

CAROLINA YUMI CASCÃO YOSHIKAWA

**Avaliação de fontes de cobre para ovinos com ensaio de
biodisponibilidade**

Pirassununga

2014

CAROLINA YUMI CASCÃO YOSHIKAWA

**Avaliação de fontes de cobre para ovinos com ensaio de
biodisponibilidade**

(VERSÃO CORRIGIDA)

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 Antônio Zanetti

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos da Universidade de São Paulo

Yoshikawa, Carolina Yumi Cascão

Y65a Avaliação de fontes de cobre para ovinos em ensaios
de biodisponibilidade / Carolina Yumi Cascão Yoshikawa.

-- Pirassununga, 2014.

60 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Zanetti.

1. Ceruloplasmina 2. Mineral 3. Suplementação
4. Superóxido dismutase. I. Título.

À minha família:

*Meus pais **Celso Iwao Yoshikawa** e **Maria Angélica G. Cascão Yoshikawa**,
pelo sucesso e dedicação incondicional na formação dos filhos e apoio em todos os
momentos da minha vida;*

*Meus irmãos **Vivian Akemi Cascão Yoshikawa** e **Celso André I. Cascão
Yoshikawa**, pela união, cumplicidade e amizade;*

Dedico.

Agradecimentos

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela minha formação acadêmica e por possibilitar a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), fundação do Ministério da Educação (MEC) pelo apoio financeiro à pesquisa.

Aos meus pais por proporcionarem incondicional apoio, incentivo e educação. E aos meus irmãos Vivian e André pela companhia e amizade. E à toda minha família pelo apoio e união.

Ao prof. Dr. Marcus Antônio Zanetti pela orientação, dedicação e ensinamentos.

Ao prof. Júlio Balieiro pelo auxílio para com as análises estatísticas.

Ao médico veterinário Pacheco pela realização das cirurgias de biópsia nos animais do experimento. E também aos médicos veterinários Fernando Schalch e Bira, que também acompanharam a saúde dos animais.

Aos profissionais do laboratório do CEPTOX da FMVZ Paulo César e Éster Raspantini e funcionários pelo auxílio para com a realização das análises bioquímicas.

À profa. Mariza Pires de Melo e Silvana Piccoli Pugine pelo auxílio e por proporcionar a realização das análises no laboratório de química biológica.

À Roberta Santana e José Aparecido da Cunha do laboratório de minerais pela realização das análises de minerais.

À Roseli Lacerda e Rosilda (Laboratório de análise de alimentos) e Rafael Corradini (Laboratório de proteínas) pelo auxílio para com as análises bromatológicas.

A todos os professores da FZEA que contribuem para o crescimento e excelência desta instituição.

Aos funcionários da FZEA e da PCAPS pela dedicação no trabalho que executam.

Aos amigos por estarem sempre presentes em meu caminhar, em especial às amigas Débora e Silvinha.

À Cármen Garrine pela amizade e ajuda fundamental para com o experimento.

Ao Fernando Garcia pelo auxílio para com o manejo e abate dos animais, bem como no reparo das instalações.

Aos amigos companheiros da equipe de pesquisa Janaína, Lísia, Arlindo, Gabriela e estagiários pelo auxílio no laboratório, para com o experimento e na elaboração da escrita da tese.

A todos os amigos da FZEA, do vôlei, e às crianças, em especial Kiemy, Stivelan, Camila e Mateus por fazerem os meus dias mais alegres.

A todos os que me ajudaram de alguma forma e contribuíram para a realização deste trabalho, mas que não foram citados por falha de minha memória.

RESUMO

YOSHIKAWA, C. Y. C. **Avaliação de fontes de cobre para ovinos com ensaio de biodisponibilidade.** 2014. 54 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O objetivo do estudo foi estimar a biodisponibilidade de duas fontes de cobre: orgânica (cobre metionina) e inorgânica (sulfato de cobre) na dieta de cordeiros. O experimento foi conduzido na FZEA USP de Pirassununga utilizando 40 cordeiros da raça Merino X Texel, que foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, e submetidos a cinco tratamentos, totalizando oito animais por tratamento: Tratamento 0: Dieta controle sem adição de Cu; Tratamento 1: 10 mg de Cu/Kg de MS na forma de sulfato de Cu; Tratamento 2: 30g de Cu/Kg de MS na forma de sulfato de Cu; Tratamento 3: 10 mg de cu/kg de MS na forma de cobre metionina; Tratamento 4: 30 mg de cu/kg de MS na forma de cobre metionina. Foram feitas biópsias do fígado dos animais no tempo zero para análise de cobre e colhidas amostras de sangue nos dias 0, 28, 56 e 84 dias para determinação de Cu sérico, atividade de ceruloplasmina e enzimas de função hepática. Ao final do experimento, os animais foram abatidos para colheita de amostras de fígado, músculo e rim, para determinação dos teores de Cu e da enzima superóxido dismutase (SOD). Nos últimos dez dias do experimento foi realizado um balanço metabólico de cobre. A biodisponibilidade foi calculada pela técnica “slope ratio”, utilizando como parâmetros a concentração de cobre no fígado. Não houve diferença ($P>0,05$) no desempenho dos animais (peso vivo e ganho de peso) entre os tratamentos. A concentração sérica de AST e ALT permaneceu abaixo dos níveis de intoxicação em todos os tratamentos, durante todo o período. A atividade da ceruloplasmina não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). O teor de cobre no soro, na biópsia do fígado e no músculo não foi diferente ($P>0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, a concentração do mineral no fígado dos animais suplementados (284,28 mg/kg) foi maior ($P<0,05$), quando comparados ao grupo controle (168,01 mg/kg), assim como

o Cu-met 30 mg/kg (341,29 mg/kg) foi superior ($P < 0,05$) ao de 10mg/kg MS (263,02 mg/kg). A atividade da SOD nos animais suplementados ($\mu\text{mol/mg prot}$) foi superior à do grupo controle. Nos rins o teor de cobre foi superior nos animais que receberam 30mg/kg de MS de Cu-met (6,65 mg/kg) em relação aos que receberam 10 mg/kg de MS da mesma fonte (3,86 mg/kg). A absorção e a retenção aparentes do cobre foram maiores para a fonte inorgânica, comparada com a orgânica. A biodisponibilidade do cobre determinada pela concentração de cobre no fígado, utilizando a técnica do “slope ratio”, considerando o CuSO_4 como padrão (100%), apresentou disponibilidade de 150,64% para o Cu-met.

Palavras-chave: ceruloplasmina, mineral, suplementação, superóxido dismutase.

