de hemácias, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM de 8,75 milhões/mm³; 11,77g/dL; 41,60fL; 13,48pg e 32,44%, respectivamente. Isso não corrobora com os resultados do estudo de Schiavon et al. (2000) que suplementando leitões com Cu, Fe, Mn e Zn na forma de sulfato ou proteínato em níveis normais e baixos observaram aumento significativo em hemoglobina e número de células sanguíneas naqueles suplementados com biocomplexo.

Os microminerais, em especial o Zn, são necessários para o desenvolvimento e função da resposta imune (Shankar e Prasad, 1998; Rink e Gabriel, 2000), de modo que o baixo índice plasmático ou a deficiência de Zn, por exemplo, caracteriza diversas doenças decorrentes da resposta imune prejudicada. Isso é decorrente do fato dos mecanismos de defesa da imunidade inata, que envolve diferentes classes de leucócitos, serem dependentes do Zn (Willinghousen e Rink, 1998). A linfopenia é um dos quadros comuns na carência do elemento e que mesmo na deficiência marginal tem suprimido as concentrações periféricas de células linfóides em algumas espécies (Fraker et al., 1986; Prasad et al., 1988). Conforme os resultados obtidos nos gatos, a concentração de leucócitos totais e linfócitos totais não diferiram entre as fontes e níveis suplementares do biocomplexo.

Esses resultados indicam que os microminerais Cu, Fe, Mn, Se e Zn sob a forma de proteínatos (Bioplex[®]TR Se) podem ser adicionados a dietas de gatos em crescimento em 40% da recomendação do NRC (2006) sem qualquer efeito negativo sobre a atividade de metaloenzimas, parâmetros relacionados ao metabolismo de ferro, bem como índices hematológicos.

Referencias

- Adeniyi, F. A.; Heaton, F. W., 1980: The effect of zinc deficiency on alkaline phosphatase (EC 3.1 .3.1) and its isoenzymes. *British Journul of Nutrition* **43**, 561-569.
- Aggett, P. J., 1985: Physiology and metabolism of essential trace elements: an outline. *Clinics in Endocrinology and Metabolism***14**, 513-543.
- Aksu, D. S.; Aksu, T.; Özsoy, B.; Baytok, E., 2010: The effects of replacing inorganic with level of organically complexed minerals (Cu, Zn and Mn) in broiler diets on lipid peroxidation and antioxidant defense systems. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences***23**, 1066-1072.

- Andrews, G. A., 2010: Measurement of serum iron concentration, TIBC, and serum ferritin concentration. In: Weiss, D. J.; Wardrop, K. J. (eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley-Blackwell, Iowa, pp.1162-1164.
- Andrews, N. C., 2008: Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* **112**, 219-230.
- Andrieu, S., 2008: Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health? *The Veterinary Journal* **176**, 77-83.
- Apel, K.; Hirt, H., 2004: Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Aruoma, O. I., 1998: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Chemical Society* **75**, 199.
- Ayala, A.; Muñoz, M. F.; Argüelles, S., 2014: Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**, 1-31.
- Balevska, P. S.; Russanov, E. M.; Kassabova, T. A., 1981: Studies on lipid peroxidation in rat liver by copper deficiency. *Biochemical Journal* **13**, 489-493.
- Bohn, A. A., 2015: Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. *Clinics in Laboratory Medicine* **35**, 579-590.
- Buzadžić, B.; Korać, B.; Lazić, T.; Obradović, D., 2002: Effect of supplementation with Cu and Zn on antioxidant enzyme activity in the rat tissues. *Food Research International* **35**, 217-220.
- Cao, J.; Guo, F.; Zhang, L.; Dong, B.; Gong, L. 2014: 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* **5**, 1-7.
- Cortinhas, C. S.; Botaro, B. G.; Sucupira, M. C. A.; Renno, F. P.; Santos, M. V. 2010: Antioxidant enzymes and somatic cell count in dairy cows fed with organic source of zinc, copper and selenium. *Livestock Science* **127**, 84-87.

