Universidade de São Paulo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Lisia Bertonha Correa

Efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre no desempenho, “status” de Cu, fermentação ruminal, metabolismo e oxidação de lipídios em bovinos

Pirassununga
2010

Lisia Bertonha Correa

Efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre no desempenho, “status” de Cu, fermentação ruminal, metabolismo e oxidação de lipídios em bovinos

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti

Pirassununga

2010

À Deus:

Pela vida maravilhosa que me deu e
por ser a luz que guia o meu
caminho.

Agradeço

Aos meus pais:

Gabriel e Julia, pela compreensão da minha
ausência e por todo o estímulo e apoio para que
eu nunca desistisse de nenhum desafio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela bolsa e auxílio concedidos, fundamentais para a realização deste projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti, pela competência, orientação e apoio ao projeto.

Aos meus irmãos, Lucas e Douglas, pela amizade e companheirismo.

À minha querida vovó Myrtes, por todo amor e dedicação em todos os anos de minha vida. Ao meu tio João Fábio, por toda a força e incentivo aos estudos.

Aos professores: Mariza Pires, João Negrão, Catarina Gomide em cujos laboratórios foram realizadas as análises. Aos funcionários da seção de pós-graduação e aos técnicos de laboratório: Silvana, Sandra, Cunha, pela boa vontade e por todo o suporte prestado.

Ao professor Saulo Luz pela ajuda com a análise estatística dos dados deste projeto.

À pós-doutoranda Alessandra pela grande colaboração nas análises relacionadas à carne. Aos amigos Cucco e Chico pela ajuda com o ultrassom.

Ao funcionário Armando e aos estagiários: Janaína, Coelho, Renata, Bisteca, Murilo, Priscila, Daniele e Paulo pela grande ajuda na execução do experimento e das análises laboratoriais. Aos funcionários da fábrica de ração, do fistulados e do matadouro pelo apoio e disposição.

Aos amigos Gustavo Del Claro, pelo incentivo à pesquisa e pela ajuda de sempre e Arlindo pela grande ajuda no experimento.

Às amigas Andrezza, Fernanda Paiva, Fernanda Lunardi, Natalia, Marília, Fabiola e Fernanda Machado, Reça, Ariadne, Camilinha, Dani, Giselle, Adriana, Priscila Sá, Priscila Castro, Laurie, Louise e aos amigos Salvador, Yuri, Celso pela presença constante em minha vida, tanto nos momentos bons, quanto nos ruins.

Enfim, à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste projeto.

RESUMO

CORREA, L.B. **Efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre no desempenho, “status” de Cu, fermentação ruminal, metabolismo e oxidação de lipídios em bovinos.** 2010. 124p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

O cobre está associado ao metabolismo de lipídios, sendo bastante importante na redução do colesterol, e à estabilidade oxidativa da carne, por fazer parte de algumas enzimas antioxidantes. Porém, quando na forma iônica, é considerado um elemento pró-oxidante. O cobre orgânico não apresenta esse efeito e, além disso, geralmente apresenta maior biodisponibilidade que fontes inorgânicas. Desse modo, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito da suplementação com dois níveis e duas fontes de cobre (inorgânica e orgânica) sobre o desempenho, concentração de cobre no fígado, músculo e sangue, fermentação ruminal, parâmetros oxidativos e metabolismo de lipídios e colesterol. Trinta e cinco bovinos da raça Nelore em fase de terminação foram divididos em 5 grupos, com 7 animais por tratamento, conforme descrição: 1) C: Dieta controle, sem a suplementação adicional de cobre; 2) I10: suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; 3) I40: suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; 4) O10: suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; 5) O40: suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre. A suplementação com cobre proporcionou maior concentração e acúmulo de Cu no fígado ($p < 0,05$), sendo a maior média observada para o tratamento O40, porém, o “status” de Cu no músculo e no soro não foram alterados pelos tratamentos. A maior atividade da ceruloplasmina ($p < 0,05$) foi observada para o tratamento I40. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) para ganho de peso diário,

ingestão de matéria seca, eficiência alimentar, rendimento de carcaça quente e fria, perda pelo frio, espessura de gordura subcutânea e área de olho de lombo dos bovinos, entre os tratamentos controle e suplementação com cobre inorgânico ou orgânico. O pH ruminal, os ácidos graxos voláteis e o nitrogênio amoniacal também não foram influenciados ($p>0,05$) pelos tratamentos. Em geral, a suplementação com cobre alterou o perfil de ácidos graxos da carne ($p<0,05$), com aumento na proporção de ácidos graxos insaturados em detrimento dos ácidos graxos saturados. Não houve efeito de tratamento para TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) no fígado e na carne embalada a vácuo ($p>0,05$), porém houve redução nos valores de TBARS na carne dos bovinos suplementados com Cu para as amostras dispostas no “Display Life” (tratamentos I40 e O40, $p=0,06$), e na atmosfera modificada (tratamentos I10, I40, O10 ou O40, $p<0,05$), em relação ao tratamento controle. A suplementação com Cu (tratamentos I40 e O40) aumentou a atividade da SOD (superóxido dismutase) ($p<0,05$), em relação ao tratamento controle, mas não influenciou a atividade da GSH-Px (glutathione peroxidase) ($p>0,05$). Não houve efeito da suplementação sobre triglicérides e colesterol no sangue; entretanto, em geral, houve redução da concentração de colesterol no músculo *L. dorsi* ($p<0,05$), em relação ao tratamento controle, através da redução ($p<0,05$) da concentração de GSH e da relação GSH/GSSG.

Palavras-chave: antioxidantes, colesterol, enzimas, minerais.

ABSTRACT

CORREA, L.B. **Effects of copper sources and levels on performance, Cu status, ruminal fermentation, metabolism and oxidation of lipids in cattle.** 2010. 124p. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Copper is associated with lipid metabolism, becoming very important in reducing cholesterol, and with oxidative stability of meat, because it is part of some antioxidant enzymes. However, when in the ionic form, is considered a pro-oxidant element. The organic copper did not exhibit this effect and, besides, presents higher bioavailability than inorganic sources. Thus, the aim of this study was to determine the supplementation effect of two levels and two sources of copper (inorganic and organic) on the performance, Cu concentration in liver, muscle and blood, ruminal fermentation, oxidative parameters and metabolism of lipids and cholesterol. Thirty-five Nellore cattle in the finishing phase were divided into 5 groups with 7 animals per treatment, as described: 1) C: control diet, without additional Cu supplementation; 2) I10: 10mg Cu/kg DM, as Cu sulfate; 3) I40: 40mg Cu/kg DM, as Cu sulfate; 4) O10: 10mg Cu/kg DM, as Cu proteinate; 5) O40: 40mg Cu/kg DM, as Cu proteinate. Supplementation with copper provided higher Cu concentration and accumulation in the liver ($p<0.05$), with the highest mean observed for the O40 treatment, nevertheless the Cu status in muscle and serum were not affected by treatments. The highest activity of ceruloplasmin ($p<0.05$) was observed for the I40 treatment. There was no significant effect ($p>0.05$) for daily weight gain, dry matter intake, feed efficiency, hot and cold carcass yield, cold loss, backfat and loin eye area of cattle, among control treatment and supplementation with inorganic or organic copper.

Ruminal pH, volatile fatty acids and ammonia were not influenced ($p>0.05$) by treatments. In general, copper supplementation altered the meat fatty acid profile ($p<0.05$), with an increase in the proportion of unsaturated fatty acids over saturated fatty acids. There was no treatment effect for TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) in liver and meat vacuum packed ($p>0.05$), but there was a reduction in TBARS values in meat from cattle supplemented with Cu for samples prepared on Display Life (treatment I40 and O40, $p=0.06$), and modified atmosphere (treatment I10, I40, O10 and O40, $p<0.05$), compared to the control treatment. Supplementation with Cu (treatment I40 and O40) increased the activity of SOD (superoxide dismutase) ($p<0.05$) compared to control treatment, but did not influence the activity of GSH-Px (glutathione peroxidase) ($p>0.05$). There was no effect of supplementation on triglycerides and cholesterol in blood, however, there was a reduction in cholesterol concentration in *L. dorsi* muscle ($p<0.05$) compared to the control treatment, by reducing ($p<0.05$) of GSH concentrations and the GSH/GSSG ratio.

Key-words: antioxidants, cholesterol, enzymes, minerals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Baías individuais.....	50
Figura 2. Biópsia de fígado.....	51
Figura 3. Colheita de sangue.	54
Figura 4. Pesagem dos animais.	54
Figura 5. Ultrassonografia	55
Figura 6. Abate dos animais por sangria na veia jugular e evisceração.....	56
Figura 7. Mensuração do pH do líquido ruminal.....	57
Figura 8. Colheita de fígado.	57
Figura 9. Mensuração do pH da carcaça.	58
Figura 10. Mensuração da AOLC no músculo L. Dorsi.	58
Figura 11. Amostras congeladas em nitrogênio líquido.....	59
Figura 12. Amostras de carne acondicionadas em Display Life (DL), em atmosfera modificada (ATM) e embaladas a vácuo (VC).....	61
Figura 13. Homogeneização em homogenizador tipo “Potter”, separação da fase hexânica e secagem sob N ²	63
Figura 14. Análise de TBARS: homogeneização, centrifugação, banho a 90°C e leitura da absorbância em espectrofotômetro.	64
Figura 15. Homogeneização do fígado em tampão fosfato, adição do NADPH e leitura em espectrofotômetro a 340nm por 3 minutos.	65
Figura 16. Concentrações médias de cobre em mg/kg de fígado (base seca) e erros padrões, de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica....	68

Figura 17. Concentrações médias de cobre em mg/kg de fígado (base seca) de bovinos recebendo dieta controle ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.....	68
Figura 18. Acúmulo de cobre no fígado (base seca) e erros padrões, em mg/kg, de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.....	69
Figura 19. Atividade da ceruloplasmina no soro e erros padrões, em U/l, de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.	75
Figura 20. Espessura de gordura subcutânea (EGSU) e espessura de gordura da picanha (EGPU) dos bovinos, e erros padrões, em mm, obtidas por meio de ultrassom durante o confinamento experimental.....	83
Figura 21. Área de Olho de Lombo (AOLU) dos bovinos e erros padrões, em cm ² , obtida por meio de ultrassom durante o confinamento experimental.	83
Figura 22. Concentração de N-NH ₃ e erros padrões, em mg/dl, no rúmen de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.	87
Figura 23. Porcentagem de ácidos graxos saturados e insaturados do músculo <i>L. dorsi</i> de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica....	90
Figura 24. Porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados do músculo <i>L. dorsi</i> de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.....	90
Figura 25. Oxidação lipídica, mensurada através do TBARS e erros padrões, em mg/kg do músculo <i>L. dorsi</i> de bovinos Nelore recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica, armazenado em DL, ATM ou VC.	94

Figura 26. Atividade da enzima SOD, em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, no fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.	100
Figura 27. Atividade da enzima GSH-Px, em nmol/min/mg de proteína, no fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.....	100
Figura 28. Atividade das enzimas antioxidantes: SOD e GSH-Px.....	103
Figura 29. Concentrações médias de glutathiona (GSH), em $\mu\text{mol/g}$ de fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.....	105
Figura 30. Concentrações médias de GSSG, em $\mu\text{mol/g}$ de fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.	105
Figura 31. Relação GSH/GSSG no fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.....	106
Figura 32. Concentração média de colesterol, em mg/100g de carne, no músculo <i>L. dorsi</i> de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica..	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual e análise bromatológica da dieta basal, em base seca.....	53
Tabela 2. Concentrações médias de cobre (base seca), em mg/kg de músculo, fígado, e acúmulo de Cu no fígado de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.	67
Tabela 3. Concentrações médias de cobre (mg/l) e atividade da ceruloplasmina (U/l), no soro de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante o confinamento experimental.	73
Tabela 4. Médias de ganho de peso diário (GPD), em kg por dia, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante os períodos experimentais (0, 28, 56 e 84 dias).	77
Tabela 5. Médias de ingestão de matéria seca (IMS) diária, em kg por dia, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante os períodos experimentais (0, 28, 56 e 84 dias).....	77
Tabela 6. Eficiência alimentar média (ganho de peso / ingestão de matéria seca) de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante os períodos experimentais (0, 28, 56 e 84 dias).....	78
Tabela 7. Médias de rendimentos de carcaça quente (RCQ) e fria (RCF), em porcentagem do peso vivo, e perda pelo frio (PF), em porcentagem da carcaça quente, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.	80
Tabela 8. Valores médios de espessura de gordura subcutânea (EGSC), em mm, e área de olho de lombo (AOLC), em cm ² , obtidos durante a desossa, a partir do músculo L. dorsi de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.	82

Tabela 9. Médias de espessura de gordura subcutânea (EGSU) e espessura de gordura na picanha (EGPU), em mm, e área de olho de lombo (AOLU), em cm ² , obtidas por meio do ultrassom durante o confinamento experimental, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.....	82
Tabela 10. Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal (N-NH ₃), em mg/dl, e as porcentagens dos ácidos acético, propiônico e butírico no rúmen de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.....	85
Tabela 11. Perfil de ácidos graxos (%) do músculo L. dorsi de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.....	89
Tabela 12. Médias de TBARS, em mg/kg de fígado e do músculo L. dorsi de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu e armazenamento em Display Life (DL), atmosfera modificada (ATM) ou embalagem a vácuo (VC).....	93
Tabela 13. Médias de TBARS, em mg/kg do músculo L. dorsi de bovinos Nelore, nos tempos 0, 1, 2 e 3 dias no Display Life (DL), 0, 3, 6 e 9 dias em atmosfera modificada (ATM) e 0, 7 e 14 dias embalados a vácuo (VC).....	93
Tabela 14. Valores médios das variáveis de cor (L*, a* e b*) mensuradas na carne de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, armazenada em Display Life (DL) ou atmosfera modificada (ATM)	98
Tabela 15. Valores médios das variáveis de cor (L*, a* e b*) mensuradas na carne de bovinos Nelore, nos tempos 0, 1, 2 e 3 dias no Display Life (DL) e 0, 3, 6 e 9 dias em atmosfera modificada (ATM).	98
Tabela 16. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), em µmol/mg de proteína e glutational peroxidase (GSH-Px), em nmol/minuto/mg de proteína, no fígado de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.....	99

Tabela 17. Concentrações médias de GSH e GSSG, em $\mu\text{mol/g}$ de fígado e da relação GSH/GSSG, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.104

Tabela 18. Concentrações médias de triglicérides e colesterol total no plasma, em mg/dl e de colesterol ($\text{mg}/100\text{g}$ de carne) no músculo L. dorsi de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante o confinamento experimental.108

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta
AGV – ácidos graxos voláteis
AOLC - área de olho de lombo na carcaça
AOLU - área de olho de lombo por ultrassom
ATM - atmosfera modificada
BSO - L-butionina sulfoximina
cm² – centímetros quadrados
CNF - carboidrato não fibroso
CO₂ - gás carbônico
Cu - cobre
CuSO₄ - sulfato de cobre
dl - decilitro
DL - Display Life
DTNB - ditionitrobenzóico
EA – eficiência alimentar
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
EGPU - espessura de gordura na picanha por ultrassom
EGSC - espessura de gordura subcutânea na carcaça
EGSU - espessura de gordura subcutânea por ultrassom
EPM – erro padrão da média
FDA - fibra em detergente ácido
FDN - fibra em detergente neutro
Fe - ferro
g - grama
GPD - ganho de peso diário
GR - glutathione redutase
GSH - glutathione reduzida
GSH-Px - glutathione peroxidase
GSSG - glutathione oxidada
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HMG-CoA - 3-hidroxi-3metil-glutaril-CoA
kg - quilograma
KOH - hidróxido de potássio
l - litro
IMS – ingestão de matéria seca
mg - miligrama
mm - milímetros
Mo - molibdênio
MP - masterpack
MS - matéria seca
N₂ - nitrogênio
NaCl - cloreto de sódio
NaHCO₃ - bicarbonato de sódio
NBT - Nitro Blue Tetrazolium
NEM - N-etilmaleimida
N-NH₃ - nitrogênio amoniacal
O₂ - oxigênio
PF – perda pelo frio
RCQ - rendimento de carcaça quente
RCF - rendimento de carcaça fria
S - enxofre
SOD - superóxido dismutase
TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TM - tiomolibdato
TNB - ácido tionitrobenzóico
U – unidade (1U = 1μmol/ml)
VC - vácuo
Zn - zinco
μg micrograma
μl - microl

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 O elemento mineral cobre.....	21
2.1.1 Metabolismo do cobre	22
2.1.2 Funções fisiológicas do cobre	24
2.1.3 Deficiência de cobre.....	24
2.1.4 Toxicidade do cobre	26
2.1.5 Necessidades de cobre.....	29
2.1.6 Status do cobre no organismo	29
2.2 Minerais inorgânicos X orgânicos	32
2.3 Cobre e Estabilidade Oxidativa.....	37
2.4 Cobre e Metabolismo de Lipídeos	42
2.5 Cobre e Fermentação Ruminal.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Local e Período.....	50
3.2 Animais	50
3.3 Tratamentos.....	51
3.4 Procedimento experimental	53
3.5 Procedimento Analítico	62
3.6 Delineamento experimental	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1 “Status” de cobre	67
4.2 Desempenho	76
4.3 Rendimento de carcaça e perda pelo frio	80
4.4 Espessura de gordura e Área de olho de lombo.....	81
4.5 Fermentação ruminal	85
4.6 Perfil de ácidos graxos na carne.....	88
4.7 Estabilidade oxidativa	92
4.8 Enzimas antioxidantes	99
4.9 GSH, GSSG e relação GSH/GSSG	104

4.10 Concentrações de triglicérides e colesterol no sangue e músculo	107
5. CONCLUSÃO.....	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

1. INTRODUÇÃO

A busca por uma alimentação saudável é uma preocupação constante para o homem na atualidade, atingindo grande parte da população mundial. A carne bovina é rica em diversos nutrientes, sendo freqüentemente relacionada às doenças cardiovasculares pela sua proporção de ácidos graxos saturados e pelo teor de colesterol. Alguns experimentos sugeriram que a suplementação de cobre (Cu) proporciona diminuição na concentração de colesterol no músculo *Longissimus Dorsi*, além de aumento dos ácidos graxos insaturados em detrimento dos saturados. O efeito da suplementação de Cu na produção de carnes mais saudáveis traria benefícios à saúde pública.

Os minerais participam de várias funções biológicas, interagindo com outros nutrientes e também entre si, o que torna seu estudo complexo, porém essencial para compreensão e solução de problemas que envolvem a nutrição animal. Como no Brasil há deficiência comprovada de cobre na maioria das regiões, e como o Cu tem grande importância para bovinos, o estudo de suas fontes é fundamental, já que a sua suplementação é imprescindível.

O cobre, na sua forma iônica é considerado um elemento pró-oxidante e pode estimular a peroxidação lipídica no alimento ou no trato intestinal, porém, possui alta capacidade de se ligar a proteínas (LUZY e SPEISKY, 1996), como por exemplo, a superóxido dismutase que funciona como antioxidante, atuando contra os radicais livres. O Cu orgânico por sua vez não possui essa propriedade pró-oxidante, podendo ser mais benéfico aos animais. Além disso, o Cu orgânico (quelado a um aminoácido) geralmente tem maior (talvez 2 vezes mais) disponibilidade que fontes inorgânicas de Cu (NOCKELS et al. 1993), por não interagir com outros elementos e talvez por ser absorvido por rotas metabólicas diferentes. Desse modo, a utilização

de Cu na forma orgânica pode melhorar o status de Cu no organismo e, conseqüentemente, incrementar os bons resultados obtidos com a suplementação de Cu na forma inorgânica, com relação ao metabolismo de lipídeos e possível redução do colesterol na carne, parâmetros oxidativos, entre outros. Em função da maior disponibilidade do Cu na forma orgânica há a possibilidade da utilização de níveis inferiores na dieta, diminuindo assim a eliminação fecal e conseqüentemente a contaminação do meio ambiente, que tem sido uma preocupação cada vez maior.

Além disso, os resultados da suplementação de Cu em bovinos variam, além da forma química, com a raça animal e, como praticamente não há trabalhos, tornam-se interessantes estudos com animais da raça Nelore. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da suplementação de dois níveis e duas fontes de cobre (inorgânica e orgânica) sobre o desempenho, concentração de Cu no fígado, músculo e sangue, parâmetros ruminais, estabilidade oxidativa e metabolismo de lipídios e colesterol em bovinos da raça Nelore.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os minerais podem atuar de forma direta ou indireta em diversos processos, participando desde a formação dos ossos até o equilíbrio elétrico das células. Desse modo, constituem-se numa classe de nutrientes que possui grande participação em uma série de funções biológicas.

Já está comprovado que os seguintes elementos minerais desempenham funções essenciais no organismo e, por isso, devem estar presentes no alimento: cálcio, fósforo, sódio, potássio, selênio, molibdênio, cloro, magnésio, ferro, enxofre, iodo, manganês, cobre, cobalto, zinco, flúor, níquel, vanádio, silício, cromo e estanho. A prova de que cada um desses elementos é essencial, reside nas experiências realizadas com uma ou mais espécies animais. Nessas experiências, os sintomas produzidos por dietas adequadas em todos os nutrientes, com exceção dos minerais em questão, foram prevenidos ou superados pelo acréscimo dos mesmos às dietas. Os elementos acima mencionados não foram testados em todas as espécies, porém é muito provável que sejam indispensáveis a todos os vertebrados.

2.1 O elemento mineral cobre

A presença do cobre nos tecidos animais foi verificada por Boutigni (1933), sendo a sua importância na nutrição reconhecida, por Mc Hargue (1926), quando demonstrou que o Cu era essencial para os ratos (ambos autores citados por ANDRIGUETTO, 1981). Em 1928, Hart e colaboradores demonstraram que o Cu, relacionado com a síntese de hemoglobina, é necessário para a recuperação da anemia em ratos (AMMERMAN et al., 1995).

O cobre é um constituinte normal e constante do organismo animal. Sua maior concentração verifica-se no fígado, entretanto, a concentração nos tecidos varia com a espécie, idade, e estado nutricional do animal. Além disso, existem variações individuais muito grandes dentro das espécies. Em geral, animais mais jovens possuem maiores concentrações de Cu no fígado que os animais adultos. Porém, os bovinos e os ovinos constituem exceções. Nos ovinos, esta concentração aumenta com o desenvolvimento do animal, e nos bovinos, a variação na concentração de Cu no fígado, conforme a idade é muito pequena, podendo acontecer de o ruminante jovem apresentar teores mais elevados que o adulto (ANDRIGUETTO, 1981).