ABSTRACT

YOSHIKAWA, C. Y. C. **Influence of diferente levels and sources of copper supplementation with bioavailability study.** 2014. 54 f. PhD thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The study was conducted to estimate the relative bioavailability of two sources of supplemental copper: organic (copper methionine) and inorganic (copper sulfate) in the diet of lambs, by analyzing the concentration of copper and enzymes in the liver and metabolic balance calculation, using 40 lambs breed Merino X Texel, which was fed three concentrations of copper (basal + two additions) in two sources, which were randomly allotted to five groups, and subjected to five treatments: treatment 0: control (diet without addition of Cu); treatment 1: (diet with 10 mg Cu/Kg DM of CuSO_4); Treatment 2: (diet with 30 g Cu/Kg DM of CuSO_4); Treatment 3: (diet with 10 mg Cu/kg DM of copper methionine; Treatment 4: (diet with 30 mg cu/kg DM of copper methionine). Liver biopsies were made on 0 d. Blood samples were taken via the jugular vein on 0, 28, 56 and 84 d to determine serum Cu and serum ceruloplasmin and liver transaminases (AST, ALT) concentrations. The animals were slaughtered and samples of liver, kidney and muscle were taken for the determination of the levels of Cu and superoxide dismutase activity. In the last ten days of the experiment a metabolic balance of copper was conducted. The bioavailability was calculated by the "slope ratio" technique, using the concentration of copper in the liver as parameter. There was no difference ($P > 0.05$) on animal performance (live weight and weight gain) among treatments. The serum AST and ALT levels remained below poisoning in all treatments during the period. The ceruloplasmin activity did not differ between treatments ($P > 0.05$). The copper content in biopsy, serum and muscle was not different ($P > 0.05$) between treatments. However, the mineral concentration in the liver of animals fed (284.28 mg/kg) was

higher ($P < 0.05$) when compared to the control group (168.01 mg/kg) and 30 Cu - met mg/kg (341.29 mg/kg) was higher ($P < 0.05$) at 10mg/kg MS (263.02 mg/kg). The SOD activity in the supplemented animals (mmol/mg prot) was superior to the control group. Copper in Kidneys was higher in animals that received 30mg/kg MS meth-Cu (6.65mg/kg) compared those receiving 10 mg/kg DM from the same source (3.86 mg/kg). Apparent absorption and retention of copper were higher for inorganic source, compared with the organic. The bioavailability determined by the concentration of copper in the copper liver, using the technique of "slope ratio", considering CuSO₄ as standard (100%) presented availability of 150.64 % for Cu - met.

Keywords: ceruloplasmin, mineral, supplementation, superoxide dismutase.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	O COBRE.....	15
2.1.1	<i>Distribuição de cobre nos tecidos</i>	<i>16</i>
2.1.2	<i>Importância e metabolismo do cobre</i>	<i>17</i>
2.2	EXIGÊNCIAS	18
2.2.1	<i>Deficiência.....</i>	<i>19</i>
2.2.2	<i>Intoxicação</i>	<i>20</i>
2.3	ABSORÇÃO DE COBRE	21
2.4	MINERAIS COMPLEXADOS.....	23
2.5	BIODISPONIBILIDADE E BALANÇO METABÓLICO	26
3	HIPÓTESES.....	27
4	OBJETIVO.....	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1	LOCAL E PERÍODO.....	27
5.2	ANIMAIS	28
5.3	INSTALAÇÕES E MANEJO INICIAL	28
5.4	TRATAMENTOS	29
5.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
5.5.1	<i>Balanço metabólico</i>	<i>31</i>
5.5.2	<i>Abate dos animais.....</i>	<i>32</i>
5.5.3	<i>Biodisponibilidade.....</i>	<i>33</i>
5.6	PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	34
5.6.1	<i>Análise bromatológica.....</i>	<i>34</i>
5.6.2	<i>Biópsia do fígado.....</i>	<i>34</i>
5.6.3	<i>Análise de minerais</i>	<i>35</i>
5.6.4	<i>Atividade da ceruloplasmina</i>	<i>35</i>
5.6.5	<i>Análise das transaminases (AST e ALT).....</i>	<i>35</i>
5.6.6	<i>Superóxido Dismutase (SOD).....</i>	<i>36</i>
5.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

6.1	RESULTADOS DE DESEMPENHO E ENZIMAS HEPÁTICAS	38
6.2	COBRE NO SORO.....	40
6.3	COBRE NO FÍGADO	41
6.4	COBRE NO MÚSCULO.....	43
6.5	COBRE NO RIM	44
6.6	BALANÇO METABÓLICO DE COBRE	44
6.7	CERULOPLASMINA	46
6.8	SUPERÓXIO DISMUTASE (SOD)	47
6.9	BIODISPONIBILIDADE DO COBRE	49
7	CONCLUSÕES.....	51
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição porcentual da ração basal fornecida aos cordeiros	30
Tabela 2 - Composição bromatológica da ração basal, em base seca.	37
Tabela 3 - Peso ao abate, peso de carcaça, rendimento de carcaça, peso vivo e ganho de peso por período (kg) de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.	38
Tabela 4 – Concentração sérica de AST e ALT de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.	40
Tabela 5 - Concentrações médias de cobre (mg/kg) no soro de cordeiros durante o período de tempo nos diferentes dias de coleta (0, 28, 56 e 64 dias).	40
Tabela 6 - Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de fígado de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.....	42
Tabela 7 - Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de músculo (<i>Longissimus</i>) de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.	43
Tabela 8 - Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de tecido renal de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.....	44
Tabela 9 - Quantidade de cobre excretado na urina (mg/kg), retenção aparente de cobre (mg/kg) e porcentagem de cobre retido em função do cobre ingerido (%) de cordeiros suplementados com diferentes níveis e fontes de cobre.	45
Tabela 10 - Concentração média de ceruloplasmina de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.	47

Tabela 11 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína no fígado de ovinos Merino X texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.....48

Lista de figuras

Figura 1- Concentração de cobre no fígado em mg/kg MS para as fontes orgânica e inorgânica com as respectivas equações de regressão.50

1 INTRODUÇÃO

A deficiência e a toxicidade do elemento cobre em ruminantes são frequentemente descritos no mundo (MILTIMORE & MASON, 1971). Casos de intoxicação por cobre têm sido diagnosticados no Brasil (TOKARNIA et al., 1999), sendo que os ruminantes são mais sensíveis quando comparados aos não-ruminantes. A deficiência de Cu em ovinos está ligada à menor capacidade de absorção do mineral por algumas raças, enquanto a intoxicação deve-se a uma menor capacidade de conjugação entre o cobre e a metalotioneína, que leva à diminuição na excreção pela via biliar, e conseqüente acúmulo no fígado (SOARES, 2004). O desenvolvimento da deficiência ou intoxicação de cobre depende tanto da concentração deste elemento na dieta como das concentrações dos antagonistas que interferem com a absorção e a subseqüente utilização para os processos metabólicos (GOONERATNE et al., 1989).