- Eberle, J.; Schmidmayer, S.; Erben, R. G.; Stangassinger, M.; Roth, H-P., 1999: Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **13**, 21-26.
- Eckert, G. E.; Greene, L. W.; Carstens, G. E.; Ramsey, W. S., 1999: Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *Journal of Animal Science* **77**, 244-249.
- Fang, Y-Z; Yang, S.; Wu, G., 2002: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872-879.
- Fascetti, A. J.; Rogers, Q. R.; Morris, R. J., 2002: Blood copper concentrations and cuproenzyme activities in a colony of cats. *Veterinary Clinical Pathology* **31**, 183-188.
- Finkel, T.; Holbrook, N., 2000: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **9**, 239-247.
- Forman, H. J.; Ridovich, I., 1973: On the stability of bovine superoxide dismutase: the effects of metals. *The Journal of Biological Chemistry* **248**, 2645-2649.
- Fraker, P. J.; Gershwin, M. E.; Good, R. A.; Prasad, A., 1986: Interrelationships between zinc and immune function. *Federation Proceedings* **45**, 1474-1479.
- Harvey, J. W., 2008: Iron metabolism and its disorders. In: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. (eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals*. Elsevier Inc, Burlington, pp. 259-285.
- Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Andrews, N. C., 2004: Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285-297.
- Hoffmann, W. E.; Solter, P. F., 2008: Diagnostic enzymology of domestic animals. In: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W. H.; Bruss, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Elsevier Inc, Burlington, pp. 351-412.
- Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L., 2008: Blood analyte reference values in small and some laboratory animals. In: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L., *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Elsevier Inc, Burlington, pp. 889-895.

- Kaplan, J; O'Halloran, T. V.,1996: Iron metabolism in eukaryotes: Mars and Venus at it again. *Science***271**, 1510-1512.
- Karki, K.; Pande, D.; Negi, R.; Khanna, S.; Khanna, R. S.; Khanna, H. D.,2015: Correlation of serum toll like receptor and trace elements with lipid peroxidation in the patients of breast diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **30**, 11-16
- Kim, E. E.; Wyckoff, H. W., 1991: Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. *Journal of Molecular Biology***218**, 449-464.
- Kokoszka, J. E.; Coskun, P.; Esposito, L. A.; Wallace, D. C. 2001: Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2(+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences***98**,2278-2283.
- Kraus, A.; Roth, H.; Kirchgessner, M., 1997: Supplementation with vitamin C, vitamin E or β -carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. *The Journal of Nutrition***127**, 1290-1296.
- Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M., 1996: Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition***63**, 797S-811S.
- Linder, M. C.; Wooten, L.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Shulze, R.; Lomeli, N., 1998: Copper transport. *The American Journal of Clinical Nutrition***67**, 965S-971S.
- Michel, C., 1993: Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. *Laboratory animals***27**, 278-280.
- Miles, R. D.; Henry, P. R.,2000: Relative trace mineral bioavailability. *Ciência Animal Brasileira***2**, 73-93.
- McCown, J. L.; Specht, A. J.,2011: Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. *Journal of the American Animal Hospital Association***47**, 151-160.
- Moritz, A.; Fickenscher, Y. Meyer, K. Failing, K.; Weiss, D. J.,2004: Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Veterinary Clinical Pathology***33**, 32-38.