2.1.1 Metabolismo do cobre

Em muitas espécies animais o cobre é geralmente absorvido entre 5-10% do ingerido por animais adultos e 15-30% por animais jovens. Em ruminantes, apenas 1-3% do Cu é absorvido, sendo que os pré-ruminantes absorvem o Cu com eficiência semelhante aos monogástricos (McDOWELL, 1992). Suttle (1974), trabalhando com cordeiros, verificou em fase de aleitamento, uma absorção de 47%, enquanto que após o desmame a absorção foi de 10%. Animais de idades similares, do mesmo sexo, estado fisiológico e num mesmo ambiente podem apresentar diferenças na eficiência de utilização do Cu (McDOWELL, 1992). A absorção do Cu depende da forma química pela qual é administrado, do nível dietético de outros minerais como ferro (Fe), zinco (Zn), molibdênio (Mo) e enxofre (S) que reduzem a absorção e, também da acidez do conteúdo intestinal na área de absorção.

Dependendo da espécie estudada, o cobre pode ser absorvido em todos os segmentos do trato gastrointestinal, embora alguns locais do intestino delgado

tenham um maior papel na absorção do Cu. Uma absorção considerável tem sido demonstrada no estômago de humanos e no intestino grosso de ovelhas (O'DELL e SUNDE, 1997). Existem evidências que a absorção intestinal do Cu é regulada pela necessidade do organismo, e que a metalotioneína na célula epitelial do intestino tem um papel chave nesta regulação. A absorção de Cu é alta após um período de deficiência até que o nível adequado seja atingido (McDOWELL, 1992). O Cu parece ser absorvido por dois mecanismos, um saturado e outro insaturado, sugerindo transporte ativo para uma forma e difusão simples para outra (KEGLEY e SPEARS, 1994).

O cobre absorvido vai para o soro, sendo transportado até o fígado, principal órgão de estocagem. Níveis de Cu no sangue inferiores a 0,5mg/l são indicativos de deficiência, segundo Underwood (1969). Nas células vermelhas do sangue, o Cu está presente na forma de um complexo cobre-proteína, denominado hemoproteína (ANDRIGUETTO, 1981). No plasma sanguíneo de mamíferos, cerca de 90% do Cu está na forma de ceruloplasmina. No fígado, que é o órgão central do metabolismo do cobre, e cuja concentração reflete o nível de Cu que está sendo ingerido (McDOWELL, 1992), é armazenado como eritrocupreína, ceruloplasmina ou nas várias enzimas que contêm Cu, presente nas células (ANDRIGUETTO, 1981). A ceruloplasmina, sintetizada no fígado e secretada no sangue, é o carreador específico que exporta Cu do fígado para os órgãos alvos (McDOWELL, 1992).

Em vários estudos foi verificado que alta proporção de cobre ingerido aparece nas fezes, portanto não é absorvido, mas também ocorrem excreções via bile, urina e pequenas quantidades na respiração (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

2.1.2 Funções fisiológicas do cobre

São várias as funções metabólicas desempenhadas pelo cobre no organismo animal. É um mineral necessário para a respiração celular, desenvolvimento de tecido conjuntivo, mineralização dos ossos, queratinização e pigmentação de tecidos, formação e manutenção da integridade do sistema nervoso central e do miocárdio (ANDRIGUETTO, 1981). Também é essencial para o bom funcionamento do sistema imune, metabolismo do colesterol e glicose, entre outras funções. Além disso, está envolvido em grande número de reações enzimáticas, sendo componente essencial de importantes metaloenzimas, como citocromo-oxidase, amino-oxidase, catalase, superóxido dismutase e tirosinase (AMMERMAN et al., 1995). O Cu tem um importante papel na absorção e mobilização do ferro, onde baixos níveis de ferro são encontrados no soro na deficiência de Cu. A ceruloplasmina que é sintetizada no fígado e contém Cu, é necessária para oxidação do ferro, permitindo-o ligar com a proteína transportadora de ferro (transferrina). A anemia pode ser desenvolvida na deficiência de Cu ou Fe, sendo que na deficiência de Cu ocorre um atraso na maturação e menor tempo de vida das células vermelhas do sangue (O'DELL e SUNDE, 1997).

Entretanto, o cobre é um elemento tanto essencial quanto tóxico ao organismo animal. Seu nível no fígado aumenta se houver fornecimento de dieta rica neste elemento ou diminui caso a dieta fornecida seja pobre em Cu. Tanto a deficiência como a toxicidade são prejudiciais aos animais.

2.1.3 Deficiência de cobre

A deficiência de cobre provoca uma grande variedade de manifestações clínicas em diferentes espécies. A anemia é o sintoma geral que caracteriza essa

deficiência em todas as espécies (ANDRIGUETTO, 1981). Outros sintomas têm sido observados em animais mais deficientes em Cu, como: diarreia, falhas reprodutivas, perda de pigmentação, falhas na queratinização, distúrbios ósseos, desmielinização do sistema nervoso central e da medula espinhal, fibrose do miocárdio, prejuízo do apetite e do crescimento, entre outros. Também há alteração da resposta imune em humanos e animais (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

A deficiência de cobre afeta a enzima citocromo oxidase, que é uma enzima importante na oxidação terminal da cadeia respiratória. Ela catalisa e reduz O_2 para água, uma essencial etapa na respiração celular. A deficiência também prejudica a formação de colágeno e elastina, pois a enzima lisil oxidase depende do Cu para dar às proteínas estruturais rigidez e elasticidade (McDOWELL, 1992).

Com relação à falta de pigmentação, ela é principalmente observada na deficiência de cobre nos pêlos e lã de mamíferos, sendo geralmente atribuída à deficiência de tirosinase, responsável pela quebra e conversão de tirosina para melanina (McDOWELL, 1992). A perda de pigmentação da lã é um sinal comum em carneiros, aparecendo bandas pigmentadas e despigmentadas em alternância (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999).

Alguns estudos têm demonstrado que a deficiência de cobre afeta também o metabolismo de lipídeos, sendo que esta deficiência resulta em elevado nível de triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol no soro de ratos. Alterações no sistema circulatório de ratos alimentados com baixo Cu na dieta estão associadas com alterações no metabolismo de lipídeos e ácidos graxos de cadeia longa (McDOWELL, 1992).

Em ruminantes, a deficiência pode ser devido à ausência de Cu ou induzida por altos níveis de outros minerais como Mo e S. Um sinal comum em cordeiros e

cabritos jovens é a paralisia e incoordenação das pernas por afetar a mielina do sistema nervoso central (NRC, 1985). Em bezerros, o baixo nível de Cu tem sido associado com o desenvolvimento de úlceras abomasais, onde estes tinham de 45 a 48µg de Cu/g de fígado, comparado com os animais controle com 245µg de Cu/g de fígado (LILLEY et al., 1985). As investigações sugerem que o efeito pode ser devido á baixa imunidade ou á fraqueza estrutural do abomaso em bezerros Cu-deficientes. Riet-Correa et al. (1993), relataram a ocorrência de mortes súbitas e, adicionalmente, a ocorrência da hipomielinogênese congênita em bovinos. Todos os casos de morte súbita e de ataxia neonatal, assim como a resposta positiva à suplementação com Cu, foram realizadas experimentalmente.

A deficiência subclínica tem grande efeito na economia por prejudicar a produção de leite, crescimento e reprodução, sem apresentar evidências de que se trata de deficiência de cobre.

2.1.4 Toxicidade do cobre

Diversos casos de intoxicação espontânea por cobre têm sido diagnosticados no Brasil. Os ruminantes são mais sensíveis do que os não-ruminantes. Os ovinos e os bovinos parecem ter uma capacidade mais baixa para excretar o Cu através da bile (CHARMLEY e SYMONDS, 1985). Um mecanismo adaptável pode existir nos bovinos alimentados com elevado Cu dietético para impedir a toxicidade do mineral como, por exemplo, redução na absorção ou aumento da excreção via urina ou bile. Entretanto, em determinadas situações, os mecanismos homeostáticos do Cu são inadequados e o Cu dietético elevado pode conduzir á toxicidade desse mineral nos bovinos (BRADLEY, 1993). Em geral, segundo o NRC (2005), bovinos toleram níveis de 40mg/kg e ovinos 25mg/kg, enquanto suínos e aves podem receber

rotineiramente de 100 a 250mg/kg de Cu na forma de CuSO_4 . A máxima concentração de Cu tolerada por bovinos de corte tem sido estimada em 100mg/kg. Os adultos são mais suscetíveis que os jovens. Em bezerros alimentados com 115mg/kg de Cu por 91 dias foram encontrados sinais de toxidez (NRC, 2000). A toxicidade é variável entre os ruminantes, sendo o ovino a mais sensível das espécies (SOLI, 1980). Variações quanto à tolerância à toxicidade do Cu, também têm sido relatadas entre raças de animais, por exemplo, ovinos da raça Merino, são mais tolerantes ao Cu do que outras raças de ovinos (McDOWELL, 1992).

A severidade da intoxicação do cobre depende da espécie animal, da forma química do cobre ingerido, dos teores de outros minerais presentes na dieta. O consumo excessivo e prolongado de Cu pelos animais provoca um elevado acúmulo nos tecidos, principalmente no fígado, que tem uma capacidade de armazenar este elemento sem provocar intoxicação. Os sinais de intoxicação em bovinos ocorrem somente depois que a capacidade de armazenamento do fígado se esgote. Quando isso ocorre, o Cu é liberado rapidamente para o sangue, causando uma crise hemolítica, que é caracterizada por hemoglobinemia e hemoglobinúria, associada com icterícia aguda (ANDRIGUETTO, 1981).

Intoxicação por cobre pode levar o animal à anemia, prejudicar o crescimento e ocasionar problemas reprodutivos e, em estágios mais avançados, vômitos, salivação, convulsão, paralisia, podendo levar a morte (NRC, 1980). Os animais intoxicados por Cu podem apresentar dois quadros clínicos distintos. O primeiro caracteriza-se pela intoxicação aguda, na qual o animal apresenta uma severa gastroenterite logo após a uma alta ingestão desse mineral. O segundo, denominado de intoxicação crônica, é o mais comum e caracteriza-se pelo acúmulo de Cu principalmente no fígado, sem manifestações de sinais clínicos; posteriormente, sob

algum fator desconhecido, o Cu é liberado causando uma hemólise maciça, e que provocará icterícia e hemoglobinúria. A intoxicação aguda é geralmente observada após administração accidental de quantidades excessivas de sais de Cu, que podem estar presentes em anti-helmínticos, misturas minerais e dietas formuladas erroneamente (NRC, 1980). A intoxicação crônica por cobre ocorre geralmente em animais em regime de pastejo com alta ingestão de Cu e baixa ingestão de Mo e S (NRC, 1985). Concentrados com mais de 20mg/kg de Cu podem causar intoxicação crônica primária de acordo com Blood et al. (1979, citados por RIET-CORREA et al., 1989). Aumentando-se o Mo na dieta, pode-se evitar a intoxicação por Cu, porém em novilhos recebendo 13,3mg de Mo/kg de MS, houve redução na quantidade de proteína absorvida pelo intestino (BOILA e GOLFMAN, 1991).

Em ovinos, o fígado contém aproximadamente metade do total de cobre da carcaça (LANGLANDS et al., 1984). Níveis de Cu superiores a 500mg/kg no fígado e de 100mg/kg nos rins indicam a ocorrência da intoxicação de acordo com Pope (1971, citado por RIET-CORREA et al., 1989). Pilati et al. (1990) descreveram dois surtos de intoxicação crônica por Cu em ovinos, com morte de pelo menos 21 animais. Os valores de Cu no fígado, em quatro de cinco animais, oscilaram entre 1212 e 2071mg/kg e no rim, também em quatro de cinco ovinos, entre 124 e 159mg/kg.

Toxidez crônica de cobre foi reportada em vacas leiteiras alimentadas com 37,5mg de Cu/kg de MS (43% de concentrado) durante a lactação e 22,6mg de Cu/kg de MS durante o período seco (BRADLEY, 1993).

2.1.5 Necessidades de cobre

As necessidades de cobre, principalmente para ruminantes, dependem muito de vários fatores presentes na dieta. Em geral, as recomendações não devem ser feitas para animais em regime de pastejo, sem antes ter a referência da forragem quanto à concentração de Cu, Mo e S. Para carneiros em pastagem deficiente em Cu, tem-se recomendado 8 a 10mg/kg (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Em geral, 10mg/kg de Cu para bovinos parece ser adequado (NRC, 1996). Considerando-se que 5 a 8mg/kg de Cu na MS da pastagem são suficientes para a manutenção adequada de animais, baseando-se no nível inferior, pode-se calcular uma quantidade diária de 50mg de Cu para bovinos e 5mg para ovinos (ANDRIGUETTO, 1981). Entretanto, Davis e Mertz (1987) afirmaram ser difícil determinar um valor único para as exigências de Cu. Essa dificuldade decorre principalmente do fato de haver interações entre o Cu e alguns minerais na dieta, como S, Mo, Fe, entre outros.

Alguns estudos mostraram que a necessidade de cobre e a tolerância ao excesso podem ser afetadas pela genética. Gooneratne e Christensen (1989) relataram que a deficiência de Cu em bovinos da raça Simental no Canadá era mais freqüente do que nas outras raças. As necessidades de Cu também podem aumentar em função da formação de hemoglobina, crescimento, pigmentação dos pêlos e lactação.

2.1.6 Status do cobre no organismo

A concentração de cobre no fígado de ruminantes está correlacionada com a biodisponibilidade de Cu na dieta (McDOWEL, 1992). Essa biodisponibilidade e a concentração de Cu no fígado são afetadas pelas necessidades fisiológicas. De acordo com Mills (1987), quando a ingestão de Cu pelo animal for inferior a sua

necessidade fisiológica, a concentração de Cu e a atividade da ceruloplasmina no plasma não são reduzidas até que o fígado tenha uma reserva de 40mg/kg. Engel et al. (1964), encontraram uma correlação significativa entre concentração de Cu no fígado e plasma quando havia menos que 33mg de Cu/kg de fígado.

Grandes dificuldades surgem em selecionar o indicador apropriado para a avaliação do status de cobre no corpo dos animais (XIN et al. 1991). Nos ruminantes o fígado é particularmente sensível às mudanças no status de Cu (UNDERWOOD, 1977). O fígado é o principal órgão de armazenamento do Cu, portanto, a primeira mudança bioquímica é o declínio da concentração de Cu no fígado (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Cerca de 40 a 70% do Cu absorvido é estocado no fígado, de onde é liberado quando há redução de consumo (CORAH e IVES, 1991). O nível de cobre no fígado tem sido sugerido como um indicador satisfatório do status de Cu, porém, há determinadas limitações como o problema de amostragem e de processamento das amostras, entre outros (SUTTLE e ANGVS, 1976).

Segundo Underwood (1981), a concentração sérica de cobre não é considerada um indicador preciso do status de Cu no organismo a não ser que a deficiência seja severa. Para bovinos, a concentração normal de Cu no plasma está entre 0,6 e 1,1mg/l (MINSON, 1990). Claypool et al. (1975) afirmaram que valores de Cu no plasma de 0,5mg/l ou menores são indicativos de baixas reservas de Cu no fígado. Porém, a concentração de Cu no plasma pode ser enganosa devido ao mecanismo homeostático (DAVIS e MERTZ, 1987). Todd (1970) advogou a estimativa da ceruloplasmina no soro como um bom diagnóstico do status de Cu, por causa da estabilidade da enzima e do pequeno tamanho da amostra de soro requerida. Telfer et al. (1996, citados por SHARMA et al., 2005), defenderam o uso de relações de ceruloplasmina:cobre no diagnóstico de desordens induzidas por Cu

nos ruminantes. Quando as reservas do fígado se aproximam da exaustão, a síntese de ceruloplasmina diminui e a concentração de Cu no plasma cai abaixo do normal, indicando um estado de deficiência (BECK, citado por SHARMA et al. 2005).

Xin et al. (1991) verificaram o efeito da suplementação de Cu sobre a sua distribuição em bovinos da raça holandesa. Os animais foram alimentados com uma dieta basal acrescida de 20mg/kg de Cu na forma de CuSO_4 ou uma dieta basal acrescida de 10mg/kg de Mo na forma de molibdato de amônio. A suplementação de Mo foi utilizada para desenvolver um grupo deficiente em Cu. A concentração de Cu no fígado diminuiu no grupo Cu-deficiente em comparação com o grupo suplementado. A concentração de Cu no plasma não sofreu alteração durante o experimento no grupo suplementado com Cu. No grupo deficiente, a concentração de Cu no plasma aumentou durante os 3 primeiros meses, em seguida declinou e permaneceu sem alteração nos últimos 5 meses do experimento. Sharma et al. (2005), trabalhando com novilhas suplementadas ou não com Cu, na forma de sulfato de cobre (CuSO_4), observaram aumento significativo ($p<0,01$) na concentração de Cu no soro aos 30 dias de experimento. Houve melhora significativa ($p<0,01$) no nível de ceruloplasmina e aumento no nível de Cu no fígado, observados aos 30 dias de tratamento para o grupo suplementado com Cu, enquanto que no grupo não suplementado, a concentração de Cu no fígado foi significativamente ($p<0,01$) inferior aos 60 dias de experimento. Considerando os 180 dias, o valor médio de Cu no fígado para o grupo não suplementado foi de $38,33\pm 1,02\text{mg/kg}$ em comparação com $287,51\pm 3,26\text{mg/kg}$ para o grupo suplementado com o mineral. Senthilkumar et al. (2008), suplementando cordeiros com 7 ou 14mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato ou proteinato de Cu, reportaram maior atividade da ceruloplasmina ($p<0,05$) aos 90 e 180 dias de experimento, em

animais que receberam 14mg/kg de Cu na forma orgânica. Vacas em gestação alimentadas com 5mg/kg de Cu, tiveram um declínio constante do nível desse mineral no fígado durante um período de oito semanas antes do parto. Entretanto, a suplementação com 10mg/kg de Cu preveniu esse declínio (XIN et al. 1993).

A ingestão de Zn, Fe, Mo e S afetam a utilização do cobre (McDOWEL, 1992). Dietas com Mo podem inibir a utilização do Cu, pois no rúmen o Mo combina com o S reduzido para formar tetratiomolibdato, que se une ao Cu dificultando sua absorção. Outras combinações, como o tiomolibdato e o molibdato que são absorvidos do sangue, se unidos ao Cu endógeno, tornam-no indisponível para o processo metabólico (MASON, 1982). No plasma, o Mo que está ligado à proteína remove Cu do fígado aumentando a perda pela urina, embora forme algum complexo Cu-Mo que se acumula no rim (KINCAID e WHITE, 1988).

2.2 Minerais inorgânicos X orgânicos

Estudos em várias espécies têm mostrado que a absorção intestinal do Cu pode ser influenciada pela forma química (UNDERWOOD, 1977), e por interação com outros minerais da dieta como: cálcio, ferro, zinco, cádmio, molibdênio, entre outros, que reduzem a absorção (KEGLEY e SPEARS, 1994) e também afetam a retenção e a distribuição de Cu no organismo. Pesquisas realizadas na Austrália e Nova Zelândia por Lee et al. (1999), para uma melhor compreensão das exigências minerais, critérios de diagnósticos e estratégias de suplementação, também mostraram que a presença de elementos antagônicos como o S, o Fe e o Mo, pode prejudicar a absorção do Cu.

Segundo Couzy et al. (1993), as interações entre minerais essenciais podem ser classificadas em diretas, quando há competição entre os minerais na absorção

intestinal ou na utilização de tecidos; ou indiretas, quando um dos minerais está envolvido no metabolismo do outro, ou quando a deficiência ou toxicidade de um resulta em mudanças hormonais ou danos nos tecidos que por sua vez afetam o metabolismo de outro mineral.

Moraes et al. (1994), analisando pastagens, revelaram níveis de Cu adequados, mas elevados níveis de Mo e principalmente de S, sendo a deficiência de Cu nos animais atribuída à possível interação Cu-Mo-S. Os ruminantes são mais susceptíveis à interação Cu-Mo-S, porque o primeiro efeito ocorre no rúmen através do sulfeto gerado pelas bactérias e, conseqüentemente, há formação do composto tiomolibdato de Cu (AOYAGI e BAKER, 1994), tornando o Cu altamente insolúvel e não utilizável (DICK et al., 1975). O enxofre, na ausência de Mo, também pode causar deficiência de Cu, pela formação de um composto insolúvel, o sulfeto de cobre, no intestino. A formação do sulfeto de Cu e do tiomolibdato de Cu reduzem muito a absorção do Cu por deixá-lo indisponível (NRC, 1984).

Para superar esses efeitos adversos da disponibilidade de Cu, a suplementação desse elemento é, geralmente, necessária. Fornecer Cu em uma forma prontamente disponível que não é acentuadamente influenciada por antagonistas do Cu, pode ser um enfoque lógico para superar esses problemas (DU et al., 1996). A melhora na disponibilidade do Cu na forma de complexos orgânicos, quando comparado com os sais de Cu comumente utilizados (fontes inorgânicas) tem sido sugerida (APGAR e KORNEGAY, 1996). Segundo Kirchgessner e Grassman (1970), quelar o Cu a um aminoácido antes da alimentação pode aumentar a disponibilidade de Cu e melhorar o desempenho. Alguns estudos têm sugerido que o Cu orgânico (quelado a um aminoácido) tem maior (talvez 2 vezes mais) disponibilidade que as fontes inorgânicas (KINCAID et al., 1986; NOCKELS et

al., 1993). Aminoácidos essenciais ligantes têm alta taxa de absorção e o Cu-leucina tem maior absorção e taxa de armazenagem de Cu no fígado (KIRCHGESSNER e GRASSMAN, 1970). A utilização de Cu nas formas de proteinato de Cu e Cu-lisina em ratos foi maior ($p < 0,05$) do que na forma de CuSO_4 , baseado na quantidade de Cu no fígado, sugerindo que complexos de Cu são absorvidos por outro mecanismo, diferente daquele do Cu inorgânico, e não interagem com Zn e Fe. Trabalhos “in vivo” têm demonstrado que minerais sob a forma de sais inorgânicos são ionizados no estômago e absorvidos no duodeno, onde o pH determina sua solubilidade. O transporte para o interior das células dá-se pela difusão passiva ou pelo transporte ativo (proteínas transportadoras). Nessas condições é que podem ocorrer perdas por reação com compostos, ou competição pelos sítios de absorção entre os elementos minerais, com interações antagônicas que podem inibir a absorção. No caso dos minerais orgânicos, as moléculas são absorvidas no jejuno, atravessam as células da mucosa intestinal e passam diretamente para o plasma. A separação do aminoácido quelante se dá no local onde o elemento é utilizado (ASHMED, 1993). A forma como os minerais são absorvidos no trato gastrointestinal afeta significativamente o posterior transporte e armazenamento (COMBS e COMBS, 1986).

Apgar et al. (1995), relataram aumento na deposição de cobre nos fígados dos suínos alimentados com 200mg/kg de Cu-lisina, comparado com os fígados dos suínos que receberam CuSO_4 , sugerindo que talvez a fonte orgânica seja metabolizada de forma diferente da inorgânica. Aoyagi e Baker (1994) relataram que pintinhos recebendo complexos de Cu-lisina e Cu-metionina não tiveram diminuição da biodisponibilidade do Cu quando receberam juntamente altos níveis de L-cisteína e L-ácido ascórbico, que são dois componentes da dieta que reduzem a absorção de

Cu. Essa resposta sugere que o Cu das fontes orgânicas pode ser absorvido de forma diferente e pode ser menos afetado por outros componentes da dieta do que o Cu inorgânico. Entretanto, outros estudos indicaram que complexos de Cu não foram mais efetivos do que o CuSO_4 em melhorar o status de Cu em frangos (BAKER et al., 1991; AOYAGI e BAKER, 1993).