Estudos em várias espécies de animais têm mostrado que a absorção intestinal do cobre pode ser influenciada pela forma química do elemento. Suplementos contendo microminerais complexados a moléculas orgânicas têm sido desenvolvidos industrialmente à partir do pressuposto de que a biodisponibilidade é mais alta nessa forma (SPEARS, 1996). A indústria preconiza que minerais orgânicos teriam maior solubilidade, estrutura química estável e natureza eletricamente neutra no trato digestivo. Logo, não participariam de reações que poderiam transformar o íon metálico livre em complexos insolúveis indesejáveis (SALVADOR, 2008).

Uma maneira de se comparar a efetividade das diferentes fontes de cobre é realizando o experimento de balanço metabólico, controlando-se a quantidade ingerida, e o eliminado pela urina e fezes; outra seria medindo o acúmulo do mineral nos tecidos.

Os ovinos constituem uma espécie interessante para o estudo de biodisponibilidade e balanço de nutrientes por se tratar de um pequeno ruminante e, portanto, facilitar o estudo em gaiolas metabólicas.

O estudo da substituição de fontes inorgânicas por fontes orgânicas de cobre sobre a digestão, consumo e biodisponibilidade, em ovinos de corte, consumindo dietas com teores nutricionais adequados à expressão do seu potencial produtivo, requer avaliação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Cobre

As primeiras evidências notáveis da importância nutricional dos minerais deram-se no século 20, a partir de investigações de problemas zonais de animais criados em confinamento que padeciam de deficiências, intoxicações ou desequilíbrio de certos minerais, bem como de estudos básicos com animais de laboratório alimentados com dietas purificadas (UNDERWOOD, 1983). As provas de que os elementos são essenciais residem em experiências realizadas com uma ou mais espécies. Nessas, os sintomas produzidos por dietas adequadas em todos os nutrientes, com a exceção dos minerais em questão, foram prevenidos ou superados pelo acréscimo dos mesmos na dieta.

O estudo do elemento cobre iniciou-se em 1925, quando se descobriu sua importância sinérgica com o ferro na formação da hemoglobina (MAYNARD, 1984). O cobre é um elemento essencial ao organismo; compõe muitas enzimas cobre dependentes, tem papel como biocatalizador do ferro, é utilizado na hematopoiese, na formação da elastina e do colágeno e contribui para a integridade do sistema nervoso central (MARQUES, 2003). O cobre também está diretamente relacionado à

maturação da hemácia e ao funcionamento do sistema enzimático. Participa da formação do tecido ósseo e conjuntivo e do sistema imunológico. É importante para a integridade do sistema nervoso central e da musculatura cardíaca (SPEARS, 2000).

2.1.1 Distribuição de cobre nos tecidos

Segundo Luza e Speisky (1996), o cobre encontra-se distribuído em todos os tecidos do organismo animal, mas sua maior concentração verifica-se no fígado. Nos ruminantes, cujos hepatócitos apresentam alta capacidade de armazenamento de Cu, a concentração do elemento no fígado pode ser muito maior em relação aos outros tecidos. Dick (1954), apud Underwood (1977), encontrou uma concentração de Cu no fígado de ovinos de 72-79% do total dos demais tecidos.

A concentração do cobre nos tecidos varia com a idade, a espécie, e estado nutricional do animal. Existem variações individuais muito grandes dentro das espécies. Em geral, as concentrações do elemento no fígado na maioria das espécies animais vão reduzindo à medida que vão ficando 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).

A duração da suplementação e a concentração do suplemento de cobre, a ausência ou presença de antagonistas, fatores ambientais e diferenças raciais são fatores que afetam a resposta animal à suplementação de cobre (ENGLE, 2001).

Saylor e Leach Jr. (2008) estudaram o efeito da idade e teores dietéticos de cobre e zinco na distribuição intracelular em ovinos e concluíram que a concentração de cobre hepática foi elevada com o aumento do teor na dieta. A distribuição hepática

do cobre foi baixa em animais neonatos quando comparados com animais de 30 e 60 dias de idade.

A concentração normal de cobre no sangue, para a maioria das espécies, é de 80 a 120 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ou 0,80 a 1,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ADRIGUETTO et al., 1999). Valores críticos no plasma ocorrem a partir de 0,65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MCDOWELL, 1992).

2.1.2 Importância e metabolismo do cobre

Logo após demonstração do papel essencial do cobre na hematopoiese, descobriu-se que ele faz parte de várias enzimas com funções de oxidase como a tirosinase, oxidase amina e ácido ascórbico oxidase (Mcdowell, 2003). Além disso, foi descoberto que deficiências funcionais de algumas enzimas dependentes de Cu dão origem às patologias associadas a deficiências de Cu como; tirosina e falta de pigmentação, lisil oxidase com efeitos cardiovasculares. Outras enzimas dependentes de Cu como citocromo C oxidase, Cu Zn-Superóxido dismutase e dopamina- β - monoxigenase tem um papel importante no metabolismo, mas é difícil discernir as patologias relacionadas a redução de sua atividade (BAKER e AMMERMAN, 1995).

As hemácias são sensíveis à lesão oxidativa pois são transportadoras de oxigênio e, também são expostas às várias substâncias químicas no plasma. O organismo produz constantemente produtos oxidantes como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^-).

Dependendo da forma como o cobre é encontrado, ele atua como elemento pró- ou antioxidante. Apesar do Cu ser considerado um elemento pró-oxidante, nas células hepáticas ele não está presente na forma livre iônica, mas sim ligado a proteínas, que inativam sua ação pró-oxidante (LUZA e SPEISKY, 1996). Adicionalmente, o cobre pode ser encontrado como um cofator em muitas metaloenzimas, tais como

citocromo oxidase e Cu, Zn-superóxido dismutase (SOD), que representam a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (McCORD; FRIDOVIC, 1969). Na deficiência de cobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) é diminuída (XIN et al., 1991).

De acordo com Jones e Suttle (1981) e McCord e Fridovic (1969), a SOD é uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos e exerce papel fundamental na regulação do metabolismo celular dependente do O₂. A falta de SOD associada à deficiência de cobre acarreta aumento no O₂ extracelular; dessa forma, pode realçar os danos oxidativos o suficiente para danificar a função normal da célula (SHARMA et al., 2005).

2.2 Exigências

As exigências de cobre em ovinos em crescimento podem variar de 3,1 a 14,6 mg/dia (NRC, 2007) dependendo da capacidade de ganho de peso do animal. Entretanto, a concentração de molibdênio (Mo) e enxofre (S) na dieta podem influenciar a absorção do elemento e, conseqüentemente alterar os valores de exigência (NRC, 1996).