- Mornet, E.; Sturas, E.; Lia-Baldini, A.-S.; Stigbrand, T.; Ménez, A.; Le Du, M.-H., 2001: Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *The Journal of Biological Chemistry***276**, 31171-31178.
- NRC.(National Research Council).Nutrient Requirements of Dogs and Cats. Washington, DC: National Academies Press, 2006.
- Ovensen, J.; Moller-Madsen, B.; Nielsen, P. T.; Christensen, P. H.; Simonsen, O.; Hoeck, H. C.; Laursen, M. B.; Thomsen, J. S.,2009: Differences in zinc status between patients with osteoarthritis and osteoporosis. *Journal of trace elements in Medicine and Biology***23**, 1-8.
- Pires, L. S. A.; Dittrich, R. L.; Souza, A. C.; Bertol, M. A. F.; Patricio, L. F. L., 2011: Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. *Ciência Rural***41**,. 272-277
- Prasad, A. S.; Meftah, S.; Abdallah, J.; Kaplan, J.; Brewer, G. J.; Bach, J. F.; Dardenne, M.,1988: Serum thymulin in human zinc deficiency. *Journal of Clinical Investigation***82**,1202-1210.
- Prohaska, J. R.,1991:Changes in Cu, Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *The Journal of Nutrition* **121**, 355-363.
- Quanle, Q.; Monier-Faugere, M-C.; Zhaopo, G.; Malluche, H. H., 1995: Predictive value of serum parathyroid hormone levels for bone turnover in patients on chronic maintenance dialysis. *American Journal of Kidney Diseases* **24**, 622-631.
- Richards, J. D.; Zhao, J.; Harrekk, R. J.; Atwell, C. A.; Dibner, J. J., 2010: Trace mineral nutrition in poultry and swine. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences***23**, 1527-1534.
- Rikans, L. E.; Moore, D. R.; Snowden, C. D., 1991: Sex-dependent differences in the effects of aging and antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta***1074**, 195-200.
- Rink, L.; Gabriel, P., 2000: Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society***59**, 541-552.

- Rizzi, T. E.; Clinkenbeard, K. D.; Meinkoth, J. H., 2010: Normal hematology of the cat. In: Weiss, D. J.; Wardrop, K. J. (eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. Wiley-Blackwell, Iowa, pp. 811-820.
- Sabokbar, A.; Millett, P. J.; Myer, B.; Rushton, N.A., 1994: Rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone and Mineral***27**, p. 57-67
- Sandström, J.; Nilsson, P.; Karisson, K.; Marklund, S. L., 1994: 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry***269**, 19163-19166.
- Schosinsky, K. H.; Lehmann, H. P.; Beeler, M. F., 1974: Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clinical Chemistry***20**, 1556-1563.
- Schümann, K.; Classen, H. G.; Dieter, H. H.; König, J.; Multhaup, G.; Rückgauer, M.; Summer, K. H.; Bernhard, J.; Biesalski, H. K., 2002: Hohenheim consensus workshop: copper. *European Journal of Clinical Nutrition***56**, 469-483.
- Sebert, J. L.; Ruiz, J. C.; Fournier, A.; Fardellone, P.; Guéris, J.; Marié, A.; Morinière, P.; Codet, M. P.; Renaud, H., 1987: Plasma bone Gla-protein: assessment of its clinical value as an index of bone formation in hemodialyzed patients. *Bone and Mineral* **2**, 21-27.
- Shakoori, A.R.; Aziz, F.; Alam, J.; Ali, S.S., 1990: Toxic effects of talstar, a new synthetic pyethroid, on blood and liver of rabbit. *Pakistan Journal of Zoology***23**, 289-300.
- Shankar, A. H.; Prasad, A. S., 1998: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition***68**, 447S-463S.
- Schiavon, S.; Bailoni, L.; Ramanzin, M.; Vincenzi, R.; Simonetto, A.; Bittante, G., 2000: Effect of proteinate or sulphate mineral sources on trace elements in blood and liver of piglets. *Animal Science***71**, 131-139.
- Spears, J. W.; Weiss, W. P., 2008: Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal***176**, 70-76.