Alguns trabalhos mostraram que a adição de Cu na forma de complexo Cu-lisina resultou em melhora no desempenho de suínos, quando comparado com o CuSO_4 (COFFEY et al., 1994; ZHOU et al., 1994). Coffey et al. (1994), verificando a disponibilidade de Cu em suínos, relataram que em 3 de 7 experimentos, os suínos alimentados com dietas contendo 100mg/kg de Cu-lisina cresceram tão rápido quanto os animais alimentados com dieta contendo 200mg/kg de CuSO_4 . Outros autores, entretanto, não encontraram diferença entre as fontes de Cu (orgânica ou inorgânica) considerando o desempenho de suínos (VAN HEUGTEN e COFFEY, 1992; APGAR et al., 1995).

Com relação aos ruminantes, Muehlenbein et al. (2001) conduziram 2 experimentos para determinar se a suplementação de Cu na forma orgânica e inorgânica para vacas, antes e depois do nascimento da cria, afeta a taxa de reprodução, a saúde e desempenho do bezerro e a concentração de Cu no fígado e soro. Dez dias após o nascimento, as vacas que receberam a dieta controle (sem suplementação de Cu) tiveram diminuição ($p < 0,05$) da concentração de Cu no fígado, e as que foram suplementadas tiveram aumento dessa concentração ($p < 0,05$) em ambos os experimentos. Essa diminuição nas vacas controle indica que a baixa concentração de Cu no feno e a adição de Fe e Mo na alimentação (antagonistas na absorção de Cu) resulta em depleção de Cu no fígado. Não houve diferença entre os tratamentos para o peso corporal e concentração de Cu no soro

aos 60 dias. Também não houve diferença na saúde, na concentração de Cu no soro e no peso dos bezerros desmamados, em ambos os experimentos. Salyer et al. (2004) não encontraram efeito significativo no ganho de peso, ingestão de matéria seca, eficiência alimentar e concentração de Cu no soro de novilhas suplementadas com Cu na forma orgânica ou inorgânica. Ward et al. (1993) também não observaram diferença no ganho de peso e na concentração de Cu no soro de bovinos suplementados por 21 dias com CuSO_4 ou Cu-lisina. Nockels et al. (1993) observaram que bezerros alimentados com Cu-lisina tiveram absorção aparente e retenção de Cu 53% maior que os bezerros alimentados com CuSO_4 . Kincaid et al. (1986) reportaram que proteinato de Cu foi mais disponível que CuSO_4 para o crescimento de bezerros alimentados com forragens contendo Mo. Porém, Wittenberg et al. (1990) não encontraram diferença na disponibilidade de Cu nas formas de proteinato de Cu ou CuSO_4 em bovinos alimentados com dietas de alto Mo. Kegley e Spears (1994) reportaram que fontes orgânicas e inorgânicas de cobre tiveram disponibilidade similar para ruminantes. Em bovinos alimentados com dietas de alto Mo e S, o cloreto de cobre tribásico foi mais biodisponível do que o CuSO_4 (SPEARS et al., 1997). Ward et al. (1996) relataram que proteinato de Cu foi mais disponível do que CuSO_4 para novilhas alimentadas com dietas altas em antagonistas do Cu (Mo e S). Engle e Spears (2000a) reportaram que os bovinos suplementados com proteinato de Cu tenderam a ter maior concentração de Cu no fígado do que aqueles suplementados com igual quantidade de CuSO_4 . Isso sugere que o proteinato de Cu pode ser mais biodisponível do que o CuSO_4 em bovinos alimentados com dieta de alto concentrado.

2.3 Cobre e Estabilidade Oxidativa

Os lipídios são susceptíveis ao ataque por radicais livres e sua oxidação pode ser muito prejudicial devido a sua continuidade como uma reação em cadeia. A oxidação de lipídeos pode ser definida como sendo uma cascata de eventos bioquímicos, resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídios das membranas celulares, gerando principalmente radicais alcoxila e peroxila (CURI et al., 2002). O processo é dividido em três fases: a iniciação, a propagação e a terminação. Na iniciação é retirado um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo insaturado, forma-se então um dieno conjugado onde duas duplas ligações são intercaladas por uma simples. Esses podem sofrer várias reações, em meio aeróbico se combina com o oxigênio formando um peróxido, o qual pode abstrair outro hidrogênio de outro ácido graxo, promovendo assim a etapa de propagação. O dieno também pode se combinar com um átomo de hidrogênio abstraído para formar um hidroperóxido lipídico ou atacar uma dupla ligação na mesma cadeia, gerando peróxidos cíclicos, aos quais também podem propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Na decomposição dos hidroperóxidos são gerados radicais peroxila e alcoxila, onde íons metálicos como o Cu^+ e Cu^{++} podem catalisar essa reação (ESTERBAUER et al. 1992). A etapa de terminação se caracteriza pela aniquilação dos radicais pela presença de antioxidantes, ou pela reação de dois radicais lipídicos originando outros produtos. Os compostos formados nessa fase são voláteis e comprometem as características sensoriais dos alimentos (ARAÚJO, 1995). Os aldeídos são o principal grupo formado nessa fase, eles podem ainda ser oxidados dando origem a outros hidrocarbonetos, outros aldeídos e ácidos.

A oxidação lipídica em carnes pode ser acompanhada através do valor de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), visto que produtos primários

de oxidação lipídica constituem-se principalmente de hidroperóxidos, os quais são rapidamente decompostos em várias substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, particularmente carbonilas, sendo o malonaldeído o elemento mais importante. O malonaldeído é um dialdeído de 3 carbonos com grupos carbonil nas posições C-1 e C-3. Origina-se através de distintos mecanismos como a partir da decomposição de hidroperóxidos, da oxidação secundária de compostos carbonílicos e da degradação oxidativa de aminoácidos Fe-dependentes (ROSMINI et al., 1996; FERNANDEZ et al., 1997). É considerado o maior produto secundário da oxidação lipídica, e, como um aldeído bifuncional, é muito reativo, podendo interagir através de ligações cruzadas com DNA e proteínas, promovendo aberrações cromossômicas e redução da capacidade de síntese protéica, respectivamente (PEARSON et al, 1983; ADDIS, 1986).

Os lipídios em produtos cárneos oxidam-se facilmente, ocasionando o desenvolvimento de odor e sabor desagradáveis, conhecidos como “warmed-over-flavor” (CURI et al., 2002). A oxidação lipídica pode ser afetada pela dieta, pela presença de antioxidantes ou de pró-oxidantes (BUCKLEY citado por REY e LÓPEZ-BOTE, 2001). O Cu é considerado um elemento pró-oxidante, porém, nas células hepáticas o Cu não está presente na forma livre iônica e sim ligado a proteínas, que inativam sua ação pró-oxidante (LUZY e SPEISKY, 1996).

Do ponto de vista biológico, antioxidantes podem ser definidos como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALA, 1993). Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: a inibição da formação de radicais livres

que possibilitam a etapa de iniciação e a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990).

Algumas enzimas antioxidantes podem inibir a oxidação lipídica. A ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GR) está relacionada com redução e oxidação da glutathiona (GSH e GSSG). A GR age na regeneração de GSH a partir da GSSG (MURRAY et al., 1998). A GSH-Px, juntamente com a superóxido dismutase (SOD) e a catalase protegem as células contra os problemas causados pelos radicais livres (FLOHE citado por NUERNBERG et al., 1998). A SOD é uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos. A SOD possui um grande papel na regulação do metabolismo celular dependente do O_2 (JONES e SUTTLE, 1981). A falta de SOD e conseqüente aumento no O_2 extracelular associado com a deficiência de Cu pode, portanto, realçar os danos oxidativos, o suficiente para danificar a função normal da célula (SHARMA et al., 2005). Dessa forma, a vitamina E e enzimas antioxidantes assim como a SOD e a GSH-Px podem inibir a oxidação lipídica e aumentar a estabilidade de tecidos vivos e de alimentos como a carne (LAURIDSEN et al. 1999a). Entretanto, segundo esse mesmo autor, ainda não está claro como a atividade das enzimas antioxidantes no *postmortem* é afetada pela capacidade antioxidante total do músculo vivo. A atividade reduzida da SOD no fígado foi associada com a deficiência de Cu em ratos (PAYNTER et al., 1979; PROHASKA et al., 1983). Bozkaya et al. (2001), em estudo desenvolvido com eritrócitos de galinhas, verificaram que o grupo com deficiência de Cu teve redução da atividade da SOD. No trabalho de Ward e Spears (1997), a suplementação de Cu proporcionou aumento na atividade da SOD até o 56º dia da fase de crescimento de bovinos. Xin et al. (1991) verificaram o efeito da

suplementação de Cu sobre algumas enzimas, como SOD e GSH-Px, em bovinos da raça holandesa. Os animais foram suplementados com 20mg/kg de Cu (CuSO_4) ou com 10mg/kg de Mo na forma de molibdato de amônio (para desenvolver um grupo deficiente em Cu). A atividade da SOD nas células vermelhas do sangue e no sangue todo diminuiu no grupo Cu-deficiente. A atividade da GSH-Px não foi afetada pelo Cu. Senthilkumar et al. (2008), em experimento com cordeiros e suplementação 7 ou 14mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato ou proteinato de Cu, reportaram maior atividade da SOD no fígado ($p < 0,05$) de animais que receberam 14mg/kg de Cu na forma de CuSO_4 . Prohaska (1990) afirmou que a atividade da GSH-Px foi menor no fígado e plasma de ratos com deficiência de Cu. Segundo os autores, isso ocorreu devido a uma interação do Cu com o selênio. Sharma et al. (2005) conduziram um experimento para avaliar o efeito da suplementação de Cu sobre enzimas em novilhas. Foram utilizados 40 animais com deficiência em Cu, os quais foram divididos em 2 grupos denominados A e B. Para o grupo A foi fornecido uma mistura mineral contendo CuSO_4 e para o grupo B o Cu não foi fornecido. Foi observada melhora significativa na atividade da SOD nas células vermelhas, nas células brancas e no sangue todo a partir do 60º dia de tratamento para os animais do grupo A, enquanto para grupo B não houve diferença significativa nos 180 dias de experimento. Rey e Lopez-Bote (2001), com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação dietética de Cu e/ou vitamina E na composição e oxidação do músculo *L. Dorsi* em suínos, verificaram menor oxidação lipídica com a suplementação de vitamina E, enquanto a suplementação de Cu não afetou a susceptibilidade à oxidação lipídica. Lauridsen et al. (1999a) estudando o efeito da suplementação de Cu e vitamina E no status oxidativo do músculo de suínos, observaram tendência de aumento da atividade da SOD no músculo *Psoas maior*

dos animais que receberam 175mg/kg de Cu (5,7 U/mg de proteína), em comparação com aqueles que receberam 35mg/kg (5,23 U/mg proteína, $p=0,07$) ou que não foram suplementados com esse mineral (5,20 U/mg de proteína, $p=0,08$). No músculo *Longissimus dorsi*, o aumento da atividade da SOD com o aumento de Cu na dieta não foi estatisticamente significativo. Não houve influência dos tratamentos sobre a atividade da GSH-Px em ambos os músculos. Com relação à estabilidade oxidativa, amostras de músculo homogeneizadas foram incubadas com ferro para induzir a oxidação, a qual foi mensurada pelo teste de TBARS. No músculo *P. maior*, a adição de Cu na dieta inibiu a taxa de oxidação. O efeito foi significativo após 80 minutos de incubação ($p=0,02$), porém nenhuma diferença entre os níveis de Cu na dieta foram observados. A oxidação lipídica no músculo *L. dorsi* não foi influenciada pelas dietas com Cu. Lauridsen et al. (1999b) investigaram os efeitos da suplementação de diferentes níveis de Cu e vitamina E no status oxidativo e antioxidativo, em termos de sangue e fígado, em suínos em crescimento. Os autores avaliaram a concentração de antioxidantes (α -tocoferol, vitamina E, SOD, GSH-Px), pró-oxidantes (Cu), concentração de lipídeos, composição de ácidos graxos, TBARS, entre outros. Não foi encontrado efeito pró-oxidante do Cu. A suplementação com Cu aumentou a concentração de Cu e α -tocoferol no fígado. A concentração de gordura, a composição de ácidos graxos e a atividade da SOD e da GSH-Px no fígado não foram afetadas pelos tratamentos. Os tratamentos também não influenciaram a susceptibilidade do plasma para oxidação lipídica, medida pelo TBARS, entretanto, houve tendência à redução no nível de TBARS no plasma aos 0 min, em suínos alimentados com dietas contendo Cu. A progressão do TBARS no fígado foi reduzida pela adição de vitamina E e Cu, indicando um efeito antioxidativo de ambos os nutrientes. Dove e Ewan (1991) encontraram influência da

suplementação de vitamina E e Cu na atividade da GSH-Px no fígado. Cava et al. (1999), com o objetivo de estudar o efeito de α -tocoferol e CuSO_4 na susceptibilidade à oxidação da carne em suínos encontraram menores valores de TBARS para os grupos com suplementação de Cu e α -tocoferol, quando comparados com o controle.

2.4 Cobre e Metabolismo de Lipídeos

Estudos têm demonstrado que a suplementação de Cu para animais domésticos influencia o metabolismo dos lipídios. Segundo Lei (citado por ENGLE e SPEARS, 2001), a deficiência de Cu causa uma elevação do colesterol plasmático. Estudos recentes têm sido conduzidos no sentido de esclarecer o mecanismo pelo qual este aumento do colesterol sanguíneo ocorre.

O colesterol é um álcool de origem exclusivamente animal, fundamental para a viabilidade da vida. É precursor de sais biliares, hormônios esteróides e vitamina D, desempenhando importante função no metabolismo de cálcio e fósforo. Em ruminantes, a biossíntese de colesterol é destacada no intestino delgado e células adiposas (LIEPA citado por ENGLE e SPEARS, 2001). O colesterol é sintetizado a partir do acetil-CoA, onde três dessas moléculas são convertidas ao mevalonato, através da reação da via que é limitante da velocidade, sendo essa etapa catalisada pela enzima 3-hidroxi-3metil-glutaril-CoA (HMG-CoA). Seguem outras quatro etapas até a formação do colesterol, entretanto a regulação da sua síntese ocorre na etapa catalisada pela enzima HMG-CoA (MURRAY et al., 1998).

Segundo Klevay (1973), ratos alimentados com dietas deficientes em Cu apresentaram hipercolesterolemia. Kim et al. (1992) afirmaram que o Cu hepático regula indiretamente a biossíntese do colesterol pelo decréscimo da forma reduzida

da glutathiona (GSH) e aumento da forma oxidada (GSSG). A GSH atuaria estimulando a produção da HMG-CoA, envolvida na síntese orgânica do colesterol. O decréscimo da GSH intracelular ocorre através da proteção das células hepáticas dos efeitos tóxicos dos radicais livres, provenientes da alta concentração de cobre. O cobre entra nas células do fígado sendo rapidamente transferido à metalotioneína (FREEDMAN citado por ENGLE et al. 2000b). Esse decréscimo também pode ocorrer em função da atividade da GSH-Px que reduz a GSH a GSSG. O aumento da concentração da GSSG tem mostrado relação indireta com a atividade da enzima HMG-CoA (GILBERT citado por ENGLE e SPERS, 2001). Se a suplementação com Cu diminui a concentração celular da GSH, então diminui a síntese de colesterol (BAKALLI et al. 1995).

Kim et al. (1992) verificaram, em ratos, que a deficiência de cobre causa hipercolesteromia pelo aumento hepático de GSH com aumento da atividade da HMG-CoA redutase. Os autores sugeriram que pela inibição da GSH por um inibidor específico ("BSO"), deveria haver redução da atividade da enzima HMG-CoA redutase, diminuindo a síntese de colesterol. Foram feitos dois experimentos, onde os animais foram divididos em dois grupos, um com deficiência em cobre (Cu-D) e outro com níveis adequados desse mineral (Cu-A). Os resultados foram semelhantes em ambos os experimentos. No 35º dia, o colesterol plasmático aumentou de 30 para 43% nos grupos Cu-D. Em seguida, 10 animais de cada grupo receberam juntamente com a água, 10mg de "BSO", por 2 semanas. Nos grupos Cu-D + "BSO" houve redução de GSH hepático, da atividade HMG-CoA redutase e do colesterol plasmático em comparação com os animais Cu-D que não receberam "BSO". No trabalho de Alarcon-Corredor et al. (2000) ratos suplementados com Cu tiveram

diminuição dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos e aumento dos níveis de fosfolipídeos e ácidos graxos não esterificados.

Bakalli et al. (1995) submeteram frangos de corte a suplementação de 250mg de Cu/kg de MS e observaram redução de 11,8% na colesterolemia e de aproximadamente 25% nos níveis de colesterol do tecido muscular comestível. Segundo Pesti e Bakalli (1996) a adição de 125 ou 250mg de Cu/kg de MS diminuiu o colesterol plasmático e o do músculo peitoral em frangos de corte. A elevada concentração de Cu no fígado em função da suplementação desse mineral pode diminuir os níveis séricos e musculares de colesterol. Skrivan et al. (2002) suplementando frangos com 0, 13, 35 ou 126mg/kg de Cu na forma de CuSO_4 observaram que a redução dos lipídios e também do colesterol muscular foi o principal efeito de tal suplementação. Pearce et al. (1983) observaram que o Cu, quando adicionado em níveis elevados na dieta reduzia as concentrações dos lipídios no sangue e no fígado de frangos. Jackson et al. (1979) relataram diminuição linear nos níveis de gordura hepática de galinhas submetidas a níveis crescentes de Cu. Balevi e Coskun (2004) em experimento desenvolvido com poedeiras afirmaram que a suplementação de Cu diminui a concentração de colesterol da gema, sem afetar o desempenho produtivo das aves. Armstrong et al. (2001) suplementando suínos com diferentes níveis e fontes de Cu observaram que 100mg/kg de Cu na forma de citrato cúprico diminuiu os níveis de colesterol séricos no 42º dia da fase de terminação. Rey et al. (2004) suplementaram suínos com cobre e/ou vitamina E, em confinamento, e não encontraram alterações na concentração de colesterol no músculo, entretanto a relação colesterol:fosfolipídeos foi maior nos suínos suplementados com Cu. Quando em concentrações superiores a 250mg de Cu/kg de MS, a suplementação com Cu pode alterar o perfil lipídico em suínos, com

aumento dos ácidos graxos insaturados em detrimento dos saturados (AMER e ELLIOT citados por ARMSTRONG et al., 2001).

Alguns experimentos sugeriram que a suplementação de cobre pode afetar o metabolismo de lipídios em ruminantes (ENGLE et al., 2000a; ENGLE et al., 2000b; ENGLE e SPEARS, 2000b; ENGLE e SPEARS, 2001). O mecanismo pelo qual o Cu afeta o perfil de ácidos graxos não está claro, mas inclui efeitos na desnaturação, esterificação e mobilização de triglicerídeos. O Cu pode reduzir a síntese de colesterol no intestino delgado por um mecanismo similar ao que ocorre no fígado de não ruminantes, resultando em diminuição de colesterol sérico e muscular (ENGLE e SPEARS, 2001).

Engle et al. (2000a) conduziram experimento para determinar o efeito de diferentes níveis de Cu no metabolismo de lipídeos e colesterol em bovinos da raça Angus e Angus-Hereford em crescimento e terminação. Durante a fase de crescimento o desempenho dos animais não foi afetado pela suplementação de Cu, entretanto na fase de terminação a suplementação com Cu reduziu o ganho, o consumo e a eficiência alimentar. O colesterol sérico não foi afetado durante a fase de crescimento (56 dias iniciais). Durante a fase de terminação, o colesterol sérico não foi afetado até o 56º dia, entretanto, diminuiu nos bovinos suplementados com cobre nos dias 84, 96 e 116, em relação ao grupo controle. A concentração de colesterol no músculo *Longissimus dorsi* tendeu a se reduzir ($p < 0,11$) com a suplementação de Cu. Os ácidos graxos insaturados (C18:2 e C18:3) nesse músculo aumentaram e os saturados tenderam a diminuir. A concentração de Cu no músculo, o percentual de lipídeos no músculo e fígado e a gordura de marmoreio não foram afetados pelos tratamentos.

Engle e Spears (2000b) avaliaram bovinos da raça Angus em tratamentos sem a suplementação, com 10mg de Cu/kg de MS e 20mg de Cu/kg de MS, sendo a fonte o CuSO_4 . No 86º e 92º foram coletadas amostras de líquido ruminal. Não houve diferença no pH e também nos ácidos graxos voláteis no rúmen entre os tratamentos. A suplementação com Cu aumentou ($p<0,05$) a concentração de Cu no fígado e os novilhos suplementados com 20mg/kg de Cu tiveram maior concentração de Cu no fígado que os demais. As concentrações de Cu e lipídeos no músculo não foram afetadas, entretanto, o teor de colesterol diminuiu com a suplementação. Houve um aumento significativo nos ácidos graxos insaturados e uma tendência de diminuição dos saturados. A concentração de colesterol sérico diminuiu nos animais suplementados com Cu a partir do 56º dia. Esses resultados indicam que a adição de 10 ou 20mg de Cu/kg de MS à dietas de alto concentrado, contendo 4,9mg de Cu/kg de MS, altera o metabolismo de lipídeos e colesterol em novilhos, mas não altera a fermentação ruminal. O desempenho dos animais não foi afetado pela suplementação com Cu, em contraste com o experimento de Engle et al. (2000a) o qual encontrou redução de desempenho com a suplementação desse mineral. A diferença desses dois experimentos pode estar na duração da suplementação com Cu. Engle et al. (2000a) adicionaram o mineral na dieta na fase de crescimento e também na de terminação, enquanto Engle e Spears (2000b) suplementaram cobre apenas na fase de terminação.

Engle et al. (2000b), objetivando avaliar os efeitos da suplementação de Cu no metabolismo de lipídeos e catecolaminas encontraram que a concentração sérica de colesterol diminuiu com a suplementação de 10 ou 40mg de Cu/kg de MS. Os ácidos graxos não esterificados no soro também diminuíram com a suplementação.

A deposição de gordura decresceu e o percentual de ácidos graxos poliinsaturados aumentou com a suplementação de Cu ($p < 0,10$).

Engle e Spears (2001) conduziram um experimento a fim de avaliar os efeitos de níveis de Cu (0, 10 ou 40mg/kg de MS) na forma de CuSO_4 , sobre o desempenho, características de carcaça e metabolismo de lipídeos em bovinos Simental em crescimento e terminação. Não foram encontradas alterações no colesterol plasmático e muscular com a suplementação de Cu, indicando que em bovinos da raça Simental não há efeito no metabolismo de colesterol. É interessante destacar que os bovinos dessa raça são os mais sensíveis à deficiência de cobre.