O limite superior tolerável de ingestão por ovinos é de 15mg/kg de MS, quando a dieta contém concentração normal de Mo (1-2 mg/kg de MS) e de S (0,15-0,25%) (NRC, 2005). Porém, são diversos os fatores que predisõem a intoxicação cúprica em ovinos, entre eles o fator racial. Ovinos de raças como Texel são mais predispostos a apresentarem intoxicação, provavelmente por apresentarem uma maior capacidade de absorver o cobre dietético e reter no órgão estoque quando comparados com o Scottish Blakface, Merino e Welch (ORTOLANI, 1996). Segundo o NRC (2007) a raça Texel retém 9,5% do cobre ingerido, enquanto o Suffolk somente 1,3%.

A administração de sais de cobre misturados aos suplementos minerais é o método mais econômico e eficiente no controle da deficiência em todo o país (MARQUES, 2003). Entretanto, atualmente tem-se dado ênfase às fontes orgânicas, principalmente sob a alegação de não interferência de outros minerais na absorção.

2.2.1 Deficiência

A deficiência de cobre em ruminantes pode ser causada por antagonistas presentes na forragem que reduzem sua absorção. Uma dieta com altas concentrações de molibdênio (Mo), enxofre (S) e ferro (Fe) reduzem as concentrações séricas de cobre em ruminantes. As pastagens contêm baixos níveis de cobre. Análises realizadas no Brasil têm mostrado médias de 4 a 6mg/kg na matéria seca, correspondendo a cerca de 50% das exigências. O solo determina a concentração de cobre nas forragens (MARQUES, 2003).

A carência de Cu no organismo do animal afeta a enzima citocromo oxidase. Esta enzima é muito importante porque catalisa a redução de O₂ até água, uma etapa de fundamental importância na respiração celular. A deficiência de cobre prejudica também a síntese de colágeno e elastina, pois a enzima lisil-oxidase (cobre dependente) proporciona rigidez e elasticidade nas proteínas estruturais (McDOWELL, 1992). Foram observadas falhas reprodutivas em mamíferos com deficiência de cobre. A deficiência também altera a resposta imune em humanos e animais (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). O estudo do cobre em respostas imunológicas e resistência a doenças é muito complexo devido às numerosas interações que ocorrem entre o cobre e outros minerais (SPEARS, 2000).

Segundo McDowell (2003) a deficiência de cobre afeta o metabolismo de lipídeos, resultando em elevado nível de triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol no soro de ratos.

O sinal clínico da deficiência de cobre em ovinos é a despigmentação dos pêlos (cílios), lã e pele. A anemia também é um sinal geral em todas as espécies, bem como crescimento retardado, ossos frágeis, diarreia, fibrose do miocárdio, ruptura da aorta devida aos efeitos do cobre na formação da elastina, etc. Deficiências de cobre também reduzem os índices relacionados à fertilidade do rebanho (ANDRIGUETTO et al., 1999).

2.2.2 Intoxicação

A intoxicação por cobre em ruminantes ocorre, especialmente em ovinos, em que o estoque nos hepatócitos e a excreção biliar são limitados. O cobre se acumula no fígado dos animais que ingerem alto teor desse mineral. Quando a concentração no fígado aumenta, ocorre um aumento tanto na divisão celular, quanto na apoptose das células hepáticas. Quando a taxa de apoptose e perda dos hepatócitos excede a reposição, o cobre é liberado na circulação, causando crise hemolítica (formação de corpúsculos de Heinz), (THRALL et al., 2006). Em ovinos, intoxicações por cobre podem resultar em anemia hemolítica devido ao dano oxidativo.

A concentração de cobre no fígado é conclusiva no diagnóstico de intoxicação pelo elemento, principalmente nos casos fatais. Os teores normais de cobre hepático variam de 60 a 300 mg/kg de MS. Ovinos intoxicados podem conter concentrações de 1400 a 5000 mg/kg de MS (ANTONELLI, 2007).

A aspartato amino transferase (AST), antigamente conhecida como TGO (transaminase glutâmico-oxalacética), e a alanina aminotransferase (ALT), também conhecida como TGP (transaminase glutâmico pirúvica) são enzimas que participam do metabolismo dos aminoácidos e apresentam-se aumentadas quando há dano hepático. Porém, somente com as dosagens dessas enzimas não se pode fazer um diagnóstico de intoxicação; para isso deve haver uma combinação de exames como

AST, GGT e bilirrubinas, juntamente com análise de cobre nos tecidos hepático e renal, bem como acompanhamento de sintomas.

Segundo Ortolani et al., (2003) em estudo observando os principais eventos biológicos em ovinos intoxicados experimentalmente por cobre na dieta, durante o período pré-hemolítico, a primeira manifestação é o aumento da atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT), que precede 28 dias antes da instalação da fase hemolítica, seguida da elevação da atividade do aspartato amino transferase (AST) próximo do 14º dia; apetite seletivo, quando o animal deixa de consumir concentrado aos 9º dias, e então destacada hiporexia nos últimos dias precedentes à crise hemolítica.

Em trabalho de indução de intoxicação cúprica em cordeiros, MacPherson e Hemingway (1969) estudaram a atividade das enzimas hepáticas AST e GGT no período pré-hemolítico e verificaram que a atividade do AST teve melhor correspondência na indicação precoce de intoxicação comparada com a da GGT. Ocorreu aumento significativo de AST em 71,5% dos casos, quatro a cinco semanas anteriores ao surgimento de hemoglobinúria. Em estudo comparativo de intoxicação por cobre em cordeiros e cabritos (com aproximadamente 3 meses de idade), Zervas et al., (1990) suplementaram 30 ou 60 mg de Cu/kg de MS na forma de CuSO_4 , com 67 dias de experimento e ocorreram óbitos devido à intoxicação por cobre em ambos os tratamentos, e ao final de 90 dias.

2.3 Absorção de cobre

O local e a taxa de absorção do cobre variam com a espécie e, ocorre predominantemente no intestino delgado. O cobre transita no organismo animal combinado a algumas proteínas. A maior parte do cobre presente no plasma de mamíferos está ligado à ceruloplasmina, sendo o carreador específico, que exporta cobre do fígado para os órgãos alvos (McDOWELL, 1992). Para que ocorra a

absorção do cobre é fundamental a presença da proteína ligadora de cobre, como as metalotioneínas, cujo papel biológico dentre vários é o controle das concentrações de microminerais, íons metálicos e, conseqüentemente proteção contra os íons livres oriundos do estresse oxidativo das células.