- Steinberg, J. D.; Olver, C. S., 2005: Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* **34**, 23-27.
- Sunde R.A.; Hoekstra W.G., 1980: Incorporation of selenium from selenite into selenocysteine into glutathione peroxidase in the isolated perfused rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **93**, 1181-1188.
- Suzuki, K. T.; Someya, A.; Komada, Y.; Ogra, Y. 2002: Roles of metallothionein in copper homeostasis: response to Cu-deficient diets in mice. *Journal of Inorganic Biochemistry* **88**, 173-182.
- Troy, C. M.; Shelanski, M. L., 1994: Downregulation of copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) causes neuronal cell death. *Proceeding of The National Academy of Sciences* **91**, 6384-6387.
- Wang, Y.; Han, J.; Li, W.; Xu, Z., 2007: Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius Auratus Gibelio*). *Animal Feed Science and Technology* **134**, 243-251.
- Wang, Y-B.; Xu, B-H., 2008: Effect of different selenium source (sodium selenite and selenium yeast) on broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **144**, 306-314.
- Wang, Y. X.; Zhan, X. A.; Yuan, D.; Zhang, X. W.; Wu, R. J. 2011: Effect of selenomethionine and sodium selenite supplementation on meat quality, selenium distribution and antioxidant status in broilers. *Czech Journal of Animal Science* **56**, 305-313.
- Weiss, W.P.; Wyatt, D.J.. 2002: Effects of feeding diets based on silage from corn hybrids that differed in concentration and in vitro digestibility of neutral detergent fiber to dairy cows. *Journal of Dairy Science* **85**, 3462-3469.
- White, C. L.; Hoekstra W. G., 1979: The metabolism of selenite and selenomethionine in mouse fibroblasts grown in tissue culture. *Biological Trace Element Research* **1**, 243-257.

- Wellinghausen, N.; Rink, L., 1998: The significance of zinc for leukocyte biology. *Journal of Leukocyte Biology***64**, 571-577.
- Yousef, M. I.; EL Hendy, H. A.; EL-Demerdash, F. M.; Elagamy, E. I., 2002: Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radical, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology***175**, 223-234.
- Yu, B. P., 1994: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Review* **74**, 139-162.
- Zentek, J.; Meyer, H., 1991: Investigations on copper deficiency in growing dogs. *The Journal of Nutrition***121**, 83S-84S.

ANEXOS

ANEXO A - Análise de variância

Tabela 1A. Análise de variância para peso corporal¹

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	23,3	0,59	0,6734
Coleta	5	36,1	197,81	<0,0001
Tratamento*coleta	20	57,4	0,78	0,7217
Média geral	1947,71			

Tabela 2A. Análise de variância para consumo alimentar diário*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	23,3	0,56	0,6914
Coleta	5	85,0	44,13	<0,0001
Tratamento*coleta	20	94,1	0,61	0,8929
Média geral	66,27			

Tabela 3A. Análise de variância para altura de cernelha*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	98,6	0,98	0,4227
Coleta	3	54,0	304,86	<0,0001
Tratamento*coleta	12	70,9	0,24	0,9952
Média geral	22,30			

Tabela 4A. Análise de variância para comprimento corporal*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	25,0	0,32	0,8615
Coleta	3	23,0	456,09	<0,0001
Tratamento*coleta	12	35,4	1,07	0,4104
Média geral	53,98			

¹ Tabelas 1A a 9A são as análises de variância das análises estatísticas das variáveis descritas. Vale ressaltar que essas tabelas apresentam modelo diferente das demais, isso ocorre porque usou o ProcMixed do SAS e o método de estimação da máxima verossimilhança restrita

Tabela 5A. Análise de variância para crescimento de pelo*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	22,0	0,40	0,8041
Coleta	3	20,0	28,04	<0,0001
Tratamento*coleta	12	30,2	1,16	0,3584
Média geral	0,27			

Tabela 6A. Análise de variância para cobre no plasma*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	22,9	1,52	0,2283
Coleta	1	22,3	4,23	0,0516
Tratamento*coleta	4	22,2	1,68	0,1894
Covariável	1	24,7	113,10	<0,0001
Média geral	1,45			

Tabela 7A. Análise de variância para ferro no plasma*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	2	12,0	1,20	0,3357
Coleta	1	13,0	9,56	0,0086
Tratamento*coleta	2	13,0	2,88	0,0919
Covariável	1	12,0	5,95	0,0312
Média geral	0,97			