Engle e Spears (2004), com o objetivo de avaliar os efeitos do sistema de terminação (pasto ou confinamento) e da suplementação de Cu em novilhos Angus sobre a composição lipídica do músculo, concluíram que os novilhos recebendo a suplementação de Cu tiveram maior concentração de ácido linoléico conjugado, C18:1 trans e C17:0 no músculo *Longissimus dorsi*. Esses resultados indicaram que a suplementação de Cu altera a composição de ácidos graxos do músculo.

Johnson e Engle (2003) avaliando o efeito da fonte de Cu sobre o metabolismo de lipídeos e colesterol, em novilhos Angus, encontraram tendência de menor deposição de gordura nos animais suplementados com Cu em relação ao controle ($p = 0,07$). Os autores concluíram que a suplementação de Cu tem pouco efeito sobre o perfil de lipídeos no sangue e tecidos, mas pareceu ter efeito direto no tecido adiposo propriamente dito. Os autores trabalharam com nível máximo de 20 mg/kg de Cu.

2.5 Cobre e Fermentação Ruminal

Ácidos graxos de cadeia curta são os principais produtos finais da fermentação microbiana do complexo estomacal dos ruminantes. Os ácidos graxos voláteis (AGV), predominantes na forma de ácido acético, propiônico e butírico, fornecem cerca de 50-80% da energia digestível total. Metade do ácido propiônico absorvido tem destino gliconeogênico, sendo convertido em glicose. O ácido butírico quase integralmente é convertido a corpos cetônicos no epitélio ruminal. Aproximadamente 2/3 do ácido acético produzido é absorvido e subsequente oxidado, o restante é usado em processos metabólicos, como a lipogênese (FRANCE et al., 1991).

A relação entre a suplementação de cobre e a fermentação ruminal ainda é pouco estudada, entretanto é de fundamental importância uma vez que o metabolismo de lipídios é influenciado diretamente pela fermentação ruminal. O Cu tem alto potencial de redução, e no rúmen pode reduzir alguns equivalentes de redução na forma de NADPH e NADH, interferindo na biohidrogenação microbiana de ácidos graxos insaturados (ENGLE et al., 2000b). Engle et al. (2000c) estudaram o efeito da suplementação de Cu e óleo de soja na biohidrogenação ruminal e encontraram interação entre a suplementação de Cu e de óleo de soja. Os autores encontraram diminuição de biohidrogenação ruminal quando apenas o Cu foi oferecido, e aumento de biohidrogenação quando o Cu e óleo de soja foram oferecidos conjuntamente.

Forsberg (citados por ENGLE et al., 2000a), em estudo in vitro encontraram diminuição do crescimento microbiano e queda fermentativa com a concentração de 21 µg/ml de Cu no rúmen. No trabalho de Engle et al. (2000a), durante a fase de crescimento o desempenho dos animais não foi afetado pela suplementação de Cu,

entretanto na fase de terminação a suplementação com esse mineral reduziu o ganho em 19%, o consumo em 6,3% e ganho:consumo em 14%. Segundo os autores isso pode ter ocorrido em função da alta concentração de Cu no rúmen ter prejudicado a fermentação ruminal. Dessa forma, a possível relação entre suplementação com altos níveis de Cu e o desempenho animal, também justificam a realização de experimentos estudando a suplementação desse mineral, o metabolismo lipídico, a fermentação ruminal e o desempenho animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Período

O experimento foi conduzido nas dependências da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, no Campus de Pirassununga-SP, por um período de 84 dias.

3.2 Animais

Foram utilizados 35 bovinos da raça Nelore, inteiros, com aproximadamente 2,5 anos, peso médio de 480kg, em fase de terminação. Os animais foram alocados em baias individuais com cocho e bebedouro automático (Figura 1).

Figura 1. Baias individuais.

3.3 Tratamentos

Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de adaptação ao confinamento (30 dias), durante o qual receberam dieta contendo 50mg/kg de Mo com a finalidade de reduzir o status de Cu dos mesmos. Após esse período foi feita biópsia do fígado (Figura 2) de cada um e realizadas as respectivas análises de Cu. As amostras de fígado foram colhidas conforme a técnica descrita por Chapman et al. (1983).

Figura 2. Biópsia de fígado.

Em seguida, os 35 bovinos foram divididos em 5 grupos, totalizando 7 animais por tratamento, conforme descrição:

Tratamento 1 (C): Dieta basal sem a suplementação adicional de cobre.

Tratamento 2 (I10): Dieta basal com suplementação de 10mg de Cu/kg de MS, na forma de sulfato de cobre.

Tratamento 3 (I40): Dieta basal com suplementação de 40mg de Cu/kg de MS, na forma de sulfato de cobre.

Tratamento 4 (O10): Dieta basal com suplementação de 10mg de Cu/kg de MS, na forma de proteinato de cobre.

Tratamento 5 (O40): Dieta basal com suplementação de 40mg de Cu/kg de MS, na forma de proteinato de cobre.

Os animais receberam dieta contendo 30% de volumoso e 70% de concentrado. O programa Cornell Net Carbohydrate and Protein System-CNCPS foi utilizado para ajuste das dietas previamente formuladas de acordo com as exigências do NRC (1996), para todos os nutrientes, exceto o cobre. A Tabela 1 apresenta a composição percentual e bromatológica da dieta basal usada no experimento.

Tabela 1. Composição percentual e análise bromatológica da dieta basal, em base seca.

Ingredientes	%
Silagem de milho	30,00
Milho grão	27,68
Refinazil	36,50
Soja extrusada	4,198
Calcário	0,700
Uréia	0,200
Sal mineral*	0,700
Rumensin	0,022
Composição centesimal	%
Proteína Bruta	16,66
Extrato etéreo	4,61
FDN	29,18
FDA	15,41
CNF**	44,90

A dieta basal continha 7mg de Cu/kg de MS.

*Composição: NaCl, NaHCO₃, fubá, minerais (cobalto e iodo)

**CNF = 100 - (FDN+MM+EE+PB)

3.4 Procedimento experimental

Diariamente foram colhidas as sobras da alimentação e determinada a MS das mesmas, para que semanalmente fosse ajustada a quantidade de alimento fornecida.

Foram feitas 4 colheitas de sangue (Figura 3) para posteriores análises de colesterol total, triglicérides, ceruloplasmina e cobre. As colheitas foram feitas nos dias 0, 28, 56 e 84. As pesagens dos animais (Figura 4) também foram feitas em intervalo de 28 dias, após jejum completo de 18 horas.

Figura 3. Colheita de sangue.

Figura 4. Pesagem dos animais.

Nesse mesmo intervalo de tempo, foi utilizado um equipamento de ultrassom Piemedical Scanner 200 Vet, com transdutor linear de 18 cm e 3,5 MHz, para obter a área de olho de lombo (AOLU), espessura de gordura subcutânea (EGSU) entre a 12^a e a 13^a costelas e a espessura de gordura na picanha (EGPU), sob o terço superior do músculo *Bíceps femoris* (Figura 5).

Figura 5. Ultrassonografia

Ao final do experimento, os bovinos foram abatidos no Matadouro-Escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS). Após o período de jejum, de 16 horas, os animais foram insensibilizados com concussão cerebral e abatidos por sangria na veia jugular em posição vertical, seguida de esfola, evisceração (Figura 6), inspeção, serragem das carcaças ao meio, toailete e pesagem da carcaça quente.

Figura 6. Abate dos animais por sangria na veia jugular e evisceração.

No momento do abate foram colhidas amostras de líquido ruminal, para posteriores análises de AGV e nitrogênio amoniacal (N-NH_3). O pH foi mensurado (Figura 7) no momento da colheita. Também foram obtidas amostras de fígado de cada animal (Figura 8), e armazenadas em nitrogênio líquido, para posteriores análises de TBARS, GSH-Px, GSH/GSSG, SOD e Cu.

Figura 7. Mensuração do pH do líquido ruminal.

Figura 8. Colheita de fígado.

Após o toalete, as carcaças foram mantidas em câmara frigorífica a 0°C, até o término do *rigor-mortis*. Uma hora e vinte quatro horas após o abate, o pH foi determinado no músculo *L. dorsi* da meia carcaça esquerda na altura da 12^o costela, por meio de pHmetro digital (Figura 9). Após 24 horas de resfriamento, as carcaças foram pesadas e as meias carcaças esquerdas, serradas entre a 12^a e a 13^a costelas para obtenção da espessura de gordura (EGSC) e da área de olho de lombo (AOLC), com o auxílio de uma régua quadriculada (grid) com escala em cm² (Figura 10).

Figura 9. Mensuração do pH da carcaça.

Figura 10. Mensuração da AOLC no músculo L. Dorsi.

Durante a desossa, foram colhidos do músculo *L. dorsi* da meia carcaça esquerda, bifes de 2,5 cm de espessura, à partir da 13ª costela em direção cranial. No momento da colheita, foi avaliada a coloração na face exposta do músculo *L. dorsi* após exposição ao ar. De um dos bifes foram retiradas amostras de 5g (em triplicata) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (Figura 11), para posterior avaliação do colesterol, ácidos graxos, TBARS (dia 0) e Cu. Os bifes destinados às análises de Display Life (DL) e atmosfera modificada (ATM) foram acondicionados em bandejas de poliestireno expandido sobre absorvedor de purga, as quais foram envoltas com filme de policloreto de vinila (PVC). As bandejas destinadas às análises de DL (Figura 12) foram dispostas em balcão expositor refrigerado (modelo veja 125 LX, marca Auden) a 4°C onde permaneceram por até três dias. Em cada dia, as sete bandejas de cada tratamento foram retiradas do balcão expositor refrigerado, sendo avaliada a coloração na superfície dos bifes. Amostras de 5g (em triplicata) foram colhidas congeladas em nitrogênio líquido para posteriores análises de TBARS (DL: dias 1, 2 e 3).

Figura 11. Amostras congeladas em nitrogênio líquido.

As bandejas destinadas às análises de ATM (Figura 12) foram acondicionadas em embalagens de transporte tipo masterpacks - MP (78.5 cm x 48.5 cm. 0.35m²; Cryovac), num total de 5 bandejas por embalagem, com composição gasosa de 75% O₂:25% CO₂. A composição da atmosfera no interior do MP foi verificada utilizando um analisador de gases Dansensor (CheckPoint O₂/CO₂). Não houve variação significativa da mistura durante o armazenamento. Os MPs foram armazenados em câmara refrigerada (2.0±1.0°C) por nove dias. No terceiro, sexto e nono dias, sete MPs contendo as sete bandejas de cada tratamento foram retiradas da câmara refrigerada. Foi avaliada a coloração na superfície dos bifes e foram colhidas amostras de 5g (em triplicata) que foram armazenadas em nitrogênio líquido para posteriores análises de TBARS (ATM: dias 3, 6 e 9).

Os bifes destinados às análises de maturação foram embalados a vácuo (VC) (Figura 12) e armazenados em câmara refrigerada (2.0±1.0°C) por 14 dias. No sétimo e décimo quarto dias, amostras de 5g de carne (em triplicata) foram retiradas e também armazenadas em nitrogênio líquido para posteriores análises de TBARS (VC: dias 7 e 14).

Figura 12. Amostras de carne acondicionadas em Display Life (DL), em atmosfera modificada (ATM) e embaladas a vácuo (VC).

3.5 Procedimento Analítico

As determinações de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente ácido das rações obedeceram às recomendações da AOAC (1996).

A atividade da ceruloplasmina no soro foi determinada pelo método de Schosinsky et al. (1974), usando *o-Dianisidine dihydrochloride* como substrato. Esse reagente é convertido em um produto amarelado na presença de ceruloplasmina e oxigênio. Após adição de ácido sulfúrico, essa reação enzimática pára, havendo formação de uma solução rosada estável, cuja absorbância foi lida a 540nm.

O cobre no soro, fígado e músculo foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica. Para a análise dos tecidos colhidos (fígado e músculo), estes foram descongelados, tiveram um fragmento separado, retirado sempre da mesma região do órgão, lavado em água destilada deionizada, seco em papel absorvente descartável e pesado em balança de precisão. Essas determinações foram feitas no laboratório de Minerais do Departamento de Zootecnia da FZEA-USP.

As concentrações de triglicérides e colesterol no plasma foram determinadas por método enzimático através de kits da marca LABORLAB. As análises de colesterol no músculo foram feitas pelo método enzimático segundo Saldanha et al. (2004). As amostras de músculo foram previamente trituradas e pesadas em 2g. Após homogeneização com KOH (50%) e álcool etílico em e banho maria, foi acrescentada água destilada e em seguida foi usado o hexano para separação das fases. Essa extração foi repetida mais duas vezes e 3 ml do extrato hexânico foi transferido para um tubo de vidro, sendo realizada então a secagem sob N₂ (Figura 13). Os próximos passos foram adição de isopropanol, reagente enzimático, banho maria e leitura da absorbância.

Figura 13. Homogeneização em homogenizador tipo “Potter”, separação da fase hexânica e secagem sob N^2 .

A composição de ácidos graxos do músculo *L. dorsi* foi determinada através de cromatografia gasosa de alta resolução conforme metodologia descrita por Perez et al. (2002) e realizada no laboratório de Nutrição e Crescimento Animal do Departamento de Produção Animal da ESALQ-USP.

A extensão da estabilidade lipídica da carne foi avaliada através do teste TBARS (substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico) (Figura 14), segundo Buege e Aust (1978). A coloração na superfície da carne foi analisada por meio de colorímetro (MiniScan XE model, Hunterlab), usando a escala CIELab (L^* , a^* , b^*).

Figura 14. Análise de TBARS: homogeneização, centrifugação, banho a 90°C e leitura da absorbância em espectrofotômetro.

A atividade da superóxido dismutase no fígado foi determinada segundo Beauchamp e Fridovich (1971). Neste método, após homogeneização do tecido em tampão fosfato (10mM, pH 7,4), a atividade máxima da SOD foi determinada de acordo com a taxa de redução do *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) pelo ânion superóxido a 25°C, acompanhada por 3 minutos espectrofotometricamente a 550nm. O sistema xantina-xantina oxidase é usado como fonte de ânion superóxido. A SOD presente na amostra compete pelo ânion superóxido, inibindo a taxa de redução do NBT. O meio de ensaio continha tampão fosfato de Na e K (53mmol.L⁻¹, pH 7,8), NBT (0,1mmol.L⁻¹), xantina (0,05mmol.L⁻¹), EDTA (0,1mmol.L⁻¹) e xantina oxidase.

A atividade da glutathione peroxidase no fígado foi determinada segundo Paglia e Valentine (1987). Neste método, após homogeneização do tecido em

tampão fosfato (10mM, pH 7,4), a atividade máxima da GSH-Px foi avaliada através do decréscimo da concentração de NADPH a 340nm e 37°C, acompanhada por 3 minutos espectrofotometricamente (Figura 15). O meio de ensaio continha tampão fosfato potássio (100mmol.L⁻¹, pH 7,0), EDTA (3,0mmol.L⁻¹), GR (1 UI), NADPH (0,1mmol.L⁻¹), GSH (2,0mmol.L⁻¹), azida de sódio (1mmol.L⁻¹) e cumeno hidroperóxido (1,3mmol.L⁻¹), que é o responsável pelo início da reação.

Figura 15. Homogeneização do fígado em tampão fosfato, adição do NADPH e leitura em espectrofotômetro a 340nm por 3 minutos.

As determinações de GSH e GSSG no fígado, e conseqüente relação GSH/GSSG, foram feitas segundo Tietze (1969). A glutathiona total foi mensurada, após homogeneização do tecido em ácido sulfossalicílico 5%, pelo método de reciclagem na presença de ácido ditionitrobenzóico (DTNB), NADPH e GR. A formação do ácido tionitrobenzóico (TNB), que é um produto colorido absorvido a 412nm, é proporcional á quantidade de GSH (e GSSG) das amostras e foi monitorada espectrofotometricamente por 3 minutos. O GSSG foi determinado pela derivação direta do GSH ao homogenizar outra amostra do mesmo tecido na presença de N-etilmaleimida (NEM 12,5nM), seguida por hidrólise alcalina.

Para as determinações quantitativas e qualitativas dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGCC), as amostras sofreram centrifugação a 15.000 g (4° C), durante 50 minutos, sendo analisadas de acordo com Campos et al. (2004) em cromatógrafo líquido-gasoso (Hewlett Packard 5890 Series II GC), equipado com integrador (Hewlett Packard 3396 Series II Integrator) e injetor automático (Hewlett Packard 6890 Series Injector). O padrão interno utilizado foi o ácido 2-metilbutírico sendo acrescentado, em cada tubo, para leitura em cromatógrafo, 100µl do padrão, 800µl da amostra e 200µl de ácido fórmico. Uma mistura de AGV com concentração conhecida foi utilizada como padrão externo para a calibração do integrador.

A determinação do N-NH₃ foi realizada por espectrofotômetro, utilizando-se filtro para absorvância de 550nm. A amônia reage com as soluções de hipoclorito e fenol na presença de um catalisador (nitroprussiato dihidratado), formando indofenol (cor azul – Reação de Berthelot), sendo a concentração de amônia diretamente proporcional a absorvância de indofenol.

3.6 Delineamento experimental

O delineamento estatístico foi do tipo inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento. Para parâmetros ruminais, pH do músculo, AOLC, EGSC, colesterol, ácidos graxos, enzimas e cobre no músculo e/ou fígado, os respectivos dados foram analisados pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., 1996) através de análise de variância por meio do PROC GLM. Para os parâmetros séricos, que foram analisados a cada 28 dias, para AOLU, EGSU, EGPU e para TBARS no tempo, foi utilizado o PROC MIXED do SAS. As médias foram comparadas por meio de contrastes. Foi adotado um nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 “Status” de cobre

As concentrações médias de cobre no músculo e no fígado, e do acúmulo de Cu no fígado (diferença da concentração de Cu obtida no abate e na biópsia) de bovinos durante o confinamento experimental, estão apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 16, 17 e 18.

Tabela 2. Concentrações médias de cobre (base seca), em mg/kg de músculo, fígado, e acúmulo de Cu no fígado de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis (mg/kg)	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
Cu músculo	4,45 ^a	4,24 ^a	4,82 ^a	4,21 ^a	5,79 ^a	1,05	0,79	0,66	0,70	0,29
Cu fígado	237,3 ^d	435,7 ^c	607,5 ^b	466,6 ^c	765,4 ^a	48,71	<0,01	0,06	0,01	<0,01
Acúm.Cu fígado	-124,2 ^c	213,6 ^b	295,1 ^b	206,1 ^b	489,3 ^a	48,28	<0,01	0,06	0,24	<0,01

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Figura 16. Concentrações médias de cobre em mg/kg de fígado (base seca) e erros padrões, de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Figura 17. Concentrações médias de cobre em mg/kg de fígado (base seca) de bovinos recebendo dieta controle ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Figura 18. Acúmulo de cobre no fígado (base seca) e erros padrões, em mg/kg, de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Não houve efeito da suplementação de cobre ($p>0,05$) sobre a concentração de Cu no músculo. Do mesmo modo, Engle et al. (2000a) e Engle e Spears (2000b) suplementaram Bovinos Angus com diferentes níveis de Cu e a concentração desse mineral no músculo não foi afetada pelos tratamentos.

Os animais que receberam 40mg/kg de Cu na forma orgânica (O40) apresentaram maior concentração de Cu no fígado e os que receberam a dieta controle, menor concentração ($p<0,05$), em comparação com os que receberam os demais tratamentos. O tratamento I40 (40mg/kg de Cu na forma inorgânica) proporcionou maior concentração de Cu no fígado dos bovinos em comparação com os tratamentos de 10mg/kg de Cu nas formas orgânica e inorgânica (I10 e O10), os quais não diferiram entre si ($p>0,05$). Foi observado aumento linear da concentração de Cu no fígado, para ambas as fontes, conforme houve aumento dos níveis suplementares.

Com relação ao acúmulo de cobre no fígado, ou seja, considerando a diferença da concentração de Cu obtida no abate e na biópsia, o tratamento O40 proporcionou maior acúmulo de Cu no fígado dos bovinos ($p < 0,05$), quando comparados com o restante dos tratamentos. Os tratamentos I10, I40 e O10 não diferiram entre si ($p > 0,05$). No caso do tratamento controle, os animais tiveram queda no acúmulo de Cu provavelmente pelo fato de ser um controle negativo, ou seja, a quantidade de Cu presente na dieta (7mg/kg) foi menor que a exigência desse mineral para bovinos (10mg/kg), segundo o NRC (1996). Além disso, o Mo que foi fornecido no período de depleção, provavelmente continuou agindo no organismo, mobilizando Cu do fígado e tornando-o indisponível, com conseqüente aumento de Cu insolúvel plasmático (LANGLANDS et al., 1981)

Em geral, a concentração de cobre hepático aumentou nos animais suplementados com diferentes fontes e níveis desse mineral. Cerca de 40 a 70% do Cu absorvido é estocado no fígado, de onde é liberado quando há redução de consumo (CORAH e IVES, 1991). Nos ruminantes, o fígado é particularmente sensível às mudanças no status de Cu (UNDERWOOD, 1977) e por ser o órgão central do metabolismo desse mineral, sua concentração reflete o nível de Cu que está sendo ingerido pelo organismo (McDOWELL, 1992). Isso explica os valores encontrados para os tratamentos com suplementação de Cu. A análise de amostras de fígado é confiável para avaliar o status de Cu no animal (TOKARNIA et al., 1999).

Xin et al. (1991), suplementando bovinos da raça holandesa com 20mg/kg de Cu (CuSO_4) ou 10mg/kg de Mo na forma de molibdato de amônio, para desenvolver um grupo deficiente em Cu, verificaram queda na concentração de Cu no fígado para o grupo Cu-deficiente em comparação com o grupo suplementado. Xin et al. (1993) em experimento com vacas em gestação, observaram declínio constante do

nível de Cu no fígado durante um período de oito semanas antes do parto, quando estas foram alimentadas com 5mg/kg de Cu. Entretanto, a suplementação com 10mg/kg preveniu esse declínio. Sharma et al. (2005), trabalhando com novilhas suplementadas ou não com Cu na forma de CuSO_4 observaram aumento no nível de Cu no fígado, aos 30 dias, para o grupo suplementado, enquanto que no grupo não suplementado, a concentração de Cu no fígado foi deficiente ($p < 0,01$) aos 60 dias de experimento. Ward e Spears (1997) relataram que os bovinos que receberam Cu injetável antes da desmama e que foram suplementados com esse mineral na fase pós desmama tiveram maior concentração de Cu no fígado em comparação com o grupo controle. Engle e Spears (2000b) avaliaram bovinos da raça Angus em tratamentos sem suplementação e com 10 ou 20mg de Cu/kg de MS. A suplementação com Cu aumentou ($p < 0,05$) a concentração desse mineral no fígado, sendo que os novilhos suplementados com 20mg/kg tiveram a maior concentração.

As concentrações médias de cobre no fígado dos animais suplementados (435,7 a 765,4mg/kg) estão acima dos valores considerados normais para bovinos, de 100 a 400mg/kg de fígado, segundo McDowell (1992), porém nenhum animal apresentou intoxicação, uma vez que os fígados e rins estavam normais quanto à anatomia e peso.