A absorção de cobre em ruminantes é baixa (1 a 10%) em relação aos valores reportados para não ruminantes. A baixa absorção de cobre em ruminantes é devido a complexas interações que ocorrem no rúmen. Antes do completo desenvolvimento do rúmen a absorção de cobre é alta (70-85%) em ovinos alimentados com leite, mas se reduz a até no máximo 10% após o desmame (SPEARS, 2003).

A absorção intestinal do cobre pode ser influenciada pela forma química e interações com outros elementos da dieta como molibdênio e enxofre, que afetam a retenção e a distribuição do Cu no organismo. Outros importantes fatores que influenciam a absorção do elemento inclui a presença de quelantes com aminoácidos. As diversas fontes de Cu podem reagir de maneiras distintas com os respectivos antagonistas e, portanto, podendo ser absorvido e utilizado com eficiências diferentes (KEGLEY & SPEARS, 1994).

As principais fontes para suplementação são os sais de cobre: sulfato de cobre, carbonato de cobre, cloreto de cobre, óxido de cobre e complexos de cobre com aminoácidos ou proteínas.

Segundo Spears (2003), as possibilidades de interação entre Mo, S e Cu estão centradas na formação de tiomolibdatos no rúmen (mono, di, tri e tetratiomolibdatos). Os tiomolibdatos são formados pela reação de molibdatos com sulfetos, produzidos pelos microrganismos quando reduzem sulfatos e também quando degradam aminoácidos contendo enxofre. O enxofre na forma de sulfeto reduz a disponibilidade de Cu pela formação de sulfeto de cobre, insolúvel no trato digestório. Os tiomolibdatos associados com a fase sólida da digesta do rúmen (bactérias, protozoários e partículas alimentares não digeridas) formam complexos insolúveis com o cobre sob condições de baixo pH. Os complexos di e tritiomolibdatos podem ser absorvidos. Os ruminantes são expostos a consumo

excessivo de ferro com muita frequência, quer seja através da ingestão de água, de solo, e de alimentos ricos em ferro. Dietas com alto teor de ferro não reduzem o status de cobre em ruminantes jovens lactentes, o que sugere que a plena funcionalidade do rúmen contribui para a interferência do Fe no metabolismo do Cu (SPEARS, 2003).

2.4 Minerais complexados

Os minerais em forma orgânica são apresentados pelas indústrias de suplementos e constituem minerais íons metálicos específicos ligados quimicamente a moléculas orgânicas, como, por exemplo, os aminoácidos. E formam uma estrutura molecular com diferente estabilidade e biodisponibilidade. Por estas propriedades, o mineral orgânico é um produto caro, quando comparado com a fonte inorgânica correspondente.

A *Association of American Feed Control Officials*, é órgão que regula a qualidade e a segurança de produtos para a alimentação de animais nos Estados Unidos, oferecendo padrões para a fabricação, distribuição e venda de dietas animais (AAFCO, 2000). Ela estabeleceu a seguinte definição de minerais orgânicos: “São íons metálicos ligados quimicamente a uma molécula orgânica, formando estruturas com características únicas de estabilidade e alta disponibilidade mineral” (ROEPCKE, 2007).

Segundo o mesmo autor, Roepcke (2007), suplementos de minerais-traço orgânicos comercialmente disponíveis variam de acordo com o tipo de ligante ou dos ligantes utilizados na forma de metal complexado ou quelatado. A classificação estabelecida pela AAFCO 2000 para os vários tipos de produtos de minerais orgânicos é:

Complexos: - Complexo metal - aminoácido: O produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um ou mais aminoácidos.

- Complexo metal - aminoácido específico: O produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com um aminoácido específico

- Complexo metal - polissacarídeo: O produto resultante da complexação de um sal metálico solúvel com uma solução do polissacarídeo ingrediente do complexo do metal específico.

Quelatos: - Quelato metal-aminoácido: O produto resultante da reação de íon metálico de um sal metálico solúvel com aminoácidos com uma razão molar de um mol de metal para um a três (preferencialmente dois) moles de aminoácidos para formar ligações covalentes coordenadas. O peso molecular médio do aminoácido hidrolisado deve ser de aproximadamente 150 daltons e o peso molecular resultante do quelante não deve exceder 800 daltons.

- Quelato metal proteínato: O produto resultante de uma quelação de um sal solúvel com aminoácidos e/ou proteína parcialmente hidrolisada.

Os complexos e os quelatos formados são estáveis no trato digestório, e estão assim protegidos da formação de complexos com outros componentes da dieta que iriam de outra forma inibir sua absorção. No metabolismo animal, os elementos traço ocorrem e funcionam na forma de complexos orgânicos, ou de quelatos orgânicos, e não como íons inorgânicos livres. Além disso, a utilização de minerais traço depende da habilidade do animal em convertê-los para formas orgânicas biologicamente ativas. Os minerais traço presentes naturalmente na alimentação também existem primariamente como quelatos ou complexos orgânicos (USHIDA et al., 2001 *apud* (ROEPCKE, 2007). Os complexos de coordenação são constituídos por um átomo ou íon metálico de transição ligado a átomos ou grupos de átomos chamados ligantes. Caso os ligantes possam fazer simultaneamente duas ou mais ligações covalentes e/ou iônicas, de forma a prender o metal, são então denominados quelatos. O termo vem da palavra grega *chele*, que significa garra ou pinça.

Muitos autores avaliaram formas orgânicas na suplementação de cobre (SPEARS, 2003). Desfoulian et al. (2012), avaliando a suplementação de cobre com diferentes

teores (10 e 20 mg/kg MS) e fontes (CuSO_4 e proteinato de cobre) em cordeiros, durante o período de 84 dias não encontraram efeito significativo no ganho de peso do animais. Em trabalho com suplementação de diferentes fontes de cobre (CuSO_4 e Cu-metionina) realizado em ovelhas, Pal et al. (2010) verificaram que não houve diferença significativa no ganho de peso e na ingestão de matéria seca.

Trabalhando com cabritos desmamados, Luginbuhl et al. (2000), também não encontraram efeito significativo no ganho de peso e consumo médio de ração.

Em bovinos alimentados com dietas ricas em molibdênio, o cobre-proteinato não apresentou melhor biodisponibilidade, comparado ao sulfato de cobre, (WITTENBERG; BOILA; SHARIFF, 1990). Entretanto, algumas pesquisas demonstram uma melhora no crescimento, reprodução e sanidade dos animais alimentados com minerais orgânicos (SPEARS, 1996).

As diferenças entre os minerais tradicionais e os orgânicos ocorrem durante o processo de absorção. Por estarem ligados a moléculas orgânicas, os orgânicos podem utilizar uma via de absorção diferente, como a dos aminoácidos, além de não sofrerem interação com os outros minerais que prejudicam a absorção.