Tabela 8A. Análise de variância para selênio no plasma*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	23,5	0,51	0,7301
Coleta	1	47,2	3,56	0,8257
Tratamento*coleta	4	49,3	0,12	0,9520
Covariável	1	39	27,64	<0,0001
Média geral	378,48			

Tabela 9A. Análise de variância para zinco no plasma*

Efeito	GL numerador	GL denominador	Valor F	Pr> F
Tratamento	4	23,4	1,78	0,1670
Coleta	1	21,9	16,21	0,0006
Tratamento*coleta	4	21,8	0,23	0,9201
Covariável	1	45,7	0,87	0,3555
Média geral	0,46			

Tabela 10A. Análise de variância e coeficiente de variação para densidade mineral óssea do úmero

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	4,81729763	1,20432441	0,95	0,4539
Resíduo	23	29,1951251	1,2693533		
CV (%)	19,87				
Média geral	5,67				

Tabela 11A. Análise de variância e coeficiente de variação para densidade mineral óssea do rádio

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	0,19508228	0,04877057	0,22	0,9225
Resíduo	23	5,01882305	0,21820970		
CV (%)	12,79				
Média geral	3,65				

Tabela 12A. Análise de variância e coeficiente de variação para densidade mineral óssea da ulna

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	0,31293882	0,07823470	0,31	0,8689
Resíduo	23	5,82134181	0,25310182		
CV (%)	12,96				
Média geral	3,88				

Tabela 13A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre consumido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	1,06004465	0,26501116	3,32	0,0306
Resíduo	20	1,59626121	0,07981306		
CV (%)	15,81				
Média geral	1,79				

Tabela 14A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	1,06940936	0,26735234	3,96	0,0158
Resíduo	20	1,34901682	0,06745084		
CV (%)	16,04				
Média geral	1,62				

Tabela 15A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre absorvido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	0,02884395	0,00721099	2,04	0,1278
Resíduo	20	0,07081866	0,00354093		
CV (%)	35,52				
Média geral	0,17				

Tabela 16A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre na urina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	0,00001705	0,00000426	1,29	0,3076
Resíduo	20	0,00006611	0,00000331		
CV (%)	25,01				
Média geral	0,01				

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

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	0,03194544	0,00798636	2,23	0,1017
Resíduo	20	0,07149378	0,00357469		
CV (%)	38,00				
Média geral	0,16				

Tabela 18A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre na pele

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	163,0802963	40,7700741	1,69	0,1913
Resíduo	20	481,8630474	24,0931524		
CV (%)	63,41				
Média geral	7,74				

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

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	287,5174999	71,8793750	1,43	0,2607
Resíduo	20	1005,634534	50,2817270		
CV (%)	89,15				
Média geral	7,95				

Tabela 20A. Análise de variância e coeficiente de variação para cobre no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	25,8410610	6,4602652	4,40	0,0079
Resíduo	25				
CV (%)	14,51				
Média geral	8,35				

Tabela 21A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro consumido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	389,4334840	97,3583710	3,48	0,0300
Resíduo	17	476,210095	28,0123585		
CV (%)	15,60				
Média geral	33,94				

Tabela 22A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	146,1386985	36,5346746	1,28	0,3171
Resíduo	17	485,7238590	28,5719917		
CV (%)	19,20				
Média geral	27,84				

Tabela 23A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro absorvido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	79,48686344	19,87171586	1,72	0,1925
Resíduo	17	196,6857992	11,5697529		
CV (%)	55,77				
Média geral	6,10				

Tabela 24A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro na urina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	0,14405617	0,03601404	0,74	0,5803
Resíduo	17	0,83221233	0,0489537		
CV (%)	73,23				
Média geral	0,30				

Tabela 25A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro retido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	75,63312384	18,90828096	1,67	0,2036
Resíduo	17	192,7360525	11,3374149		
CV (%)	58,08				
Média geral	5,80				

Tabela 26A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro na pele

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	53893,34620	13473,33655	0,72	0,5887
Resíduo	18	336301,7335	18683,4296		
CV (%)	77,27				
Média geral	176,90				