A biodisponibilidade de um mineral, ou seja, a proporção do elemento presente no alimento que é absorvida pelo animal e utilizada nas suas funções biológicas (UNDERWOOD, 1977), depende de vários fatores, incluindo níveis do elemento ingerido, idade e estado nutricional do animal, condições ambientais, pH intestinal, presença de antagonistas e, principalmente, da fonte mineral.

No trabalho de Engle e Spears (2000a), os bovinos suplementados com proteinato de Cu tenderam a ter maior concentração desse mineral no fígado do que

aqueles suplementados com igual quantidade de CuSO_4 , como no presente experimento. Isso sugere que o proteinato de Cu pode ser mais biodisponível do que o CuSO_4 em bovinos alimentados com dieta de alto concentrado. Muehlenbein et al. (2001) ofereceram dietas com Cu na forma orgânica e inorgânica para vacas, antes e depois do nascimento da cria, em dois experimentos, e verificaram que 10 dias após o nascimento, as vacas que receberam a dieta controle (sem suplementação) tiveram diminuição ($p < 0,05$) da concentração de Cu no fígado, e as que foram suplementadas tiveram aumento dessa concentração ($p < 0,05$) em ambos experimentos. Os autores sugeriram que a diminuição da concentração de Cu nas vacas controle resultou da baixa concentração de Cu no feno e da adição de Fe e Mo na alimentação (antagonistas na absorção de Cu). Apgar et al. (1995), observaram aumento na deposição de Cu nos fígados de suínos alimentados com 200mg/kg de Cu-lisina, comparado com os fígados dos suínos que receberam CuSO_4 , sugerindo que talvez a fonte orgânica seja metabolizada de forma diferente da inorgânica. Aoyagi e Baker (1994) sugeriram que o Cu das fontes orgânicas pode ser absorvido de forma diferente e pode ser menos afetado por outros componentes da dieta do que o Cu inorgânico.

Os valores referentes às concentrações médias de cobre no soro e a atividade da ceruloplasmina em função dos tratamentos e do tempo, durante o confinamento experimental, estão apresentados na Tabela 3. Na Figura 19 pode ser verificado o efeito dos diferentes níveis e fontes de Cu sobre a atividade da ceruloplasmina no soro.

Tabela 3. Concentrações médias de cobre (mg/l) e atividade da ceruloplasmina (U/l), no soro de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante o confinamento experimental.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
Cu soro (mg/l)	0,873 ^a	0,885 ^a	0,967 ^a	0,896 ^a	0,901 ^a	0,03	0,48	0,17	0,12	0,53
Ceruloplasmina (U/l)	10,83 ^b	11,56 ^b	14,26 ^a	11,56 ^b	12,25 ^b	0,54	0,28	0,02	<0,01	0,07
	Tempo (Dias)				Efeito de Tempo					
	0	28	56	84						
Cu soro (mg/l)	1,11±0,03	1,21±0,04	0,67±0,02	0,63±0,01	Q = 0,03					
Ceruloplasmina (U/l)	11,85±0,25	-	-	12,33±0,29	p = 0,06					

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes;

Q = efeito quadrático;

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) nas concentrações de cobre no soro com a suplementação de diferentes fontes e níveis de Cu. Houve efeito quadrático para esta variável com relação ao tempo ($y = 1,1552 - 0,00837x + 0,000024x^2$). As concentrações séricas de Cu no dia 0 e aos 28 dias após o início do período experimental foram superiores aos valores obtidos com 56 e 84 dias de experimento. Em geral, os valores obtidos no presente trabalho estão dentro da concentração normal de Cu no sangue para bovinos, que varia de 0,6 a 1,1mg/l segundo Minson (1990).

Alguns autores encontraram resultados semelhantes aos do presente experimento. Ward et al. (1993) não observaram diferença na concentração de Cu no soro de bovinos suplementados por 21 dias com CuSO_4 ou Cu-lisina. No trabalho

de Muehlenbein et al. (2001), com suplementação de Cu na forma orgânica e inorgânica para vacas, não houve diferença entre os tratamentos para a concentração desse mineral no soro. Salyer et al. (2004) também não encontraram efeito significativo para concentração de Cu no soro de novilhas suplementadas com Cu na forma orgânica ou inorgânica. Segundo Underwood (1981), a concentração sérica de Cu não é considerada um indicador preciso do status desse mineral no organismo a não ser que a deficiência seja severa.

No trabalho de Xin et al. (1991), com bovinos holandeses e suplementação de 20mg/kg de Cu (CuSO_4) ou 10mg/kg de Mo (molibdato de amônio) para desenvolver um grupo Cu-deficiente, a concentração de Cu no plasma não sofreu alteração durante o experimento no grupo suplementado com Cu. No grupo deficiente, a concentração de Cu no plasma aumentou durante os 3 primeiros meses, em seguida declinou e permaneceu sem alteração nos últimos 5 meses do experimento. Pott et al. (1999), avaliando o uso de dietas com alta concentração de Mo no metabolismo de ovinos, observaram que o aumento do Mo da dieta incrementou o nível sérico total de Cu, concordando com os resultados obtidos.

Os efeitos adversos de aumentar o Mo e o S dietéticos sobre a utilização de Cu pelos ruminantes têm sido atribuídos à formação de tiomolibdatos (TM) no ambiente ruminal rico em sulfeto, com efeitos sistêmicos que envolvem principalmente a inibição do metabolismo do Cu (MILTIMORE e MASON, 1971). Os TM ligam-se ao Cu, no rúmen, para formar cuprotiomolibdatos (Cu-TM) que são insolúveis e indisponíveis para absorção (MASON, 1990). Os excessos de TMs, quando absorvidos, passam ao sangue, elevando o Cu plasmático. No sangue, o Mo que está ligado à proteína remove Cu do fígado (KINCAID e WHITE, 1988). No início

do experimento o Cu sérico em todos os animais estava elevado possivelmente em virtude do Mo que foi fornecido no período de depleção.

Com relação á ceruloplasmina, o tratamento I40 (40mg de Cu/kg de MS na forma inorgânica), proporcionou maior atividade da mesma no soro dos bovinos ($p<0,05$) do que os demais tratamentos, os quais não apresentaram diferença entre si ($p>0,05$). A atividade da ceruloplasmina também teve aumento ($p=0,06$) aos 84 dias após o início do período experimental, conforme apresentado na Tabela 3, ilustrando a importância da suplementação.

Figura 19. Atividade da ceruloplasmina no soro e erros padrões, em U/l, de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Senthilkumar et al. (2008), suplementando cordeiros com 7 ou 14mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato ou proteinato, reportaram maior atividade da ceruloplasmina ($p<0,05$) aos 90 e 180 dias de experimento, em animais que

receberam 14mg/kg na forma orgânica, diferindo do presente experimento, cuja suplementação com Cu na forma inorgânica proporcionou maior atividade da ceruloplasmina que a orgânica. Sharma et al. (2005), trabalhando com novilhas suplementadas ou não com Cu na forma de CuSO_4 observaram melhora significativa ($p < 0,01$) no nível de ceruloplasmina com a suplementação.

Segundo Todd (1970) a estimativa da ceruloplasmina no soro é um bom diagnóstico do status de Cu, por causa da estabilidade da enzima e do pequeno tamanho da amostra de soro requerida. Quando as reservas do fígado se aproximam da exaustão, a síntese de ceruloplasmina diminui e a concentração de Cu no plasma cai abaixo do normal, indicando um estado de deficiência (BECK, citado por SHARMA et al. 2005). Cerca de 95% do Cu sérico encontra-se ligado à ceruloplasmina (GOONERATNE et al., 1989). Trata-se de uma proteína (enzima) que contém oito sítios que ligam o Cu^+ ou Cu^{2+} . Ela ajuda na manutenção da homeostase e serve no transporte de Cu^{2+} (SMITH et al., 1988). Desse modo, nota-se que é uma enzima cuja atividade está ligada aos níveis de cobre no organismo. Essa pode ser a explicação para maior atividade da mesma nos animais que receberam o tratamento I40.

4.2 Desempenho

Nas tabelas 4, 5 e 6 estão apresentadas as médias de ganho de peso diário, ingestão de matéria seca e eficiência alimentar dos bovinos, em função dos tratamentos, durante os períodos experimentais.

Tabela 4. Médias de ganho de peso diário (GPD), em kg por dia, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante os períodos experimentais (0, 28, 56 e 84 dias).

GPD (kg/dia)	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
0 - 28	1,51 ^a	1,49 ^a	1,57 ^a	1,64 ^a	1,64 ^a	0,16	0,69	0,49	0,74	0,99
28 - 56	1,55 ^a	1,24 ^a	1,70 ^a	1,37 ^a	1,41 ^a	0,17	0,55	0,65	0,08	0,90
56 - 84	0,79 ^a	0,84 ^a	0,82 ^a	0,82 ^a	0,79 ^a	0,11	0,86	0,85	0,89	0,87
Total	1,29 ^a	1,20 ^a	1,37 ^a	1,29 ^a	1,29 ^a	0,09	0,96	0,92	0,19	0,97

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Tabela 5. Médias de ingestão de matéria seca (IMS) diária, em kg por dia, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante os períodos experimentais (0, 28, 56 e 84 dias).

IMS (kg/dia)	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
0 - 28	10,93 ^a	10,85 ^a	10,83 ^a	10,60 ^a	11,29 ^a	0,41	0,94	0,81	0,97	0,24
28 - 56	11,61 ^a	11,32 ^a	11,33 ^a	10,81 ^a	11,76 ^a	0,45	0,55	0,93	0,98	0,14
56 - 84	10,27 ^a	9,87 ^a	10,14 ^a	10,07 ^a	10,56 ^a	0,47	0,84	0,50	0,68	0,46
Total	11,08 ^a	10,68 ^a	10,77 ^a	10,50 ^a	11,20 ^a	0,40	0,52	0,76	0,87	0,22

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Tabela 6. Eficiência alimentar média (ganho de peso / ingestão de matéria seca) de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante os períodos experimentais (0, 28, 56 e 84 dias).

EA	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
0 – 28	0,13 ^a	0,14 ^a	0,15 ^a	0,16 ^a	0,15 ^a	0,01	0,40	0,51	0,67	0,62
28 – 56	0,14 ^a	0,11 ^a	0,15 ^a	0,13 ^a	0,12 ^a	0,02	0,42	0,68	0,08	0,69
56 – 84	0,08 ^a	0,09 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,01	0,77	0,70	0,72	0,72
Total	0,12 ^a	0,11 ^a	0,13 ^a	0,12 ^a	0,11 ^a	0,01	0,70	0,92	0,08	0,41

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) para GPD, IMS e EA entre os tratamentos controle e suplementação com Cu inorgânico ou orgânico, nos diferentes períodos experimentais. No período de 56-84 dias observa-se menor GPD, por ser um período em que há menor crescimento muscular e maior deposição de gordura, portanto, como a IMS é praticamente a mesma, verifica-se também menor eficiência alimentar.

Alguns autores encontraram resultados semelhantes aos do presente experimento. Salyer et al. (2004) não observaram efeito significativo no GPD, IMS e EA de novilhas suplementadas com Cu na forma orgânica ou inorgânica. Muehlenbein et al. (2001), em 2 experimentos com vacas, antes e depois do nascimento da cria, e suplementação com Cu na forma orgânica e inorgânica, reportaram que não houve diferença entre os tratamentos para o peso corporal das vacas e peso dos bezerros desmamados, em ambos os experimentos. Ahola et al. (2004) não encontraram efeito da fonte de Cu, Zn e Mn (orgânico x inorgânico) sobre

o desempenho dos bezerros desmamados em vacas de corte. Ward et al. (1993) suplementando bovinos por 21 dias com CuSO_4 ou Cu-lisina não observaram diferença no ganho de peso. Em experimentos com suínos, alguns autores também não observaram diferença entre as fontes de Cu (orgânica ou inorgânica) sobre o desempenho (VAN HEUGTEN e COFFEY, 1992; APGAR et al., 1995).

Entretanto, o efeito do cobre sobre o desempenho de bovinos apresenta resultados conflitantes na literatura. Ward e Spears (1997) e Engle e Spears (2000b) observaram aumento na EA de bovinos suplementados com Cu, durante o período de terminação, em relação aos bovinos que não receberam suplementação, diferindo do presente experimento, no qual não houve diferença entre os tratamentos estudados. Alguns experimentos encontraram queda de desempenho com a suplementação de Cu, resultado esse não observado no presente estudo. Sankoh e Boila (1987) trabalhando com injeção de Cu em bovinos não encontraram alteração no ganho de peso durante 113 dias de pastejo, mas encontraram queda no ganho de peso na fase de terminação. Engle et al. (2000a), trabalhando com suplementação de 20 e 40mg de Cu/kg de MS para bovinos Angus e Angus-Hereford, durante as fases de crescimento e terminação, não encontraram alteração no desempenho pela suplementação de Cu durante a fase de crescimento, porém, na fase de terminação, a suplementação reduziu o ganho em 19%, o consumo em 6,3% e a eficiência alimentar em 14%. Engle e Spears (2000a) e Engle et al. (2000c), em experimentos semelhantes ao anterior, não reportaram alteração no desempenho dos animais com a suplementação com Cu. A diferença entre os experimentos pode estar na duração da suplementação desse mineral. Sankoh e Boila (1987) e Engle et al. (2000a) adicionaram Cu à dieta tanto na fase de crescimento, como também na de terminação, enquanto Engle e Spears (2000a) e

Engle et al. (2000c) suplementaram apenas na fase de terminação, como no presente experimento, no qual os bovinos receberam a suplementação por apenas 84 dias. Isso possivelmente explica o fato de não ter havido queda no desempenho. A suplementação com nível elevado de Mo durante trinta dias antes do início do experimento, para reduzir o “status” inicial de Cu dos animais, também pode ter contribuído para a inexistência de efeito negativo no desempenho.

4.3 Rendimento de carcaça e perda pelo frio

Os valores referentes às médias de rendimento de carcaça quente e fria e perda pelo frio, em função dos tratamentos, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Médias de rendimentos de carcaça quente (RCQ) e fria (RCF), em porcentagem do peso vivo, e perda pelo frio (PF), em porcentagem da carcaça quente, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
RCQ (%)	61,40 ^a	60,80 ^a	61,83 ^a	61,39 ^a	61,05 ^a	0,53	0,82	0,86	0,18	0,65
RCF (%)	60,60 ^a	59,92 ^a	60,98 ^a	60,66 ^a	60,17 ^a	0,54	0,78	0,95	0,17	0,52
PF (% CQ)	0,80 ^a	0,87 ^a	0,85 ^a	0,73 ^a	0,88 ^a	0,07	0,71	0,42	0,81	0,15

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Não houve efeito significativo ($p>0,05$) para RCQ, RCF e PF entre os tratamentos controle e suplementação com Cu inorgânico ou orgânico nos diferentes níveis.

Carcaças com menor espessura de gordura podem ter maior perda pelo frio. Engle et al. (2000a) encontraram diminuição no peso de carcaça de animais suplementados com 40mg de Cu/kg de MS, entretanto, os autores também encontraram diminuição da espessura de gordura no músculo *L. dorsi*. Por outro lado, Del Claro (2007) suplementando bovinos em terminação com 40mg/kg de Cu não observaram alteração no RCQ, RCF e PF em comparação com os bovinos que receberam a dieta controle. Engle e Spears (2000a) também não encontraram alteração na PF ou peso de carcaça quente de bovinos em terminação recebendo suplementação de 20mg de Cu/kg de MS. Entretanto, em ambos os experimentos, os autores também não encontraram redução na espessura de gordura. Essa pode ter sido a explicação da ausência de efeito significativo para as mesmas variáveis no presente trabalho.

4.4 Espessura de gordura e Área de olho de lombo

Os valores médios de espessura de gordura (mm) e de área de olho de lombo (cm^2) dos bovinos, obtidos com auxílio do grid durante a desossa, e por meio do ultrassom durante o confinamento experimental, estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Nas Figuras 20 e 21 pode ser visto o efeito do tempo sobre as variáveis obtidas por meio do ultrassom.

Tabela 8. Valores médios de espessura de gordura subcutânea (EGSC), em mm, e área de olho de lombo (AOLC), em cm², obtidos durante a desossa, a partir do músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
EGPC (mm)	5,00 ^a	5,00 ^a	5,57 ^a	5,14 ^a	5,86 ^a	0,41	0,40	0,61	0,33	0,23
AOLC (cm ²)	82,00 ^a	82,00 ^a	83,57 ^a	82,00 ^a	78,86 ^a	3,25	0,91	0,47	0,73	0,50

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Tabela 9. Médias de espessura de gordura subcutânea (EGSU) e espessura de gordura na picanha (EGPU), em mm, e área de olho de lombo (AOLU), em cm², obtidas por meio do ultrassom durante o confinamento experimental, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
EGSU (mm)	4,76 ^a	4,82 ^a	4,91 ^a	4,59 ^a	4,93 ^a	0,34	0,95	0,78	0,51	0,73
EGPU (mm)	6,24 ^a	5,96 ^a	6,66 ^a	6,79 ^a	6,69 ^a	0,54	0,44	0,72	0,90	0,66
AOLU (cm ²)	67,73 ^a	71,16 ^a	71,61 ^a	69,13 ^a	64,73 ^a	2,65	0,34	0,13	0,51	0,43
Tempo (Dias)						Efeito de				
	0	28	56	84		Tempo				
EGSU (mm)	2,99±0,23	4,92±0,17	5,48±0,23	5,81±0,18		Q <0,01				
EGPU (mm)	5,03±0,27	6,28±0,34	6,91±0,38	7,67±0,44		L <0,01				
AOLU (cm ²)	66,24±1,32	67,88±1,39	67,84±1,32	73,51±1,18		Q <0,01				

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes;

L = efeito linear; Q = efeito quadrático;

Figura 20. Espessura de gordura subcutânea (EGSU) e espessura de gordura da picanha (EGPU) dos bovinos, e erros padrões, em mm, obtidas por meio de ultrassom durante o confinamento experimental.

Figura 21. Área de Olho de Lombo (AOLU) dos bovinos e erros padrões, em cm², obtida por meio de ultrassom durante o confinamento experimental.

Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da suplementação de diferentes fontes e níveis de cobre para espessura de gordura e área de olho de lombo, obtidas tanto por meio do ultrassom como durante a desossa. No caso das mensurações obtidas durante o período experimental, por meio do ultrassom, foi observado efeito

quadrático para AOLU e para EGSU e efeito linear para EGPU, onde os valores aumentaram com o tempo de confinamento. Entretanto, pode-se observar que em relação ao crescimento absoluto, a AOLU teve um aumento de apenas 10,98%, enquanto que com a EGSU e EGPU foi de 94,31% e 52,49%, respectivamente. Esse menor crescimento observado para a AOLU em relação às medidas de gordura pode ser explicado pelo fato dos animais encontrarem-se na fase onde o crescimento muscular diminui e aumenta a deposição de gordura corporal. Segundo Luchiari Filho (2000), o aumento de AOL está relacionado com o rendimento de cortes nobres. Devido a este fato deve-se atentar para o custo-benefício do confinamento, pois o custo de conversão de gordura é maior que o de AOL. Portanto, se o mercado consumidor não exigir carnes com muita gordura deve-se evitar a manutenção dos animais por muito tempo no confinamento, reduzindo desta forma os custos atrelados.

Com relação à suplementação com cobre, os resultados do presente estudo foram semelhantes aos de Engle e Spears (2000a), os quais também não encontraram alteração na espessura de gordura de bovinos em terminação recebendo suplementação de 20mg de Cu/kg de MS. Outros autores encontraram queda da espessura de gordura e aumento da área de olho de lombo com a suplementação de 40mg de Cu/kg de MS (Engle et al., 2000a; Engle e Spears, 2000b; Ward e Spears, 1997). Uma das explicações para a diminuição de espessura de gordura nesses experimentos seria a queda do desempenho dos animais suplementados com altas dosagens de Cu, fato esse que, como explicado anteriormente, não ocorreu no presente estudo. Outra explicação poderia estar fundamentada na relação do Cu com a enzima ácido graxo sintetase. Konjufca et al. (1997), trabalhando com aves, verificaram que o aumento dos níveis de Cu

proporcionou redução da atividade dessa enzima, e conseqüentemente da síntese de gordura, diminuindo a espessura de gordura da carne. No presente experimento a atividade da enzima ácido graxo sintetase não foi mensurada, entretanto, no trabalho de Konjufca et al. (1997) os níveis de Cu utilizados foram muito superiores (180mg/kg de MS), o que poderia justificar a ausência de resultados significativos do presente estudo.

4.5 Fermentação ruminal

Na Tabela 10 estão apresentados os valores referentes às médias de pH ruminal, nitrogênio amoniacal e as porcentagens dos ácidos acético, propiônico e butírico no rúmen dos bovinos em função dos tratamentos. Na Figura 22 pode ser visto o efeito dos tratamentos sobre o nitrogênio amoniacal no rúmen.

Tabela 10. Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), em mg/dl, e as porcentagens dos ácidos acético, propiônico e butírico no rúmen de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
pH ruminal	6,50 ^a	6,55 ^a	6,40 ^a	6,74 ^a	6,56 ^a	0,20	0,78	0,39	0,59	0,52
N-NH ₃ (mg/dl)	2,49 ^a	2,85 ^a	3,50 ^a	2,15 ^a	2,55 ^a	0,48	0,59	0,07	0,31	0,54
Ác. Acético (%)	66,82 ^a	68,03 ^a	70,10 ^a	67,31 ^a	68,06 ^a	3,31	0,68	0,68	0,66	0,87
Ác. Propiônico (%)	21,42 ^a	19,78 ^a	19,17 ^a	19,59 ^a	19,83 ^a	1,73	0,35	0,89	0,81	0,92
Ac. Butírico (%)	11,76 ^a	12,20 ^a	10,73 ^a	13,10 ^a	12,11 ^a	1,70	0,86	0,51	0,55	0,68

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si (p<0,05), pela análise de contrastes.

O pH ruminal dos animais suplementados ou não com diferentes fontes e níveis de Cu não apresentou diferença significativa ($p>0,05$). Os valores de pH ruminal obtidos (6,40 a 6,74) são considerados normais, segundo Berchielli et al. (2006). O pH ruminal está diretamente relacionado aos produtos finais da fermentação, bem como à taxa de crescimento dos microrganismos ruminais, e a sua estabilidade é atribuída, em parte, à saliva, que possui alto poder tamponante, e à capacidade da mucosa ruminal em absorver os AGV produzidos na fermentação ruminal (RADOSTITS et al., 2002). A presença de tampões ou bases dos alimentos também pode influenciar o pH ruminal (VAN SOEST, 1994). Dietas ricas em concentrado requerem baixo tempo de ruminação, conseqüentemente reduzindo a secreção salivar. O presente experimento fez uso de uma dieta rica em concentrado (70%), entretanto, foi utilizado bicarbonato de sódio na dieta que serviu como tamponante ruminal. Engle e Spears (2000b) não encontraram diferenças no pH ruminal de bovinos Angus com a suplementação de Cu na forma de CuSO_4 em comparação com uma dieta controle, concordando com os resultados obtidos nesse experimento.

Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a amônia no rúmen, porém a média da concentração de amônia ruminal dos animais alimentados com dieta contendo Cu inorgânico (3,18mg/dL) foi 35% maior do que a quantidade de amônia ruminal dos animais suplementados com dieta contendo Cu orgânico (2,35mg/dL). Essa variável apresentou um alto coeficiente de variação (43,65%), que pode ter sido devido à diferença nos horários de abate, modificando o perfil das amostras de líquido ruminal. O ideal seria a coleta de todos os animais ao mesmo tempo, mas este procedimento não é possível no abatedouro. Se a variação dos dados fosse menor, provavelmente encontraríamos uma diferença significativa.

Figura 22. Concentração de N-NH₃ e erros padrões, em mg/dl, no rúmen de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Estudos in vitro indicaram que a suplementação de cobre pode diminuir a atividade e o crescimento de certas populações de bactérias, diminuindo a produtividade do animal. O valor numérico médio da suplementação com Cu orgânico inferior ao da fonte inorgânica sugere efeito tóxico do Cu inorgânico sobre alguns microorganismos, podendo diminuir a síntese protéica e, conseqüentemente, haver maior acúmulo de N-NH₃.

Em relação aos AGV não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Segundo Hunter citado por Engle et al. (2000c), o Cu pode servir como carreador de elétrons em processos de redução, dessa forma, podendo interferir na fermentação ruminal. Forsberg (1978) afirmou que uma concentração de Cu de 21 µg/ml de rúmen pode diminuir o crescimento de certas populações de bactérias, com diminuição de fermentação ruminal. Em função disso, Engle e Spears (2000a)

sugeriram que a queda no desempenho, observada em bovinos em terminação suplementados com 20 ou 40mg de Cu/kg de MS, poderia ter ocorrido devido á depressão da fermentação ruminal causada pelo Cu. Entretanto, alguns autores como Engle e Spears (2000b) e Del Claro (2007), em experimentos desenvolvidos com bovinos suplementados com diferentes níveis de Cu, não encontraram alteração na fermentação ruminal, assim como no presente estudo. Segundo Del Claro (2007), uma possível explicação poderia ser o fato da suplementação de Cu nos níveis estudados não ter sido suficiente para alterar o crescimento de bactérias ruminais e, conseqüentemente, a fermentação ruminal. Isso pode ser evidenciado pela ausência de alteração na proporção de AGV e também por não ter havido queda de desempenho nos animais suplementados com Cu no presente experimento.

4.6 Perfil de ácidos graxos na carne

Na Tabela 11 são apresentadas as proporções dos ácidos graxos no músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore, em função dos tratamentos. Nas Figuras 23 e 24 está ilustrado o efeito da suplementação de cobre sobre a proporção de ácidos graxos saturados e insaturados e a proporção de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados no músculo *L. dorsi*.

Tabela 11. Perfil de ácidos graxos (%) do músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Ácidos graxos (%)	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
C10:0 (Cáprico)	0,08 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,08 ^a	0,01	0,18	0,78	0,50	0,36
C12:0 (Láurico)	0,11 ^a	0,11 ^a	0,10 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,01	0,23	0,30	0,83	0,68
C14:0 (Mirístico)	4,35 ^a	3,53 ^b	3,00 ^b	3,17 ^b	3,50 ^b	0,24	<0,01	0,80	0,13	0,36
C14:1c9 (Miristoleico)	0,92 ^a	1,02 ^a	0,80 ^a	0,75 ^a	0,89 ^a	0,10	0,62	0,40	0,14	0,34
C15:0(Pentadecanóico)	0,38 ^a	0,37 ^a	0,29 ^a	0,34 ^a	0,36 ^a	0,03	0,23	0,54	0,13	0,54
C16:0 (Palmitico)	27,54 ^a	25,69 ^b	24,64 ^b	24,49 ^b	24,96 ^b	0,61	<0,01	0,47	0,23	0,59
C16:1c9 (Palmitoleico)	2,64 ^a	3,38 ^a	2,88 ^a	2,78 ^a	2,97 ^a	0,24	0,19	0,29	0,15	0,59
C17:0 (Margárico)	0,88 ^a	0,88 ^a	0,90 ^a	0,84 ^a	0,86 ^a	0,08	0,88	0,58	0,80	0,88
C17:1	0,76 ^a	0,80 ^a	0,70 ^a	0,75 ^a	0,78 ^a	0,06	0,94	0,85	0,24	0,65
C18:0 (Esteárico)	16,10 ^a	13,80 ^{bc}	13,03 ^c	14,76 ^{ab}	15,09 ^{ab}	0,55	<0,01	0,01	0,33	0,67
C18:1 c9 (Oléico)	35,84 ^b	40,67 ^a	39,75 ^a	39,86 ^a	40,49 ^a	1,15	<0,01	0,98	0,58	0,70
C18:1 c11	1,50 ^a	1,41 ^a	1,38 ^a	1,41 ^a	1,35 ^a	0,09	0,28	0,89	0,84	0,66
C18:1 c12	0,22 ^a	0,18 ^a	0,22 ^a	0,23 ^a	0,19 ^a	0,02	0,45	0,60	0,21	0,13
C18:1 c13	0,38 ^a	0,46 ^a	0,36 ^a	0,37 ^a	0,43 ^a	0,04	0,58	0,70	0,08	0,30
C18:1 c15	0,07 ^a	0,09 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,09 ^a	0,01	0,45	0,89	0,07	0,09
C18:1 t16	0,17 ^a	0,17 ^a	0,16 ^a	0,17 ^a	0,19 ^a	0,01	0,67	0,37	0,34	0,25
C18:2c9c12(Linoléico)	2,88 ^a	2,91 ^a	4,43 ^a	3,78 ^a	3,28 ^a	0,60	0,30	0,82	0,08	0,57
C18:2c9 t11 (CLA)	0,44 ^a	0,48 ^a	0,48 ^a	0,44 ^a	0,50 ^a	0,04	0,43	0,69	0,99	0,30
C18:2 t11 c15	0,04 ^a	0,04 ^a	0,12 ^a	0,09 ^a	0,03 ^a	0,03	0,34	0,47	0,08	0,24
C18:3 n3 (Linolênico)	0,32 ^a	0,28 ^a	0,40 ^a	0,42 ^a	0,31 ^a	0,07	0,66	0,76	0,26	0,31
C18:3 n6 (Linolênico)	0,14 ^a	0,10 ^a	0,12 ^a	0,10 ^a	0,11 ^a	0,02	0,07	0,63	0,39	0,65
C20:1 (Eicosenóico)	0,16 ^a	0,18 ^a	0,16 ^a	0,16 ^a	0,17 ^a	0,02	0,65	0,90	0,56	0,70
C20:4 (Araquidônico)	0,71 ^a	0,60 ^a	1,43 ^a	1,48 ^a	0,83 ^a	0,35	0,35	0,68	0,10	0,20
C20:5 (EPA)	0,33 ^a	0,16 ^a	0,38 ^a	0,37 ^a	0,21 ^a	0,11	0,69	0,89	0,16	0,31
C22:2	0,12 ^a	0,07 ^a	0,15 ^a	0,12 ^a	0,09 ^a	0,03	0,60	0,93	0,07	0,39
C22:5	0,50 ^a	0,34 ^a	0,75 ^a	0,76 ^a	0,46 ^a	0,19	0,72	0,73	0,13	0,26
C22:6	0,05 ^a	0,03 ^a	0,12 ^a	0,08 ^a	0,06 ^a	0,03	0,46	0,87	0,07	0,59
Saturados	50,19 ^a	45,10 ^b	42,79 ^b	44,35 ^b	45,50 ^b	1,23	<0,01	0,43	0,19	0,51
Insaturados	49,81 ^b	54,90 ^a	57,21 ^a	55,65 ^a	54,50 ^a	1,23	<0,01	0,43	0,19	0,51
Monoinsaturados	44,20 ^b	49,84 ^a	48,75 ^a	47,94 ^a	48,57 ^a	1,25	<0,01	0,41	0,54	0,72
Poliinsaturados	5,61 ^a	5,06 ^a	8,46 ^a	7,71 ^a	5,93 ^a	1,25	0,41	0,96	0,07	0,32
Insaturados/Saturados	0,99 ^b	1,22 ^a	1,34 ^a	1,27 ^a	1,23 ^a	0,07	<0,01	0,57	0,22	0,67
Mono/Saturados	0,88 ^b	1,11 ^a	1,14 ^a	1,09 ^a	1,08 ^a	0,05	<0,01	0,44	0,67	0,94
Poli/Saturados	0,11 ^a	0,11 ^a	0,20 ^a	0,17 ^a	0,14 ^a	0,03	0,22	0,96	0,07	0,46
Ômega-3	0,43 ^a	0,41 ^a	0,59 ^a	0,57 ^a	0,43 ^a	0,07	0,39	0,98	0,09	0,18
Ômega-6	3,26 ^a	3,20 ^a	4,78 ^a	4,12 ^a	3,5 ^a	0,60	0,34	0,82	0,08	0,54
Ômega-6/ Ômega-3	7,99 ^a	7,85 ^a	8,48 ^a	7,92 ^a	7,85 ^a	0,96	0,98	0,77	0,64	0,96
Hiper/ Hipo ¹	0,64 ^a	0,53 ^b	0,48 ^b	0,50 ^b	0,53 ^b	0,02	<0,01	0,83	0,16	0,41

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

¹ Hipercolesterolemicos (C14:0 + C16:0)/Hipocolesterolêmicos (monoinsaturados + poliinsaturados);

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si (p<0,05), pela análise de contrastes.

Figura 23. Porcentagem de ácidos graxos saturados e insaturados do músculo *L. dorsi* de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Figura 24. Porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados do músculo *L. dorsi* de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Em geral, a suplementação com cobre alterou o perfil de ácidos graxos da carne ($p < 0,05$), com aumento na proporção de ácidos graxos insaturados em detrimento dos ácidos graxos saturados. No caso dos ácidos graxos mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), ambos considerados hipercolesterolêmicos, segundo Farfan (1996), a suplementação com Cu, independente da fonte e nível, proporcionou menores porcentagens na carne dos bovinos quando comparados com os do controle. No caso do ácido graxo esteárico (C18:0) a suplementação com cobre na forma inorgânica proporcionou menores porcentagens em relação ao tratamento controle. A suplementação com Cu, independente da fonte e nível, aumentou a porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados, entre eles, o oléico (C18:1 c9), as relações insaturados/saturados e monoinsaturados/saturados e reduziu a relação hiper/ hipocolesterolêmicos na carne quando comparado com o tratamento controle. Não houve alteração na porcentagem dos ácidos graxos ômega-3, ômega-6 e na relação ômega-6/ômega-3. De acordo com Wood et al. (2003), a relação ômega-6/ômega-3 é muito importante pois está associada a doenças coronarianas e câncer. A recomendação é que essa relação seja inferior a 0,45, ou seja, inferior à média de 0,8 observada neste trabalho. Essa relação aumenta à medida que os animais permanecem mais tempo confinados, ou ficam mais gordos, pois a proporção de gordura na gota lipídica em relação à proporção de gordura na membrana aumenta, ou seja, quanto mais gordura é depositada, pior a relação (DUCKETT, citado por SILVA, 2005). No presente experimento os animais depositaram bastante gordura, como pode ser observado pela EGSU e EGPU, portanto, essa pode ter sido a explicação para a relação ômega-6/ômega-3 estar acima do recomendado.

A carcaça de bovinos contém, em média, 49% de ácidos graxos saturados, 45% de monoinsaturados e 6% de polinsaturados (DUCKETT et al., 1993), estando próximos aos valores encontrados para o tratamento controle no presente experimento. A suplementação com Cu, portanto, foi eficiente em reduzir a porcentagem de ácidos graxos saturados e aumentar os insaturados, principalmente os monoinsaturados. Alguns autores trabalhando com suplementação de Cu nos níveis do presente estudo, também encontraram alteração no perfil de ácidos graxos, com diminuição de ácidos graxos saturados e aumento de insaturados (ENGLE et al., 1999; ENGLE et al., 2000a; ENGLE e SPEARS, 2000b). Segundo esses autores, pode ter ocorrido queda de biohidrogenação ruminal promovida pelo Cu, e conseqüente aumento de absorção intestinal dos ácidos graxos insaturados. Segundo Berchielli et al. (2006), a composição de ácidos graxos na carne é resultado da lipogênese no tecido adiposo e também dos lipídeos da dieta e posterior biohidrogenação ruminal. Engle et al. (2000b) explicaram que o alto potencial de redução do Cu no rúmen, pode diminuir equivalentes de redução na forma de NADPH e NADH, interferindo na biohidrogenação microbiana de ácidos graxos insaturados. Essa pode ser a explicação da alteração na composição de ácidos graxos com a suplementação de Cu, ou seja, houve influência desse mineral na biohidrogenação ruminal.

4.7 Estabilidade oxidativa

Os valores referentes às médias de TBARS no fígado e no músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore, em função dos tratamentos e do tempo de armazenamento, estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente. O efeito da suplementação de Cu sobre a oxidação lipídica pode ser observado na Figura 25.

Tabela 12. Médias de TBARS, em mg/kg de fígado e do músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu e armazenamento em Display Life (DL), atmosfera modificada (ATM) ou embalagem a vácuo (VC).

TBARS (mg/kg)	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
Fígado	0,539 ^a	0,511 ^a	0,504 ^a	0,515 ^a	0,519 ^a	0,017	0,19	0,59	0,81	0,87
DL	0,161 ^a	0,152 ^{ab}	0,138 ^b	0,146 ^{ab}	0,142 ^b	0,005	0,07	0,80	0,39	0,73
ATM	0,192 ^a	0,167 ^{bc}	0,151 ^c	0,167 ^{bc}	0,169 ^b	0,006	0,02	0,65	0,38	0,85
VC	0,155 ^a	0,141 ^a	0,135 ^a	0,147 ^a	0,138 ^a	0,006	0,34	0,13	0,51	0,43

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes;

Tabela 13. Médias de TBARS, em mg/kg do músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore, nos tempos 0, 1, 2 e 3 dias no Display Life (DL), 0, 3, 6 e 9 dias em atmosfera modificada (ATM) e 0, 7 e 14 dias embalados a vácuo (VC).

TBARS (mg/kg)	Tempo (Dias)				Efeito de Tempo
	0d	1d	2d	3d	
DL	0,128±0,003	0,148±0,004	0,152±0,004	0,163±0,004	L = <0,01
	0d	3d	6d	9d	
ATM	0,128±0,003	0,170±0,004	0,185±0,005	0,193±0,005	Q = <0,01
	0d	7d	14d		
VC	0,128±0,003	0,146±0,003	0,155±0,004		L = <0,01

L = efeito linear; Q = efeito quadrático;

Não houve efeito significativo ($p>0,05$) para TBARS no fígado, entre os tratamentos controle e suplementação com cobre inorgânico ou orgânico. A ausência de efeito significativo do presente trabalho pode ter sido devido ao fato dessas amostras terem sido colhidas logo após o abate, não estando, portanto, submetidas a nenhum desafio.

Houve efeito significativo de tratamento e de tempo sobre a oxidação lipídica da carne de bovinos Nelore durante os períodos de Display Life ($p=0,06$ e $p<0,05$) e de atmosfera modificada ($p<0,05$ e $p<0,05$). No caso das amostras embaladas a vácuo, houve efeito significativo somente de tempo ($p<0,05$) sobre a oxidação lipídica.

Figura 25. Oxidação lipídica, mensurada através do TBARS e erros padrões, em mg/kg do músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica, armazenado em DL, ATM ou VC.

De maneira geral, para as amostras do Display Life observou-se aumento linear ($y = 0,1320 + 0,000421x$) dos valores de TBARS em função do tempo de armazenamento (0, 1, 2 e 3 dias) e, os valores de TBARS obtidos para os animais recebendo 40mg/kg de Cu, independente da fonte (orgânica ou inorgânica), foram menores em relação aos animais do tratamento controle. Para as amostras da atmosfera modificada foi verificado aumento quadrático ($y = 0,1296 + 0,01556x - 0,00095x^2$) dos valores de TBARS em função do tempo de armazenamento (0, 3, 6 e 9 dias) e, os valores de TBARS foram menores para os animais suplementados com Cu em relação aos que receberam a dieta controle. Dentro do nível 40mg/kg de Cu, houve diferença entre as fontes, sendo que os animais suplementados com a fonte inorgânica tiveram menor valor de TBARS que os suplementados com a orgânica. No caso das amostras embaladas a vácuo, os valores de TBARS aumentaram de forma linear ($y = 0,1295 - 0,001931x$) em função do tempo de maturação (0, 7 e 14 dias).

Com relação ao tempo de armazenamento é esperado que haja aumento nos valores de TBARS, uma vez que, independente da presença de oxigênio, existem os processos metabólicos que geram continuamente os radicais livres responsáveis pela oxidação lipídica. A oxidação lipídica também pode ser afetada pela dieta, pela presença de antioxidantes ou de pró-oxidantes (BUCKLEY citado por REY e LÓPEZ-BOTE, 2001). Segundo Luzy e Speisky (1996), o Cu é considerado um elemento pró-oxidante, porém, no fígado o Cu não está presente na forma livre iônica e sim ligado a proteínas, que inativam sua ação pró-oxidante. Essa pode ser a explicação para a ausência de efeito pró-oxidante do Cu inorgânico no presente experimento. A redução nos valores de TBARS na carne de bovinos Nelore suplementados com Cu para as amostras dispostas no Display Life (I40 e O40), e na atmosfera modificada

(I10, I40, O10 ou O40), em relação ao tratamento controle, sugere o efeito antioxidante desse mineral.

Como também pode ser observado, os valores de TBARS foram maiores para as amostras da ATM do que para DL e VC, pelo fato de haver maior concentração de O₂. Sabe-se que altas concentrações de O₂ podem afetar negativamente a estabilidade oxidativa dos lipídios do músculo, causando um rápido desenvolvimento de rancidez da carne e, conseqüentemente afetando seus atributos de qualidade (JEREMIAH, 2001; XIONG, YOULING, 2000). Nesse caso notou-se maior ação antioxidante do Cu sobre a oxidação lipídica da carne, quando comparado ao DL ou ao VC. A ausência de efeito significativo para os tratamentos, encontrada no presente trabalho, para as amostras embaladas a vácuo, pode ser devido à ausência de oxigênio, não sendo possível verificar ação antioxidante do cobre durante os 14 dias de armazenamento.

Não foram encontrados trabalhos relacionando suplementação de cobre com oxidação lipídica em bovinos. Lauridsen et al. (1999b) investigaram os efeitos da suplementação de diferentes níveis de Cu e vitamina E no status oxidativo e antioxidativo do fígado de suínos em crescimento e não encontraram efeito pró-oxidante do Cu. A progressão do TBARS no fígado foi reduzida pela adição de vitamina E e Cu, indicando um efeito antioxidativo de ambos os nutrientes. Em experimento no qual foram avaliadas a composição e oxidação do músculo *L. Dorsi* em suínos, foi observado que a suplementação com Cu não afetou a susceptibilidade à oxidação lipídica (REY e LOPEZ-BOTE, 2001). Lauridsen et al. (1999a) estudaram o efeito da suplementação de Cu e vitamina E no status oxidativo do músculo de suínos. Amostras de músculo homogeneizadas foram incubadas com ferro para induzir a oxidação, a qual foi mensurada pelo teste de TBARS. No

músculo *P. maior*, a adição de Cu na dieta inibiu a taxa de oxidação. O efeito foi significativo após 80 minutos de incubação ($p=0,02$), porém nenhuma diferença entre os níveis de Cu na dieta foram observados. A oxidação lipídica no músculo *L. dorsi* não foi influenciada pelas dietas com Cu. Com o objetivo de estudar o efeito de α -tocoferol e CuSO_4 na susceptibilidade à oxidação da carne em suínos, Cava et al. (1999) encontraram menores valores de TBARS para os grupos com suplementação de Cu e α -tocoferol, quando comparados com o controle.

Algumas enzimas antioxidantes podem inibir a oxidação lipídica. A GSH-Px, juntamente com a SOD e a catalase protegem as células contra os problemas causados pelos radicais livres (FLOHE citado por NUERNBERG et al., 1998). A SOD é uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos e possui um grande papel na regulação do metabolismo celular dependente do O_2 (JONES e SUTTLE, 1981), dessa forma, juntamente com outras enzimas antioxidantes, pode inibir a oxidação lipídica e aumentar a estabilidade de tecidos vivos e em alimentos como a carne (LAURIDSEN et al. 1999a). No presente experimento, houve influencia da suplementação com Cu sobre a atividade da SOD, como poderá ser observado em seguida, portanto, isso pode ser uma possível explicação para essa redução na oxidação lipídica. Entretanto, segundo Lauridsen, et al. (1999a) ainda não está claro como a atividade das enzimas antioxidantes no *postmortem* é afetada pela capacidade antioxidante total do músculo vivo.

Nas tabelas 14 e 15 estão apresentados os valores médios de L^* , a^* e b^* da carne em função dos tratamentos e do tempo de armazenamento, respectivamente.

Tabela 14. Valores médios das variáveis de cor (L^* , a^* e b^*) mensuradas na carne de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, armazenada em Display Life (DL) ou atmosfera modificada (ATM)

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
L^*										
DL	38,83 ^a	40,25 ^a	40,57 ^a	39,62 ^a	39,75 ^a	0,54	0,36	0,14	0,22	0,23
ATM	41,10 ^a	42,63 ^a	42,97 ^a	41,92 ^a	42,62 ^a	0,49	0,39	0,24	0,14	0,08
a^*										
DL	19,30 ^a	20,07 ^a	20,30 ^a	19,73 ^a	20,54 ^a	0,47	0,85	0,84	0,40	0,08
ATM	21,56 ^a	21,56 ^a	22,11 ^a	21,93 ^a	22,17 ^a	0,44	0,44	0,73	0,77	0,34
b^*										
DL	15,84 ^a	16,79 ^a	16,98 ^a	16,12 ^a	16,50 ^a	0,33	0,49	0,39	0,61	0,37
ATM	16,59 ^a	17,15 ^a	17,36 ^a	16,88 ^a	17,14 ^a	0,26	0,59	0,33	0,20	0,15

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes;

Tabela 15. Valores médios das variáveis de cor (L^* , a^* e b^*) mensuradas na carne de bovinos Nelore, nos tempos 0, 1, 2 e 3 dias no Display Life (DL) e 0, 3, 6 e 9 dias em atmosfera modificada (ATM).