Um fato de muita importância com relação aos minerais orgânicos é que existem vários tipos e são obtidos de várias formas, e que, portanto, suas propriedades e qualidades são diferentes, fazendo com que o desempenho dos animais também seja diferente. Um dos problemas dos minerais orgânicos existentes é que ainda não existe especificação de qualidade, o que explica até certo ponto a variação nos resultados (ZANETTI, 2009).

Os muitos estudos existentes são insuficientes para afirmar com certeza as diferenças exatas entre as fontes orgânicas e inorgânicas.

Muitos trabalhos mostram resultados distintos quando se comparam diferentes fontes. Seria de fundamental importância um método capaz de avaliar a qualidade do mineral orgânico, o que não é feito no Brasil.

2.5 Biodisponibilidade e Balanço Metabólico

O termo biodisponibilidade é definido como a proporção de um nutriente ingerido de uma determinada fonte que é absorvido e utilizado no metabolismo do animal (AMMERMAN et al., 1995).

Um elemento que é pouco disponível para um animal é excretado para o meio ambiente. Em áreas de intensa concentração de animais, deve-se atentar para a contaminação de metais no solo e água subterrânea. Para minimizar os danos causados pela elevada excreção de metais, fontes de fornecimento com uma melhor utilização pelo animal devem ser encontradas.

Diversos trabalhos utilizaram diferentes métodos para estimar a biodisponibilidade. Du et al. (1996), em estudo comparativo da utilização de diferentes fontes, na presença de antagonistas Fe e Zn, concluíram o Cu-proteinado e o Cu-lisina foram mais biodisponíveis ao sulfato de Cu, com base nos teores de Cu no fígado de ratos.

Um dos mais precisos é o método do “slope ratio” (relação dos coeficientes de regressão) que consiste na oferta de teores crescentes da fonte padrão e da fonte teste aos animais e uma (ou mais) medição do índice de status nutricional (FERREIRA et al., 2002; ZANETTI e CUNHA, 1997). Deve-se traçar a curva de resposta e analisar a porção reta, sendo que a biodisponibilidade será calculada através da relação entre as retas (teste e padrão).

O balanço metabólico pode quantificar a absorção aparente do mineral (mg/kg) e a porcentagem absorvida e retida em função do ingerido, por meio da quantificação do total do mineral ingerido (mg/dia) e excretado pelas fezes e urina (mg/dia) (ZANETTI & PETTINATI, 1991).

3 HIPÓTESES

A fonte cobre-metionina apresenta maior biodisponibilidade de cobre do que a do sulfato de cobre.

4 OBJETIVO

Objetivou-se determinar a biodisponibilidade de fontes de cobre orgânico e inorgânico por meio de análise da concentração do elemento no sangue, nos tecidos, atividade de enzimas no fígado e balanço metabólico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e Período

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga-SP, em gaiolas para estudo de metabolismo de ovinos, por um período de 120 dias.

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Processo: 13.1.2380.74.3

5.2 Animais

Foram utilizados 40 cordeiros não castrados, cruzados Merino x Texel, com aproximadamente 3 meses de idade e 25 kg de peso vivo médio inicial.

5.3 Instalações e manejo inicial

Os animais foram alojados em gaiolas de metal revestidas com plásticos, apropriadas para estudo de metabolismo de minerais, instaladas em galpão coberto equipado com cortinas laterais, com comedouros e bebedouros individuais.

Antes do início do experimento os animais foram submetidos à colheita de fezes para exame de OPG (ovos de parasitas gastrointestinais por grama de fezes). A partir do resultado da contagem dos ovos todos os cordeiros foram vermifugados e submetidos a uma fase de adaptação de 20 dias a fim de se promover a mudança da dieta de forma gradual. Neste período todos os animais receberam a dieta controle (sem adição de cobre).

Após o período de adaptação, foram realizadas biópsias do fígado dos animais utilizando o procedimento descrito por Miles et al. (2001), para analisar o teor de cobre no início do experimento; seguido de um período de recuperação pós cirúrgica de 15 dias. Durante todo esse período os animais receberam a dieta experimental basal (controle) sem adição de suplementação de cobre. Para a cirurgia de biópsia do fígado foram realizados procedimentos de rotina como tricotomia dos animais na região da primeira costela do lado direito e jejum total de 12 horas. E posteriormente à cirurgia os animais receberam doses injetáveis via intramuscular de antibiótico e anti-inflamatório.

A partir das atividades preliminares concluídas deu-se o início do experimento com os diferentes grupos de animais distribuídos aleatoriamente nos diferentes tratamentos, o que caracterizou o tempo zero (0 dia). Nessa data os animais foram pesados e também foram colhidas amostras de sangue para dosagem sérica de Cu e enzimas de função hepática (AST e ALT).

A cada 28 dias (d) foram realizadas pesagens dos animais e novamente colheitas de amostras de sangue, totalizando quatro coletas em diferentes tempos (0d, 28d, 56d e 84d).

5.4 Tratamentos

Os 40 animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, e submetidos aos cinco tratamentos, totalizando oito animais por tratamento:

Tratamento 0: Dieta controle sem suplementação de Cu;

Tratamento 1: Dieta controle + suplementação com 10 mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre (CuSO₄-10);

Tratamento 2: Dieta controle + suplementação com 30g de Cu/kg de MS na forma de sulfato de cobre (CuSO₄-30);

Tratamento 3: Dieta controle + suplementação com 10 mg de Cu/kg de MS na forma de cobre-metionina (Cu-met-10);

Tratamento 4: Dieta controle + suplementação com 30 mg de Cu/kg de MS na forma de cobre-metionina (Cu-met-30).

Os animais receberam uma ração homogênea elaborada para conter um teor de proteína de 14% e o NDT estimado de 65%. A composição percentual está apresentada na Tabela 1

Tabela 1 - Composição percentual da dieta basal fornecida aos cordeiros

Ingrediente	Porcentagem (%)
Fubá de Milho	55,80
Casca Algodão	25,00
Farelo Soja	16,00
Óleo Soja	1,00
Calcário Calcítico	1,20
Vitaminas*	0,50
Minerais**	0,50
Total	100,00

* Composição de vitaminas por quilograma de mistura mineral: Vitamina A (400000 UI) e vitamina E (4000 UI) ** Composição dos minerais por quilograma de mistura mineral: Iodo 100 mg, Ferro 4000 mg, Cobalto 40 mg, Manganês 3000 mg, Selênio 40 mg, Zinco 4000 mg, Enxofre 40g e Cloreto de sódio 216 g.