Tabela 27A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro em gônada

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	26146,49303	6536,62326	1,10	0,3892
Resíduo	17	101200,5222	5952,9719		
CV (%)	49,12				
Média geral	157,09				

Tabela 28A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	14766,02630	3691,50658	4,77	0,0073
Resíduo	20	15487,51522	774,37576		
CV (%)	23,59				
Média geral	117,96				

Tabela 29A. Análise de variância e coeficiente de variação para manganês consumido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	9,52810123	2,38202531	9,90	<0,0001
Resíduo	25	6,01539724	0,24061589		
CV (%)	15,75				
Média geral	3,11				

Tabela 30A. Análise de variância e coeficiente de variação para manganês em gônada

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	2,41654117	0,60413529	6,36	0,0023
Resíduo	18	1,71017573	0,095000976		
CV (%)	22,17				
Média geral	1,39				

Tabela 31A. Análise de variância e coeficiente de variação para manganês no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	4,30656142	1,07664035	8,16	0,0005
Resíduo	20	2,63803632	0,13190182		
CV (%)	44,73				
Média geral	0,81				

Tabela 32A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio consumido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	665,9174246	166,4793562	28,03	<0,0001
Resíduo	20	118,7840287	5,9392014		
CV (%)	13,52				
Média geral	18,03				

Tabela 33A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	3,25346015	0,81336504	1,13	0,3709
Resíduo	20	14,40462850	0,72023143		
CV (%)	19,81				
Média geral	4,28				

Tabela 34A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio absorvido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	661,8549685	165,4637421	42,16	<0,0001
Resíduo	20	78,5006316	3,9250316		
CV (%)	14,41				
Média geral	13,75				

Tabela 35A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio na urina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	114,2525092	28,5631273	10,89	<0,0001
Resíduo	20	52,4746476	2,6237324		
CV (%)	31,99				
Média geral	5,06				

Tabela 36A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio retido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	311,8616887	77,9654222	21,09	<0,0001
Resíduo	20	73,9529891	3,6976495		
CV (%)	22,14				
Média geral	8,69				

Tabela 37A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio em pele

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	8658529,436	2164632,359	14,76	<0,0001
Resíduo	15	2199644,13	146642,94		
CV (%)	42,93				
Média geral	892,09				

Tabela 38A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio em gônada

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	399117,9690	99779,4922	0,25	0,9057
Resíduo	23	9121315,622	396578,940		
CV (%)	36,26				
Média geral	1736,69				

Tabela 39A. Análise de variância e coeficiente de variação para selênio em pelo

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	983294,9022	24823,7255	8,96	0,0003
Resíduo	19	521537,057	27449,319		
CV (%)	17,80				
Média geral	930,84				

Tabela 40A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco consumido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	168,5937192	42,1484298	10,50	0,0001
Resíduo	19	76,3002453	4,01580		
CV (%)	15,63				
Média geral	12,82				

Tabela 41A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco nas fezes

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	115,7007966	28,9251991	7,35	0,0009
Resíduo	19	74,7904537	3,9363397		
CV (%)	18,32				
Média geral	10,83				

Tabela 42A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco absorvido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	7,39983051	1,84995763	1,41	0,2673
Resíduo	19	24,85172048	1,30798529		
CV (%)	57,47				
Média geral	1,99				

Tabela 43A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco na urina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	0,03489840	0,00872460	1,00	0,4317
Resíduo	19	0,16572401	0,00872232		
CV (%)	36,21				
Média geral	0,26				

Tabela 44A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco retido

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	7,49039080	1,87259770	1,46	0,2541
Resíduo	19	24,40414419	1,28442864		
CV (%)	65,43				
Média geral	1,73				

Tabela 45A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco na pele

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	5484,252645	1371,063161	0,78	0,5489
Resíduo	20	34976,39003	1748,81950		
CV (%)	57,66				
Média geral	72,53				