Variáveis	Tempo (Dias)				Efeito de Tempo
	0d	1d	2d	3d	
DL					
L^*	38,85±0,28	40,50±0,28	40,69±0,34	39,18±0,29	Q <0,01
a^*	16,22±0,19	21,91±0,34	21,50±0,36	20,32±0,31	Q <0,01
b^*	13,99±0,14	18,74±0,26	17,17±0,22	15,88±0,17	Q <0,01
ATM					
L^*	38,85±0,28	42,70±0,27	43,18±0,24	44,27±0,29	Q <0,01
a^*	16,22±0,19	24,35±0,23	23,95±0,34	22,95±0,30	Q <0,01
b^*	13,99±0,14	19,28±0,15	17,55±0,17	17,28±0,17	Q <0,01

Q = efeito quadrático;

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) de tempo, com resposta quadrática para todas as variáveis de cor (L^* , a^* e b^*) da carne de bovinos Nelore durante o DL e o armazenamento em ATM. Não houve efeito de tratamentos sobre essas variáveis.

De maneira geral, os valores de L^* , a^* e b^* determinados neste trabalho em função dos tempos de DL e ATM tiveram comportamento semelhante. Embora os valores determinados nas amostras de carne da ATM terem sido superiores aos determinados durante o DL, essa diferença pode ser atribuída à alta concentração de oxigênio que promove maior estabilidade da cor na carne (ZAKRYS et al., 2008).

4.8 Enzimas antioxidantes

Na Tabela 16 é apresentada a atividade das enzimas SOD e GSH-Px no fígado de bovinos frente aos diferentes tratamentos propostos. Nas Figuras 26 e 27 é ilustrado o efeito da suplementação de Cu sobre a atividade das enzimas SOD e GSH-Px.

Tabela 16. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína e glutathiona peroxidase (GSH-Px), em nmol/minuto/mg de proteína, no fígado de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
SOD ($\mu\text{mol/mg prot}$)	45,29 ^c	52,73 ^{bc}	62,93 ^a	54,3 ^{bc}	55,95 ^{ab}	3,73	0,01	0,48	0,06	0,76
GSH-Px (nmol/min/mg prot)	481,3 ^a	501,9 ^a	537,7 ^a	550,0 ^a	505,8 ^a	44,8	0,40	0,86	0,57	0,50

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Figura 26. Atividade da enzima SOD, em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, no fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Figura 27. Atividade da enzima GSH-Px, em nmol/min/mg de proteína, no fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

A suplementação com cobre no nível 40mg/kg, independente da fonte (inorgânica ou orgânica), proporcionou maior atividade da SOD no fígado dos bovinos ($p < 0,05$), quando comparado ao tratamento controle. No caso dos animais que receberam o tratamento I40, a atividade da SOD também foi maior do que aqueles que receberam os tratamentos I10 e O10, os quais não diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos O40 e controle.

A SOD é uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos, portanto a suplementação com esse mineral pode aumentar sua atividade. A atividade reduzida da SOD no fígado foi associada com a deficiência de cobre em ratos (PAYNTER et al., 1979; PROHASKA et al., 1983). Bozkaya et al. (2001), em estudo desenvolvido com eritrócitos de galinhas, também verificaram que o grupo com deficiência de Cu teve redução da atividade da SOD.

Lauridsen et al. (1999b) investigaram os efeitos da suplementação de diferentes níveis de Cu e vitamina E no status oxidativo e antioxidativo do fígado de suínos em crescimento. A atividade da SOD não foi afetada pelos tratamentos. Entretanto, a maioria dos autores que verificou o efeito da suplementação de Cu sobre a enzima SOD, em diferentes espécies, encontrou aumento da atividade da mesma no fígado, músculo ou sangue. Senthilkumar et al. (2008), em experimento com cordeiros e suplementação 7 ou 14mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato ou proteinato, reportaram maior atividade da SOD no fígado ($p < 0,05$) de animais que receberam 14mg/kg de CuSO_4 . No trabalho de Ward e Spears (1997), com bovinos, a suplementação de Cu proporcionou aumento na atividade da SOD até o 56º dia da fase de crescimento. Lauridsen et al. (1999a) estudando o efeito da suplementação de Cu e vitamina E no status oxidativo do músculo de suínos, observaram tendência de aumento da atividade da SOD no músculo *Psoas maior* dos animais que

receberam 175mg/kg de Cu (5,7 U/mg de proteína), em comparação com aqueles que receberam 35mg/kg (5,23 U/mg proteína, $p=0,07$) ou que não foram suplementados com esse mineral (5,20 U/mg de proteína, $p=0,08$). No músculo *Longissimus dorsi*, o aumento da atividade da SOD com o aumento de Cu na dieta não foi estatisticamente significativo. Sharma et al. (2005) conduziram um experimento com 40 novilhas Cu-deficientes. Os animais foram divididos em dois grupos (A e B) e somente o grupo A recebeu uma mistura mineral contendo CuSO_4 . Foi observada melhora significativa na atividade da SOD nas células vermelhas, nas células brancas e no sangue todo a partir do 60º dia de tratamento para os animais do grupo A, enquanto para grupo B não houve diferença significativa nos 180 dias de experimento. Xin et al. (1991) trabalhando com bovinos holandeses e suplementação com 20mg/kg de Cu (CuSO_4) ou com 10mg/kg de Mo na forma de molibdato de amônio (para desenvolver um grupo deficiente em Cu), observaram que a atividade da SOD nas células vermelhas do sangue e no sangue todo diminuiu no grupo deficiente.

Com relação à enzima GSH-Px, não foi observado efeito significativo ($p>0,05$) da suplementação de cobre sobre a atividade da mesma. Porém, numericamente, com exceção do tratamento O10, os valores referentes à atividade da GSH-Px acompanharam os valores da SOD.

A GSH-Px é uma enzima que contém quatro átomos de selênio (HOLBEN, 1999), apresentando a sua biossíntese induzida por selênio (BENGOUIMI et al., 1998). Entretanto alguns autores, apesar de não trabalharem com suplementação com selênio, relataram correlação entre atividade de GSH-Px e concentração de Cu. Prohaska (1990) afirmou que a atividade da GSH-Px foi menor no fígado e plasma de ratos Cu-deficientes. Segundo Uriu-Adams e Keen (2005) a deficiência de Cu

diminuiu a atividade da GSH-Px no fígado de humanos. Dove e Ewan (1991) encontraram influência da suplementação de vitamina E e Cu na atividade da GSH-Px no fígado de suínos. No esquema abaixo (Figura 28), pode-se observar que o subproduto proveniente da ação da SOD é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que também causa danos às células. A GSH-Px age quebrando esse subproduto em H_2O e O_2 . Desse modo, uma possível explicação para esses trabalhos, seria o aumento de Cu no fígado, que pode aumentar a atividade da enzima SOD e, conseqüentemente, aumentar o H_2O_2 , dessa forma aumentando a necessidade de síntese de GSH-Px.

Figura 28. Atividade das enzimas antioxidantes: SOD e GSH-Px.

O presente experimento também não fez uso de suplementação com selênio e, apesar do aumento da atividade da SOD, o aumento do substrato provavelmente não foi suficiente para que houvesse aumento significativo da atividade da GSH-Px. Outros autores encontraram resultados semelhantes ao do presente trabalho. Xin et al. (1991) verificaram o efeito da suplementação de Cu sobre as enzimas, em bovinos da raça holandesa. Houve efeito sobre a SOD, entretanto, a atividade da

GSH-Px não foi afetada pelo Cu. Lauridsen et al. (1999b) trabalhando com suínos e avaliando o efeito da suplementação de diferentes níveis de Cu e vitamina E no status oxidativo do fígado, não observaram alteração na atividade da GSH-Px em função dos tratamentos, porém, também não houve efeito sobre a SOD. Lauridsen et al. (1999a) estudando o efeito da suplementação de Cu e vitamina E no status oxidativo dos músculos *P. maior* e *L. dorsi* de suínos, não observaram influência dos tratamentos sobre a atividade da GSH-Px em ambos os músculos.

4.9 GSH, GSSG e relação GSH/GSSG

Os valores referentes às concentrações médias de GSH e GSSG e à relação GSH/GSSG no fígado dos bovinos, em função dos diferentes tratamentos estão apresentadas na Tabela 17. O efeito da suplementação de Cu sobre essas mesmas variáveis está representado nas Figuras 29, 30 e 31.

Tabela 17. Concentrações médias de GSH e GSSG, em $\mu\text{mol/g}$ de fígado e da relação GSH/GSSG, de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis ($\mu\text{mol/g}$ fígado)	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
GSH	1,84 ^a	1,58 ^{ab}	1,36 ^b	1,44 ^b	1,31 ^b	0,14	0,01	0,48	0,27	0,50
GSSG	0,012 ^a	0,014 ^a	0,017 ^a	0,018 ^a	0,014 ^a	0,002	0,08	0,97	0,18	0,11
GSH/GSSG	158,1 ^a	124,7 ^{ab}	80,8 ^c	90,8 ^{bc}	100,9 ^{bc}	14,76	<0,01	0,65	0,04	0,63

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes.

Figura 29. Concentrações médias de glutathiona (GSH), em $\mu\text{mol/g}$ de fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Figura 30. Concentrações médias de GSSG, em $\mu\text{mol/g}$ de fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Figura 31. Relação GSH/GSSG no fígado de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Houve efeito de tratamento para a variável GSH ($p=0,067$) e para a relação GSH/GSSG ($p<0,05$). Os tratamentos I40, O10 e O40 apresentaram menor concentração de GSH e relação GSH/GSSG no fígado de bovinos em relação ao tratamento controle, o qual não diferiu do tratamento I10. Para a relação GSH/GSSG, o tratamento I40 também apresentou menor média ($p<0,05$) que o tratamento I10. Não houve efeito da suplementação de Cu sobre a variável GSSG.

A GSH-Px converte o H_2O_2 , proveniente da ação da SOD, à água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto, a GSSG (Huber e Almeida, 2008). Dessa forma, com a ação da GSH-Px é esperado um aumento de GSSG em detrimento de GSH, como pode ser observado na Figura 28. No presente experimento, não houve efeito significativo da suplementação com Cu sobre a atividade da GSH-Px, entretanto, numericamente, houve certa relação entre essa enzima e as variáveis

analisadas, ou seja, em geral, para os tratamentos com Cu, onde houve maior valor numérico para atividade da GSH-Px, pode-se observar menor valor de GSH ($p < 0,05$), maior valor numérico de GSSG e menor relação GSH/GSSG ($p < 0,05$).

Outra explicação para a redução da GSH com a suplementação de Cu pode estar fundamentada no relato de Uriu-Adams e Keen (2005). Segundo os autores, a deficiência de Cu ocasiona um aumento de síntese de GSH, aumentando a concentração hepática desse peptídeo. Por outro lado, o GSH facilita a redução do Cu^{2+} para o Cu^+ , formando um complexo entre Cu e GSH, diminuindo os níveis hepáticos de GSH. Alguns autores como Jiménez e Speisky (2000) e Freedman et al. (1989), encontraram resultados semelhantes aos do presente experimento, ou seja, diminuição dos níveis de GSH em dietas com suplementação de Cu, seja pelo aumento de atividade da GSH-Px ou mesmo pela formação do complexo Cu-GSH. Allen et al., 1988 e Chao e Allen, 1992 relataram que deficiência de Cu aumentou a GSH hepática e as concentrações de GSSG permaneceram inalteradas. Entretanto, a relação GSH/GSSG do tecido hepático foi aproximadamente o dobro devido à deficiência de Cu.

4.10 Concentrações de triglicérides e colesterol no sangue e músculo

As concentrações médias de triglicérides no plasma e de colesterol total no plasma e músculo *L. dorsi* dos bovinos, em função dos tratamentos e do tempo estão apresentadas na Tabela 18. Os valores referentes à concentração de colesterol no músculo *L. dorsi* em função dos tratamentos, estão apresentados na Figura 32.

Tabela 18. Concentrações médias de triglicérides e colesterol total no plasma, em mg/dl e de colesterol (mg/100g de carne) no músculo *L. dorsi* de bovinos Nelore recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu, durante o confinamento experimental.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	C	I10	I40	O10	O40		A	B	C	D
Triglicérides (mg/dl)	45,94 ^a	39,44 ^a	38,89 ^a	41,45 ^a	35,37 ^a	2,54	0,97	0,59	0,79	0,26
Colest. plasma (mg/dl)	227,2 ^a	228,1 ^a	233,9 ^a	236,6 ^a	220,9 ^a	11,79	0,91	0,35	0,87	0,71
Colesterol músculo (mg/100g carne)	105,4 ^a	98,5 ^b	94,1 ^c	100,5 ^b	97,8 ^b	1,12	<0,01	0,02	0,01	0,10
	Tempo (Dias)				Efeito de Tempo					
	0	28	56	84						
Triglicérides (mg/dl)	34,9±1,63	36,9±3,24	42,3±2,78	46,8±3,29	Q <0,01					
Colest. plasma (mg/dl)	187,3±4,52	236,6±6,20	245,4±9,15	248,0±7,24	Q <0,01					

C = Dieta controle (sem suplementação de cobre); I10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; I40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre; O10 = Suplementação de 10mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre; O40 = Suplementação de 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato de cobre.

EPM = erro padrão da média;

A = controle x demais; B = Inorg x Org; C = I10 x I40; D = O10 x O40;

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si ($p < 0,05$), pela análise de contrastes;

Q = efeito quadrático;

Não houve efeito da suplementação de cobre sobre as concentrações médias de triglicérides e colesterol plasmáticos ($p > 0,05$). Entretanto a suplementação com O40 reduziu a concentração de triglicérides em 23% em relação ao tratamento controle. Provavelmente não houve efeito significativo em função da grande variação dos dados. Com relação ao tempo houve efeito quadrático tanto para a variável triglicérides ($y = 34,6483 + 0,8407x - 0,01477x^2$) como para o colesterol ($y = 188,36 + 2,1977x - 0,01810x^2$), com aumento de suas concentrações no plasma.

Alguns autores encontraram queda nos níveis de triglicerídeos e/ou colesterol sanguíneos, com a suplementação de Cu, em diferentes espécies animais (Alarcon-Corredor et al., 2000; Armstrong et al., 2001; Engle e Spears, 2000b; Engle et al., 2000b), diferindo dos resultados encontrados no presente experimento. Entretanto, Engle e Spears (2001) trabalhando com bovinos da raça Simental e suplementação

com diferentes níveis de Cu, não encontram alterações no colesterol plasmático e muscular com a suplementação de Cu.

No trabalho de Engle et al. (2000a), com bovinos em crescimento e terminação a suplementação de Cu não alterou os níveis de colesterol sérico durante a fase de crescimento, porém durante a fase de terminação, o colesterol sérico não foi afetado até o 56º dia, entretanto, diminuiu nos bovinos suplementados com cobre nos dias 84, 96 e 116, em relação ao grupo controle. No presente estudo, a suplementação com Cu foi realizada somente durante 84 dias, portanto essa pode ser uma explicação para a ausência de efeito significativo. Del Claro (2007), em experimento com bovinos, não encontrou alteração na concentração de colesterol sanguíneo com a suplementação de Cu, como no presente trabalho. Segundo o autor, o colesterol total apresenta-se composto em grande parte por LDL, que apresenta meia-vida longa, ou seja, o efeito de diminuição de síntese poderia ter acontecido já no 84º dia, entretanto, ainda não evidenciado em função da meia vida longa do LDL.

Para o músculo *L. dorsi*, os tratamentos com suplementação de cobre, independente da fonte ou nível, proporcionaram redução da concentração de colesterol ($p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. O tratamento com 40mg/kg de Cu na forma inorgânica apresentou menor concentração de colesterol muscular que os demais tratamentos ($p < 0,05$). Com relação ao tratamento controle, a suplementação com 40mg/kg de Cu reduziu a concentração de colesterol muscular em aproximadamente 11%.

Figura 32. Concentração média de colesterol, em mg/100g de carne, no músculo *L. dorsi* de bovinos recebendo dieta controle (sem suplementação de Cu) ou suplementados com 10 ou 40mg de Cu/kg de MS, na forma inorgânica ou orgânica.

Muitos experimentos têm sugerido que a suplementação de cobre pode afetar o metabolismo de colesterol tanto em ruminantes como em não ruminantes. De modo semelhante ao presente estudo, Engle e Spears (2000b) e Engle et al. (2000a), em trabalho com bovinos e adição de diferentes níveis de Cu na dieta, observaram que houve redução da concentração de colesterol no músculo *L. dorsi* com a suplementação. Com relação aos não ruminantes, Konjufca, et al. (1997) encontraram redução nos níveis de colesterol do peito e coxa de frangos de corte suplementados com Cu na forma orgânica e inorgânica. Bakalli et al. (1995), Pesti e Bakalli (1996) e Skrivan et al. (2002) observaram que a redução do colesterol muscular em frangos foi o principal efeito da suplementação com Cu. Segundo Klevay (1973), ratos alimentados com dietas deficientes em Cu apresentaram hipercolesterolemia.

Kim et al. (1992) verificaram, em ratos, que a deficiência de Cu causa hipercolesteromia pelo aumento hepático de GSH com aumento da atividade da HMG-CoA redutase. Segundo esses autores, em animais Cu-deficientes que tiveram aumento da GSH hepática, a inibição desse peptídeo por um inibidor específico (BSO), reduziu atividade da HMG-CoA redutase, diminuindo a síntese de colesterol.

Estudos recentes têm mostrado que a relação tiol/dissulfeto das células pode influenciar a atividade de várias enzimas chaves que requerem grupos tiol para a atividade (GILBERT, 1984; GILBERT, 1990). Uma dessas enzimas é a HMG-CoA redutase, cuja atividade é considerada a etapa de controle da taxa da síntese de colesterol (VALSALA e KURUP, 1987; YOUNT et al., 1990; MURRAY et al., 1998). Estudos in vitro demonstraram que essa enzima requer tiols para sua atividade, sendo a GSH o principal deles (ROITELMAN e SHECHTER, 1984), e que pequenas concentrações de dissulfetos, como o GSSG, diminuem a atividade dessa enzima (ZIEGLER, 1985; GILBERT, 1990). Assim, a hipótese mais aceita seria que o Cu hepático regule indiretamente a biossíntese do colesterol pelo decréscimo da forma reduzida da glutathiona (GSH) e aumento da forma oxidada (GSSG). A GSH atuaria estimulando a produção da HMG-CoA, portanto, se a suplementação com Cu diminui a concentração celular da GSH, então diminui a síntese de colesterol (BAKALLI et al. 1995).

No presente experimento houve redução da GSH e da relação GSH/GSSG com a suplementação com cobre, portanto, pode ter ocorrido queda na atividade da enzima HMG-CoA redutase. A atividade dessa enzima não foi mensurada, entretanto, a relação citada entre ela e o metabolismo da GSH, pode explicar os resultados obtidos, ou seja, a diminuição dos níveis de colesterol no músculo *L. dorsi* nos tratamentos com Cu.

5. CONCLUSÃO

Em geral, a suplementação de cobre alterou o “status” de Cu dos animais, com maior acúmulo desse mineral no fígado daqueles que receberam 40mg de Cu/kg de MS na forma de proteinato, mostrando, portanto, ser mais biodisponível. Com isso há menor eliminação fecal e, conseqüentemente, redução da contaminação do meio ambiente, que tem sido uma preocupação cada vez maior.

Houve influência da suplementação de cobre no metabolismo de lipídios de bovinos Nelore, com aumento dos ácidos graxos insaturados em detrimento dos saturados e redução dos níveis de colesterol no músculo *L. dorsi*, devido alteração da relação GSH/GSSG. Também houve redução da oxidação lipídica da carne, provavelmente em função de aumento da atividade da SOD, o que poderia aumentar a vida de prateleira da mesma. Além disso, uma carne mais saudável reduz os riscos de doenças cardiovasculares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI**, São Paulo, v.26, p.141-164, 1993.

ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. **Food Chemistry**. v.24, n10/11, p.1021-1030, 1986.

AHOLA, J.K.; BAKER, D.S.; BURNS, P.D. et al. Effect of copper, zinc and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status and performance in grazing beef cattle over two-year period. **J. Anim. Sci.**, 82:2365, 2004.

ALARCON-CORREDOR, O. M.; CARNEVALÍ DE TATA, E.; REINOSA-FULLER, J.; et al. Modificaciones de los lípidos séricos de ratas suplementadas con cobre por vía oral. **Archivos Latino americanos de Nutricion**, v.50, n.3, p.249-256. 2000.

ALLEN, K.G.D.; ARTHUR, J.A.; MORRICE, P.C.; et al. Copper deficiency and tissue glutathione in the rat. **Proc. Soc. Expil. Biol. Med.**, v.187, p.38-43. 1988.

AMMERMAN, C.B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals**. Academic Press, San Diego, 1995. 441p.

ANDRIGUETTO, J.M. et al. **Os minerais na nutrição animal**. Nutrição animal. 5ª ed. Nobel, São Paulo, v.1, p.173-255, 1981.

AOYAGI, S.; BAKER, D.H. Nutritional evaluation of copper-lysine and zinc lysine complexes for chicks. **Poult. Sci.**, v.72, p.165. 1993.

AOYAGI, S.; BAKER, D.H. Copper amino acid complexes are partially protected against inhibitory effects of L-cysteine and L-ascorbate. **J. Nutr.**, v.124, p.388-396. 1994.

APGAR, G. A.; KORNEGAY, E. T.; LINDEMANN, M. D.; et al. Evaluation of copper sulfate and a copper lysine complex as growth promotants for weanling swine. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.2640. 1995.

APGAR, G.A.; KORNEGAY, E.T. Mineral balance of finishing pigs fed copper sulfate or a copper-lysine complex at growth-stimulating levels. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.1594-1600. 1996.

ARAÚJO, J. M. A., **Consequências biológicas da Oxidação de Lipídios**. In: Química de Alimentos: Teoria e Prática., Ed. UFV, Viçosa, 1995.

ARMSTRONG, T.A.; SPEARS, J.W.; ENGLE, T.E., SEE, M. T. **Nutrition Research**, v.21, p.1299-1308. 2001.

ASHMEAD, H.D. **Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metal salts.** In: The roles of amino acid quelates in animal nutrition. Ed. H.D., New Jersey, pp.306-319, 1993.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 16 ed. Arlington: AOAC, 1996. 1298p.

BALEVI, T.; COSKUN, B. Effects of dietary copper on production and egg cholesterol content in laying hens. **British Poultry Science.**, v.45, n.4, p.530-534. 2004.

BAKALLI, R. I.; PESTI, G. M.; RAGLAND, W. L.; KONJUFCA, V. Dietary copper in excess of nutritional requirements reduces plasma and breast muscle cholesterol of chickens. **Poult. Sci.**, v.74, p.360-365.1995.

BAKER, D. H., ODLE, J.; FUNK, M. A.; WIELAND, T.M. Bioavailability of copper in cupric oxide, cuprous oxide, and in a copper-lysine complex. **Poult. Sci.**, v.70, p.177. 1991.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BENGOUMI, M. et al. Comparative effects of selenium supplementation on the plasma selenium concentration and erythrocyte glutathione peroxidase activity in cattle and camels. **Journal of Animal Science**, v.67, p.461-466, 1998.

BERCHIELLI, T. T., PIRES, A.V, OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes.** Jaboticabal: FUNEP, 2006. v. 1. 583 p.