A mistura mineral utilizada foi formulada exclusivamente para esse experimento. Fez-se uma pré-mistura com todos os minerais exceto o cobre (elemento a ser testado). Posteriormente essa pré-mistura foi dividida em 5 partes iguais e em quatro das partes foi adicionado o cobre nas quantidades que caracterizaram os tratamentos a serem testados. Essa mistura mineral contendo cobre foi previamente misturada com fubá de milho na proporção de 0,750:1,00 kg antes do preparo da ração, para facilitar a homogeneização no misturador da fábrica de ração.

Os animais receberam água limpa e fresca à vontade em bebedouros tipo balde enchidos automaticamente por meio de bomba hidra.

5.5 Procedimento experimental

Diariamente foram colhidas e pesadas as sobras da alimentação. A quantidade de alimento a ser ofertado se equívaleu a 3% do peso vivo de ração para cada animal, quantia essa que foi dividida em dois fornecimentos (pela manhã e à tarde). Dessa forma o animal que pesava 30 kg recebia por dia 0,9 kg de ração por dia.

Nos dias 0, 28, 56 e 84 do experimento foram efetuadas as seguintes medições e colheitas de amostras: Pesagens dos animais após jejum alimentar (sólidos) de 12 horas, colheitas de sangue para análises de: cobre, ceruloplasmina e enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT).

Nos últimos dez dias do período experimental foi realizado um balanço metabólico de cobre. A biodisponibilidade foi calculada pela técnica “slope ratio”, utilizando como parâmetros a concentração de cobre no fígado (AMMERMAN et al., 1995).

5.5.1 Balanço metabólico

O balanço metabólico do cobre foi realizado durante os últimos dez dias do período experimental por meio da amostragem diária de 10% do alimento fornecido, das sobras, da urina e das fezes de cada animal. As fezes diárias totais foram colhidas utilizando-se como auxílio bolsas de tecido tipo lona de algodão, confeccionadas especialmente para esta finalidade, forradas com material plástico impermeável, e fechadas com zíper, que foram fixadas na garupa de cada cordeiro por meio de cintos com fivelas ajustáveis, de modo que as fezes ficavam retidas em seu interior. As fezes eram retiradas pela abertura do zíper, pesadas, amostradas e congeladas para posteriores análises

A urina foi recolhida com auxílio de bandejas forradas com material plástico, posicionadas abaixo de cada gaiola, que direcionou todo o líquido, sem contaminação por fezes, em baldes contendo ácido clorídrico e água na concentração de 1:1 para evitar a evaporação.

As fezes foram pesadas em balança eletrônica e o volume de urina foi medido em proveta.

Os parâmetros avaliados foram: quantidade de cobre ingerido (mg/dia), quantidade de cobre excretado nas fezes e na urina (mg/dia), absorção e retenção aparentes de cobre (mg/dia); e porcentagem de cobre absorvido e retido em função do cobre ingerido (%). Os cálculos utilizados para a determinação destes parâmetros foram:

- Cobre ingerido (mg/dia) = Concentração de cobre no alimento fornecido (mg/kg) x quantidade de alimento ingerido (kg/dia);
- Cobre excretado nas fezes (mg/dia) = Concentração de cobre nas fezes (mg/kg) x quantidade de fezes excretada (kg/dia);
- Cobre excretado na urina (mg/dia) = Concentração de cobre na urina (mg/kg) x quantidade de urina excretada (kg/dia);
- Absorção aparente de Cobre (mg/dia) = Cobre ingerido (mg/dia) – cobre excretado nas fezes (mg/dia);
- Porcentagem de Cobre absorvido = (cobre absorvido x 100)/ cobre ingerido;
- Porcentagem de Cobre excretado nas fezes = 100 – Porcentagem de cobre absorvido;
- Retenção aparente de Cobre (mg/dia) = Cobre absorvido – cobre excretado na urina;
- Porcentagem de Cobre retido = (cobre retido x 100)/ cobre ingerido.

5.5.2 Abate dos animais

Decorridos 84 dias a partir do dia zero, os animais foram abatidos após permanecerem em jejum por 16h. O abate foi realizado no matadouro escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS) de forma

humanitária. A insensibilização foi feita por concussão cerebral, com a utilização de pistola pneumática adequada para o abate de ovinos. Depois de realizadas sangria pela veia jugular em posição vertical, foi realizada a evisceração, pesagem (carcaça quente), e no dia seguinte pesagem da carcaça fria e serragem em meias carcaças. No momento da evisceração foram colhidas amostras de fígado do lobo direito, na região caudal e rins para determinação dos teores de cobre, que foram congeladas em freezer à -20°C ; E também colhidas amostras em triplicata de fígado da mesma região destinadas à análise da enzima superóxido dismutase (SOD), que foram embaladas em papel alumínio e armazenadas em botijão de nitrogênio. Posteriormente, as carcaças foram mantidas em câmara frigorífica a 0°C até ao término do *rigor-mortis* e no dia seguinte foram colhidas amostras do músculo *Longissimus* na região entre a 12^a e 13^a costela; estas também congeladas à -20°C .

5.5.3 Biodisponibilidade

Para o cálculo da biodisponibilidade relativa do cobre foram utilizados como parâmetros as concentrações de cobre no fígado, pela técnica do “slope ratio” segundo Ammerman et al. (1995), considerando o sulfato de cobre como fonte padrão (100%).

Para a realização de estudos de biodisponibilidade com teores próximos ao recomendado, 6 a 8 mg/kg de MS, seria necessária uma dieta basal purificada, sem a presença de Cu, ou dietas com teores muito baixos. Devido a dificuldade de formular uma dieta purificada, levando em conta que os alimentos possuem cobre, recomenda-se utilizar dietas com altos teores de Cu.

5.6 Procedimento Analítico

As análises dos minerais foram realizadas no laboratório de minerais; as análises bromatológicas no laboratório de bromatologia, ambos do Departamento de Zootecnia (ZAZ). As análises de ceruloplasmina e SOD foram realizadas no, laboratório de química biológica do Departamento de Ciências Básicas (ZAB). Ambos localizados na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. As análises bioquímicas de AST e ALT foram realizadas no laboratório do centro de pesquisa em toxicologia veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Todos pertencentes à Universidade de São Paulo.

5.6.1 Análise bromatológica

As determinações de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e matéria mineral das rações obedeceram às recomendações da Association of the Analytical Chemists (AOAC), 1996.

5.6.2 Biópsia do fígado

As biópsias realizadas no fígado dos animais seguiram a técnica e procedimento descrito por Miles, Wilkinson e McDowell, (2001).