Tabela 46A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco em gônada

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	266,3166041	66,5791510	0,58	0,6773
Resíduo	22	2506,758405	113,94356		
CV (%)	11,93				
Média geral	89,46				

Tabela 47A. Análise de variância e coeficiente de variação para zinco no pelo

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	3415,405823	853,851456	2,07	0,1217
Resíduo	21	8679,72915	413,32044		
CV (%)	9,53				
Média geral	213,38				

Tabela 48A. Análise de variância e coeficiente de variação para atividade da enzima superóxido dismutase

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	21,62776033	5,40694008	1,23	0,3299
Covariável	1	0,08379147	0,08379147	0,02	0,8915
Resíduo	19	83,2514853	4,3816571		
CV (%)	40,86				
Média geral	5,12				

Tabela 49A. Análise de variância e coeficiente de variação para atividade da enzima glutatona peroxidase

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	2952416,185	738104,046	0,95	0,4587
Covariáveis	1	20392,785	20392,785	0,03	0,8732
Resíduo	19	14810532,61	779501,72		
CV (%)	16,59				
Média geral	5322,70				

Tabela 50A. Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de malondialdeído

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	3,94429318	0,98607330	1,78	0,1753
Covariável	1	0,27505315	0,27505315	0,50	0,4900
Resíduo	19	10,54688341	0,55509913		
CV (%)	22,31				
Média geral	3,34				

Tabela 51A. Análise de variância e coeficiente de variação para atividade da enzima fosfatase alcalina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	309,320297	77,330074	0,06	0,9940
Coleta	1	9172,982630	9172,982630	6,58	0,0142
Tratamento*coleta	4	2813,442246	703,360562	0,50	0,7325
Covariável	1	4042,096576	4042,096576	2,90	0,0964
Resíduo	40	55758,78676	1393,96967		
CV (%)	36,05				
Média geral	103,57				

Tabela 52A. Análise de variância e coeficiente de variação para atividade da enzima ceruloplasmina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	3005,976633	751,494158	3,09	0,0268
Coleta	1	52,026378	52,026378	0,21	0,6462
Tratamento*coleta	4	582,166574	145,541644	0,60	0,6655
Covariável	1	355,913454	355,913454	1,47	0,2336
Resíduo	38	9231,66291	242,93850		
CV (%)	22,98				
Média geral	67,84				

Tabela 53A. Análise de variância e coeficiente de variação para ferro sérico

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	2237,918194	559,479548	1,43	0,2421
Coleta	1	469,671743	469,671743	1,20	0,2798
Tratamento*coleta	4	437,114478	109,278619	0,28	0,8893
Covariável	1	480,144325	480,144325	1,23	0,2746
Resíduo	38	14845,40568	390,66857		
CV (%)	29,30				
Média geral	64,47				

Tabela 54A. Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de transferrina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	5651,609949	1412,902487	1,79	0,1487
Coleta	1	12,154982	12,154982	0,02	0,9018
Tratamento*coleta	4	1698,869910	424,717477	0,54	0,7084
Covariável	1	3087,249046	3087,249046	3,91	0,0545
Resíduo	42	33140,75229	789,06553		
CV (%)	11,78				
Média geral	238,51				

Tabela 55A. Análise de variância e coeficiente de variação para capacidade latente de ligação do ferro

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	10667,40011	2666,85003	1,70	0,1692
Coleta	1	1423,59787	1423,59787	0,91	0,3462
Tratamento*coleta	4	6787,85755	1696,96439	1,08	0,3779
Covariável	1	1477,01603	1477,01603	0,94	0,3374
Resíduo	38	59461,18397	1564,76800		
CV (%)	15,07				
Média geral	262,41				

Tabela 56A. Análise de variância e coeficiente de variação para capacidade total de ligação do ferro

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	10867,20711	2716,80178	1,58	0,2001
Coleta	1	32,51314	32,51314	0,02	0,8914
Tratamento*coleta	4	5379,88285	1344,97071	0,78	0,5446
Covariável	1	1729,16916	1729,16916	1,00	0,3227
Resíduo	38	65441,18084	1722,13634		
CV (%)	12,33				
Média geral	336,51				