BOILA, R.J.; GOLFMAN, L.S. Effects of molybdenum and sulfur on digestion by steers. **J. Anim. Sci.**, v.69, p.1626-1635. 1991.

BOZKAYA, L.A. et al. Effects of Se. Cu and Se plus vitamin E deficiency on the activities of CuZnSOD, GSH-Px. CAT and LPO levels in Chicken Erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v.19. n. 3, p.153-157, 2001.

BRADLEY, C. H. Copper poisoning in a dairy herd fed a mineral supplement. **Can. Vet. J.** v.34, p.287-292. 1993.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G.. Métodos de análises de alimentos. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135 p.

CAVA, R.; VENTANAS, J.; TEJEDA, J.B.; RUIZ, J.; ANTEQUERA, T. Effect of free-range rearing and α -tocopherol and copper supplementation on fatty acid profiles and susceptibility to lipid oxidation of fresh meat from Iberian pigs. **Food Chemistry.**, v.68, p-51-59. 1999.

CHAO, P.Y.; ALLEN, K.G.D. Glutathione production in copper deficient isolated rat hepatocytes. **Free Radical Biol. &Med.**, v.12, p.145-150. 1992.

CHAPMAN, H. L., JR., D. H. COX, C. H. HAINES and G. K. DAVIS. 1983. Evaluation of the liver biopsy technique for mineral nutrition studies with beef cattle. **J. Anim. Sci.**, 22:733.

CHARMLEY, L. L.; H. W. SYMONDS. A comparison of the ability of cattle and pigs to clear excess copper from the plasma and excrete it in bile. **Commonwealth Agricultural Bureaux**, Slough, U.K. p.339-346. 1985.

CLAYPOOL, D.A.; ADAMS, F.W.; PENDELL, N.A.; HARTMANN Jr.; BONE, J.F. Relationship between the level of copper in the blood plasma and liver of cattle. **J. Anim. Sci.**, v.41, p.911-914. 1975.

COFFEY, R. D.; CROMWELL, G. L.; MONEGUE, H.J. Efficacy of a copper-lysine complex as a growth promotant for weanling pigs. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.2880. 1994.

COMBS G.F.; COMBS, S.B. **Absorption and transfer**. In: The role of Selenium in Nutrition, Academic Press, New York. 1986.

CORAH, L.H.; IVES, S. The effects of essential trace minerals on reproduction in beef cattle. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v.7, p.41-57, 1991.

COUZY, F.; KEEN, C.; GERSHWIN, M.E.; et al. Nutritional implications of the interactions between minerals. **Progress in food and nutrition science**, v.17, p.65-87. 1993.

CURI, R., POMPÉIA, C., MIYASAKA, C. K., PROCÓPIO, J. **Entendendo a Gordura - Os Ácidos Graxos**. 1.ed, Ed. Manole, Barueri, 2002.

DAVIS, G.K., MERTZ, W. **Copper trace elements in human and animal nutrition**. 5 ed. Academic Press Inc., San Diego, LA. 1987.

DEL CLARO, G.R. **Influência da suplementação de cobre e selênio no metabolismo de lipídios em bovinos**. 2007. 88f. Tese (doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

DICK, A.T.; DEWEY, D.W.; GAWTHORNE, J.M. Thiomolibdates and the copper-molybdenum-sulfur interaction in ruminant nutrition. **J. Agric. Sci.**, v.85, p.567-574. 1975.

DOVE, C.R.; EWAN, R.C. Effect of vitamin E and copper on the vitamin E status and performance of growing pigs. **J. Agric. Sci.**, v.69, p. 2516-2523. 1991.

DU, Z.; HEMKEN, R.W.; JACKSON, J.A.; TRAMMELL, D.S. Utilization of copper in copper proteinate, copper lysine, and cupric sulfate using the rat as an experimental model. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.1657-1663. 1996.

DUCKETT, S.K.; WAGNER, D.G.; YATES, L.D., et al. Effects of time on feed on beef nutrient composition. **Journal Animal Science**, v.71, p.2079-88, 1993.

ENGEL, R.W.; HARDISON, W.A.; MILLER, R.F.; et al. Effect of copper intake on concentration in body tissue and on growth, reproduction and production in dairy cattle. **J. Anim. Sci**, v.23, p.1160-1164. 1964.

ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. **J. Anim. Sci.**, v.78, p.2446-2451. 2000a.

ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance and ruminal fermentation in finishing steers. **J. Anim. Sci**, v.78, p.2452-2458. 2000b.

ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W. Performance, carcass characteristics and lipid metabolism in growing and finishing Simmental steers fed varying concentration of copper. **J. Anim. Sci**, v.79, p.2920-2925. 2001.

ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W. Effect of finishing system (feedlot or pasture), high oil maize, and copper on conjugated linoleic and other fatty acids in muscle of finishing steers. **Anim. Sci**, v.78, p.261-269. 2004.

ENGLE, T.E. et al. Performance and lipid and cholesterol metabolism in finishing steers fed varying concentration of copper. **J. Anim. Sci**, v.77, suppl. 1, p.2446-2451, 1999.

ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W.; ARMSTRONG, WRIGHT C.L.; et al. Effects of dietary copper source and concentration on carcass characteristics and lipid and cholesterol metabolism in growing and finishing steers. **J. Anim. Sci**, v.78, 1053-1059. 2000a.

ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W.; EDENS, F.W. Dietary copper effects on lipid metabolism and circulating catecholamine concentration in finishing steers. **J. Anim. Sci**, v.78, p.2737-2744. 2000b.

ENGLE, T.E. et al. Effects of dietary soybean oil and dietary copper on ruminal and tissue lipid metabolism in finishing steers. **J. Anim. Sci**. v.78, p.2713-2721, 2000c.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; et al. **The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL**. Free Rad Biol Med 13, 1992.

FARFAN, J.A. Alimentos que influenciam os níveis de colesterol no organismo. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos. Seminário "Colesterol": análise, ocorrência, redução em alimentos e implicações na saúde. Campinas: ITAL, **Anais...** 1996. p.35-44.

FERNANDEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chemistry. V.59, n.3, p.345-353, 1997.

FORSBERG, C.,W. Effects on heavy metals and other trace elements on the fermentative activity of the rumen microflora and growth of functionally important bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v.24, p.298-306, 1978.

FRANCE, J.; SIDDON, R.C.; DHANONA, M.S. Adaptation of compartmental schemes of interpreting isotope dilution data on volatile fatty acid metabolism in the rumen to the non-steady state and for single-dose injection. **J. Theor. Biol.** v.153, p.247-254, 1991.

FREEDMAN, J.H.; CIRIOLO, M.R.; PEISACH, J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 5598-5605. 1989.

GILBERT, H. F. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. **Methods Enzymol.**, v.107, p.330-351. 1984.

GILBERT, H. F. Molecular and cellular aspects of thioldisulfide exchange. **Adv. Enzymol.**, v.63, p.69-172. 1990.

GOONERATNE, S.R.; CHRISTENSEN, D.A. A survey of maternal copper status and foetal tissue copper concentration in bovine. **Can. J. Ani. Sci.**, v.69, p.141-150. 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. Oxford University Press, Nova York, 1999.

HOLBEN, D. H. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. **J. Am. Diet Assoc.**, v.99, p.836-843, 1999.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v.31, n.5, S1-S4, 2008.

JACKSON, N.; STEVENSON, M.H.; KIRKPATRICK, G.M.C. Effects of the protracted feeding of copper sulphate supplemented diets to laying, domestic fowl on egg production and on specific tissues, with special reference to mineral content. **British Journal of Nutrition**, v.42, p.253-266. 1979.

JEREMIAH, L. E. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. **Food Research International**, v.34, p.749-772. 2001.

JIMENEZ, I; SPEISKY, H. Effects of copper ions on the free radical-scavenging properties of reduced glutathione: implications of a complex formation. **J Trace Elem Med Biol.**, v.14, p.161-167, 2000.

JONES, D.G.; SUTTLE, N.F. Some effects of copper deficiency on leucocytes function in sheep and cattle. **Research in Veterinary Science**, v.31, p.151-156. 1981.

JONSON, L.R.; ENGLE, T.E. The effects of copper source and concentration on lipid metabolism in growing and finishing Angus steers. **Asian-Australasian Journal of Anim. Sci.**, v.18, n.8, p.1131-1136. 2003.

GOONERATNE, S.R.; BUCKLEY, W.T.; CHRISTENSEN, D.A. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. **Canadian Journal Animal Science**, v.69, p.819-845, 1989.

KEGLEY, E. B.; SPEARS, J.W. Bioavailability of feed-grade copper sources (oxide, sulfate, or lysine) in growing cattle. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.2728-2734. 1994.

KIM, S.; CHAO, P. Y.; ALLEN, G. D. Inhibition of elevated hepatic glutathione abolishes copper deficiency cholesterolemia. **FASEB J.**, v.6. p.2467-2471. 1992.

KINCAID, R. L.; BLAUWIEKEL, R. M.; CRONRATH, J. D. Supplementation of copper as copper sulfate or copper proteinate for growing calves fed forages containing molybdenum. **J. Dairy Sci.**, v.69, p.160-163. 1986.

KINCAID, R.L.; WHITE, C.L. The effects of ammonium tetrathiomolybdate intake on tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs. **J. Anim. Sci.**, v.66, p.3252-3258. 1988.

KIRCHGEISSNER, M.; GRASSMAN, E. The dynamics of copper absorption. In: C. F. MILLS (ed.) **Trace Element Metabolism in Animals**. Livingstone, Edinburgh, U.K., p.277-286. 1970.

KLEVAY, L.M. Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper ingested. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.26, p.1060-1068. 1973.

KONJUFCA V.H.; PESTI, G.M.; BAKALLI, R.I. Modulation of cholesterol levels in broiler meat by garlic and copper. **Poult. Sci.**, v.76, p.1264-1271, 1997.

LANGLANDS, J.P.; BOWLES, J.E. DONALD, G.E., et al. Copper status of sheep grazing pastures fertilized with sulfur and molybdenum. **Aust. J. Agric. Res.**, v.32, p.479-486, 1981.

LANGLANDS, J.P.; BOWLES, J.E.; DONALD, G.E.; SMITH, A.J. Deposition of copper, manganese, selenium and zinc in Merino sheep. **Aust. J. Agric. Res.**, v.35, p.701-701. 1984.

LAURIDSEN, C.; NIELSEN, J.H.; HENCKEL, P. et al. Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E, and copper **J. Anim. Sci.**, v.77., p.105-115. 1999a.

LAURIDSEN, C.; HOJSGAARD, S.; SORENSEN, M.T. Influence of rapeseed oil, vitamin E and copper on performance and antioxidative and oxidative status of pigs. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.906-916. 1999b.

LEE, J.; MASTERS, D.G.; WHITE, C.L.; et al. Research about element trace in animals. **Aust. J. Agric. Res.**, v.50, p.1341-1364. 1999.

LILLEY, C.W.; HAMAR, D.W.; GERLACH, M.; et al. Linking copper and bacteria with abomasal ulcers in beef calves. **Vet. Med.** v.80, p.85-88. 1985.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: A. Luchiari Filho, 2000. 134p.

LUZY, S.C.; SPEISKY. Liver copper storage and transport during development: Implications for cytotoxicity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.63, p.812-820. 1996.

MASON, J. The putative role of thiomolybdates in the pathogenesis of Mo-induced hypocupraemia and molybdenosis: some recent developments. **Irish Vet. J.** v.36, p.164-168. 1982.

MASON, J. The biochemical pathogenesis of molybdenum-induced copper deficiency syndromes in ruminants: Towards the final chapter. **Irish Vet. J.**, v.43, p.18 – 21, 1990.

McDOWELL, L.R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. Academic Press, New York, 1992.

MILLS, C.F. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. **J. Anim. Sci.**, v.65, p.1702-1711. 1987.

MILTIMORE, J.E., MASON, J.L. Copper to molybdenum ratio and molybdenum and copper concentration in ruminant feeds. **Canadian Journal Animal Science**, v.51, p.193 – 200, 1971.

MINSON, D.J. **Forage in Ruminant Nutrition**. Academic Press, Inc., San Diego, CA. 1990.

MORAES, S.S.; SILVA, G.N.; DOBEREINER, J. Microelementos minerais e a “cara inchada” dos bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** v.14 p.25-33. 1994.

MUEHLENBEIN, E. L.; BRINK, D. R.; DEUTSCHER, G. H.; et al. Effects of inorganic and organic copper supplemented to first-calf cows on cow reproduction and calf health and performance. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.1650-1659. 2001.

MURRAY, R.K; GRANNER D.K; MAYES P.A; RODWELL V.W. **Harper:Bioquímica**. 8.ed. Atheneu, São Paulo, 1998.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Mineral tolerance of domestic animal**. National Academy Press, Washington, 1980.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient requirements of beef cattle**. National Academy Press, Washington, 1984.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient requirements of sheep**. National Academy Press, Washington, 1985.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Nutrient requirements of beef cattle**. National Academy Press, 7^a ed., Washington, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. National Academy Press, Washington. 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, **Mineral tolerance of animals**. National Academy Press, Washington, 2005.

NOCKELS, C. F.; DEBONIS, J.; TORRENT, J. Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources. **J. Anim. Sci.**, v.71, p.2539-2545. 1993.

NURNBERG, K., WEGNER, J. ENDER, K. Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. **Liv. Produc. Sci.**, v.56, p.145-156, 1998.

O'DELL, B.L.; SUNDE, R.A. **Handbook of nutritionally essential mineral elements**. Marcel Dekker, New York, 1997. 692p.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathion peroxidase. **J. Lab. Med.**, v.70, p.158-165. 1987.

PAYNTER, D.I.; MOIR, R.J.; UNDERWOOD, E.J. Change in activity of the Cu-Zn-superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with changes in dietary copper. **Journal of Nutrition**, v.109, p.1570. 1979.

PEARCE J.; JACKSON, N.; STEVENSON, M.H. The effects of dietary intake and of dietary concentration of copper sulphate on the laying domestic fowl: effects on some aspects of lipid, carbohydrate and amino acid metabolism. **British Poultry Science**, v.24, p.337-348. 1983.

PEARSON, A.M; GRAY.I.J.; WOLZAR. A.M.; et al. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technology**. V.37, n.121-130, 1983.

PEREZ, J.R.O.; BRESSAN, M.C.; BRAGAGNOLO, N. et al. Efeito do peso ao abate de cordeiros Santa Inês e bergamácia sobre o perfil de ácidos graxos, colesterol e propriedades químicas. **Ciênci. Tecnol. Aliment.**, v.22, n.1, p.11-18, 2002.

PESTI, M. G.; BAKALLI, R. L. Studies on feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. **Poult. Sci.**, v.75, p.1086-1091.1996.

PILATI, C.; LOMBARDO DE BARROS, S.C.; GIUDICE, J.C. Intoxicação crônica por cobre em ovinos. **A Hora Veterinária**, ano 9, n.5, p.31-34. 1990.

POTT, E.B.; HENRY, P.R.; ZANETTI, M.A., et al. Effects of high dietary molybdenum concentration and duration of feeding time on molybdenum and copper metabolism in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, v.79, p.93-105, 1999.

PROHASKA, J.R.; DOWING, S.W.; LUKASEWYCZ, O.A. Chronic dietary copper deficiency alters biochemical and morphological properties of mouse lymphoid tissue. **Journal of Nutrition**, v.113, p.1583. 1983.

PROHASKA, J.R. Biochemical changes in copper deficiency. **Journal of Nutrition Biochemistry**, Stoneham, v.1, n.9, p.452-461, 1990.

RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.J.; HOUSTON, D.M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. 1 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 332–338, 2002.

REY, A.I.; LOPEZ-BOTE, C.J. Effect of dietary copper and vitamin E supplementation, and extensive feeding with acorn and grass on longissimus muscle composition and susceptibility to oxidation in Iberian pigs. **J. Anim. Physiol. a Anim. Nutr.**, v.85, p.281-292. 2001.

REY, A.I.; LOPEZ-BOTE, C.J.; BUCKLEY, J.D. Effect of feed on cholesterol concentration and oxidation products development of longissimus dorsi muscle from Iberian pigs. **Irish journal of agricultural and food research**, v.43, n.1, p.69-83. 2004.

RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, J.A.; GUESTA, S. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras**, v.9, p.51-54. 1989.

RIET-CORREA, F.; BONDAN, E.E.; MÉNDEZ, M.C.; et al. Efeito da suplementação com cobre e doenças associadas à carência de cobre em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras**, v.13, p.45-49. 1993.

ROITELMAN, J.; SHECHTER, I. Regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. **J Biol. Chem.**, v.259, p.870-877. 1984.

ROSMINI, M. R; PERLO, F.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. et al. TBA test by extractive method applied to "Paté". **Meat Science**, v.42 n.1, p.103-110, 1996.

SALDANHA, T.; MAZALLI, M.R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.24, n.1, p.109-113, 2004.

SALYER, G.B.; GALYEAN, M.L.; DEFOOR, P.J. et al. Effects of copper and zinc on performance and humoral immune response of newly received, lightweight beef heifers. **J. Anim. Sci.** 82:2467-2473. 2004

SAS Institute Inc. SAS Stat Guide, Version 6.12 Edition. Cary, NC: **SAS Institute Inc.**, 1996.

SANKOH, F.A-R.; BOILA, R.J. Injectable copper and zinc for grazing yearling steers. **Can. J. Anim. Sci.** 67:1033-1041, 1987.

SCHOSINSKY, K.H.; LEHMANN, H.P.; BEELER, M.F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-Dianisidine Dihydrochloride. **Clin. Chem.**, v.20, n.12, p.1556-1563, 1974.

SENTHILKUMAR, P.; NAGALAKSHMI, D.; RAMANA REDDY, Y. et al. Effect of different level and source of copper supplementation on immune response and copper dependent enzyme activity in lambs. **Tropical Animal Health and Production.**, v.41, n.4, p. 645-653, 2008.

SHARMA, M.C.; JOSHI, C.; PATHAK, N.N.; KAUR, H. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. **Veterinary Science**, 2005.

SILVA, S.L. **Milho grão seco, úmido e sais de cálcio de ácidos graxos em dietas para novilhos Nelore em confinamento** : desempenho, características de carcaça e perfil de ácidos graxos. 2005. 73f. Tese (doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

SKRIVAN, M.; SEVCIKOVA, S.; TUMOVA, E.; et al. Effect of copper sulphate supplementatiopnon performance of broiler chickens, cholesterol content and fatty acid profile of meat. **Czech Journal of Animal Science**, v.47, n.7, p.275-280, 2002.

SMITH, E.L., HIL, R.L., LEHMAN, I.R., et. al. **Bioquímica dos mamíferos**. Rio de Janeiro: 7^oed. Guanabara Koogan. 1988. 620p.

SOLI, N.E. Chronic copper poisoning in sheep. **Nolway veterinary medicine**, v.32, p.75-89, 1980.

SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B.; MULLIS, L. A.; WISE, T.A. Bioavailability of copper from tri-basic copper chloride in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.75(Suppl. 1), p.265 (Abstr.). 1997.

SUTTLE, N.F. Effects of organic and inorganic sulphur on the availability of dietary copper to sheep. **J. Nutr.**, v.32, p.295-302. 1974.

SUTTLE, N.F.; ANGVS, K.W.. Experimental copper deficiency in calves. **Journal of Comparative Pathology**, v.86, p.595-608. 1976.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram 552 amounts of total and oxidized glutathione—applications to mammalian 553 blood and other tissues. **Analytical Biochemistry** 27, 502– 522, 1969.

TODD, J.R. A survey of the copper status of cattle using copper oxidase (ceruloplasmin) activity of blood serum. In: MILLS, C.F. (Ed.), **Trace Elements Metabolism in Animal**. E & S Livingstone, Edinburg, 1970.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; MORAES, S.S. et al. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos - revisão de estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. **Pesq. Vet. Bras.**, v.19, p.47-62, 1999.

UNDERWOOD, E.J. **Los minerales en la alimentación del ganado**. Zaragoza, Acríbia, 1969. 320p.

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

UNDERWOOD, E.J. **The mineral nutrition of livestock**, 2nd Ed. Commonwealth Agriculture Bureaux, Slough, UK. 1981.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N. **The mineral nutrition of livestock**. 3 rd edition. CAB, New York, 1999. 624p.

URIU-ADAMS, J.Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v.26, p.268-298, 2005.

VALSALA, P.; KURUP, P. A. Investigations on the mechanism of hypercholesterolemia observed in copper deficiency in rats. **J. Biosci.**, v12, p.137-142. 1987.

VAN HEUGTEN, E.; COFFEY, M.T. Efficacy of a copper-lysine chelate as growth promotant in weanling swine. **J. Anim. Sci.**, v.70(Suppl. 1), p.18(Abstr.). 1992.

VAN SOEST, P.J. **Nutricional ecology of the Ruminant**. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

WARD, J. D.; SPEARS, J.W.; KEGLEY, E.B. Effect of copper level and source (copper lysine vs. CuSO₄) on copper status, performance, and immune response in growing steers fed diets with or without supplemental molybdenum and sulfur. **J. Anim. Sci.** 71:2748–2755.1993

WARD, J. D.; SPEARS, J. W.; KEGLEY, E.B. Bioavailability of copper proteinate and copper carbonate relative to copper sulfate in cattle. **J. Dairy. Sci.**, v.79, p.127-132. 1996.

WARD, J.D.; SPEARS, Long-Term effects of Consumption of low-Copper Diets With or Without Supplemental Molybdenum on Copper Status, Performance, and Carcass Characteristics of Cattle. **J. Anim. Sci.**, v.75, p.3057-3065, 1997.

WITTENBERG, K. M.; BOILA, R. J.; SHARIFF, M.A. Comparison of copper sulfate and copper proteinate as copper sources for copper-depleted steers fed high molybdenum diets. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.895. 1990.

WOOD, J.D.; RICHARDSON, G.R.; NUTE, G.R.; et al. Effect of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, v.66, p.21-32, 2003.

XIN, Z.; WATERMAN, D.F.; HEINKEN, R.W.; HARMON, R.J. Effect of copper status on neutrophil function, superoxide dismutase and copper distribution in steer. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3078-3085. 1991.

XIN, Z.; WATERMAN, D.F.; HEMKEN, R.W.; HARMON, R.J. Copper status and requirement during the dry period and early lactation in multiparous Holstein cows. **J. Dairy Sci**, v.76, p.2711-2716. 1993.

XIONG, YOULING, L. Protein oxidation and implications for muscle food quality. **Antioxidants in Muscle Foods**, p.85-111. 2000.

YOUNT, N. Y.; McNAMARA, J.; AL-OTHMAN, A. A. et al. The effect of copper deficiency on rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. **J. Nutri. Biochem.**, v.1, p.21-27.1990.

ZAKRYS, P.I., HOGAN, S. A., O'SULLIVAN, M.G., et al. Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. **Meat Science**, v.79, p.648-655. 2008.

ZHOU, W.; KORNEGAY, E. T.; VAN LARR, H.; et al. The role of feed consumption and feed efficiency in copper-stimulated growth. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.2385. 1994.

ZIEGLER, D. M. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. **Anna. Rev. Biochem.**, v.54, p.305-329. 1985.