Tabela 57A. Análise de variância e coeficiente de variação para índice de saturação do ferro

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	151,0837082	37,7709271	1,60	0,1945
Coleta	1	162,5039312	162,5039312	6,87	0,0124
Tratamento*coleta	4	34,4263683	8,6065921	0,36	0,8328
Covariável	1	167,3174704	167,3174704	7,07	0,0113
Resíduo	39	922,521075	23,654387		
CV (%)	25,04				
Média geral	19,42				

Tabela 58A. Análise de variância e coeficiente de variação para contagem de hemácias

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	3,16469248	0,79117312	0,58	0,6766
Coleta	1	9,10427156	9,10427156	6,71	0,0131
Tratamento*coleta	4	2,29763693	0,57440923	0,42	0,7909
Covariável	1	7,87752818	7,87752818	5,81	0,0204
Resíduo	42	56,99310182	1,35697861		
CV (%)	12,52				
Média geral	9,30				

Tabela 59A. Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de hemoglobina

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	12,10356751	3,02589188	1,19	0,3281
Coleta	1	21,76943423	21,76943423	8,58	0,0055
Tratamento*coleta	4	2,92009184	0,73002296	0,29	0,8843
Covariável	1	4,82000936	4,82000936	1,90	0,1754
Resíduo	42	106,5596573	2,5371347		
CV (%)	12,85				
Média geral	12,40				

Tabela 60A. Análise de variância e coeficiente de variação para volume corpuscular médio

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	49,6009769	12,4002442	0,86	0,4938
Coleta	1	1,5678722	1,5678722	0,11	0,7428
Tratamento*coleta	4	24,1660304	6,0415076	0,42	0,7933
Covariável	1	216,5064659	216,5064659	15,05	0,0003
Resíduo	46	661,647534	14,383642		
CV (%)	9,65				
Média geral	39,29				

Tabela 61A. Análise de variância e coeficiente de variação para hemoglobina corpuscular média

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	4,5694244	1,1423561	2,81	0,0368
Coleta	1	0,0919900	0,0919900	0,23	0,6367
Tratamento*coleta	4	0,5190588	0,1297647	0,32	0,8637
Covariável	1	322,4520542	322,4520542	792,95	<0,0001
Resíduo	44	17,8924458	0,4066465		
CV (%)	4,67				
Média geral	13,64				

Tabela 62A. Análise de variância e coeficiente de variação para concentração de hemoglobina corpuscular média

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	1,22268778	0,30567194	0,27	0,8971
Coleta	1	0,21284513	0,21284513	0,19	0,6681
Tratamento*coleta	4	1,68349529	0,42087382	0,37	0,8297
Covariável	1	4,03692622	4,03692622	3,54	0,0669
Resíduo	43	49,10207378	1,14190869		
CV (%)	3,22				
Média geral	33,20				

Tabela 63A. Análise de variância e coeficiente de variação para contagem de leucócitos

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	138,1584483	34,5396121	1,31	0,2812
Coleta	1	45,7574946	45,7574946	1,74	0,1945
Tratamento*coleta	4	28,1476910	7,0369227	0,27	0,8973
Covariável	1	122,2050570	122,2050570	4,64	0,0370
Resíduo	42	1105,734443	26,327011		
CV (%)	26,21				
Média geral	19,57				

Tabela 64A. Análise de variância e coeficiente de variação para contagem de linfócitos

Efeito	GL	SQ	QM	FC	Pr> Fc
Tratamento	4	119,9595075	29,9898769	0,18	0,9486
Coleta	1	1,2076400	1,2076400	0,01	0,9329
Tratamento*coleta	4	371,2232940	92,8058235	0,55	0,6997
Covariável	1	865,7210626	865,7210626	5,14	0,0285
Resíduo	43	7249,312271	168,588657		
CV (%)	28,27				
Média geral	45,94				