5.6.3 Análise de minerais

O cobre no soro, fígado, rim e músculo foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica (Miles et al., 2001). Para análise dos tecidos colhidos as amostras foram descongeladas, lavadas em água destilada deionizada, secas em papel absorvente descartável e pesadas em balança de precisão. Inicialmente foi feita pré-digestão úmida e posteriormente queima em mufla (MILES et al., 2001).

5.6.4 Atividade da ceruloplasmina

A atividade da ceruloplasmina no soro foi determinada por metodologia descrita por Schosinski, Lehmann, Beeler (1974) a partir da atividade enzimática de oxidação da ceruloplasmina que reage com a orto dianisidina na presença do oxigênio (incubada em solução tampão acetato de pH 5,0), e forma um produto de reação com coloração acastanhada. Posteriormente, com a adição de H_2SO_4 a reação enzimática cessa e a solução adquire coloração violácea, cuja absorbância foi lida em 540nm.

5.6.5 Análise das transaminases (AST e ALT)

As análises bioquímicas foram realizadas por meio de kit enzimático da marca Bioclin (QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte - MG - Brasil) e as dosagens foram feitas em aparelho automático, SBA 200 (Celm).

5.6.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método enzimático através do kit RANSOD (Randox Laboratories, Reino Unido). Este método emprega a xantina e xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido, os quais reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (I.N.T) para formar um composto vermelho de formazan. A atividade do superóxido dismutase é medida através do grau de inibição desta reação. A atividade da SOD foi expressa em μmol por minuto por miligrama de proteína ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína).

5.7 Delineamento experimental

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. Os dados de cobre no fígado, rins e músculo e enzimas foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando o procedimento GLM do programa SAS (2004). Em caso de resultados significativos na ANOVA, foram analisados os contrastes abaixo, utilizando o teste Scheffé:

$$\hat{Y}_1 = m_1 - m_2 - m_3 - m_4 - m_5$$

$$\hat{Y}_2 = m_2 + m_3 - m_4 - m_5$$

$$\hat{Y}_3 = m_2 - m_3$$

$$\hat{Y}_4 = m_4 - m_5$$

Para os resultados das análises no soro de cobre, ceruloplasmina e enzimas hepáticas, no tempo, foi utilizado o PROC MIXED do SAS (2004). As médias foram comparadas por meio de contrastes e foi adotado um nível de 5% de significância.

(i) Em caso de efeito principal de tratamentos significativo, foram avaliados os contrastes anteriormente mencionados, por meio de teste de Scheffé.

(ii) Em caso de efeito dos dias de avaliação significativo, foi realizada uma análise de regressão, visando avaliar o comportamento da variável resposta em questão em função do tempo.

(iii) Em caso de interação significativa, foram realizadas análises de regressão visando avaliar o comportamento de cada tratamento em função do tempo.

Para o cálculo da biodisponibilidade foi usada a análise de regressão múltipla (AMMERMAN et al. 1995).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de cobre na dieta controle foi de 9 mg/kg de MS. Os principais motivos para a utilização desta ração é pela sua homogeneidade e principalmente pela dificuldade de seleção pelos ovinos, caso contrário os animais não ingeririam os minerais nas concentrações programadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição bromatológica da dieta na MS.

Composição bromatológica	%
MS	91,00
Proteína Bruta	15,80
Extrato Etéreo	6,90
Matéria Mineral	5,40
FDN	40,00
FDA	31,82

MS – Matéria seca; FDN – Fibra em detergente neutro; FDA – Fibra em detergente ácido.

6.1 Resultados de desempenho e enzimas hepáticas

Não foi verificado efeito significativo ($P>0,05$) da suplementação com cobre independentemente da fonte e teor sobre os parâmetros de desempenho: ganho de peso, peso vivo, peso da carcaça e rendimento de carcaça. Entretanto, houve um efeito linear no tempo sobre os pesos vivos medidos a cada 28 dias ($Y = 28,66 + 0,16x$) e efeito quadrático do tempo sobre o ganho ($4,83 + 0,03x^2 - 0,001x$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Peso ao abate, peso de carcaça, rendimento de carcaça, peso vivo e ganho de peso por período (kg) de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis (Kg)	Tratamentos (mg de Cu/kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co (0)	CuSO ₄ (10)	CuSO ₄ (30)	Cu-metionina (10)	Cu-metionina (30)		A	B	C	D
Peso abate	42,04	42,52	42,13	40,76	41,73	1,88	0,90	0,58	0,89	0,72
Peso carcaça	20,65	20,81	21,18	20,04	21,06	1,04	0,91	0,67	0,80	0,49
Rendimento carcaça fria (%)	49,1	48,97	50,23	49,01	50,37	0,56	0,38	0,87	0,13	0,10
	Tempo (dias)									Efeito Tempo
	0	28	56	84						
Peso vivo	28,50 ± 0,73 ^A	33,16 ± 0,73 ^B	38,05 ± 0,73 ^C	41,82 ± 0,73 ^D						P<0,01
Ganho de peso total		4,82 ± 0,18 ^A	5,01 ± 0,18 ^A	3,76 ± 0,18 ^B						P<0,01

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar); EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina. Médias seguidas da mesma letra na linha, não tem diferença significativa ($P>0,05$) e médias seguidas de letra diferentes na linha tem diferença significativa ($P<0,05$).

A ausência de efeito significativo da suplementação com cobre sobre estes parâmetros pode ser explicada pelo fato de todos os animais terem iniciado o experimento com o mesmo peso e terem recebido a mesma quantidade de ração (3% do seu peso vivo) ao longo do período experimental.

Em relação ao ganho de peso, houve um decréscimo no final do período de engorda, comprovado pelo efeito quadrático, para todos os tratamentos, o que era esperado, pois os animais conforme o avanço da idade, cessam o crescimento, têm menor aumento de massa muscular e começam a depositar gordura.

Quanto ao rendimento de carcaça, os valores obtidos ao redor de 50% são condizentes com o tipo de animal e com a alimentação. É interessante ressaltar que os animais que receberam o maior teor de cobre metionina apresentaram maior rendimento de carcaça que os que receberam a suplementação menos ($P = 0,10$). Apesar das pequenas quantidades de minerais fornecidos, a metionina a mais pode ter sido a responsável.

Em trabalho de Dezfoulian et al. (2012), em que avaliaram os efeitos de diferentes fontes de cobre (CuSO_4 e cobre-proteinato) no desempenho de cordeiros, não encontrou diferença entre as fontes nos parâmetros avaliados ganho de peso e consumo de MS diários. Entretanto, os animais que receberam suplementação obtiveram melhores eficiências na conversão alimentar.

Os animais do lote controle ganharam peso de maneira semelhante aos suplementados porque a dieta basal já continha cobre suficiente (9 mg/kg). Por outro lado, como os suplementados com o teor mais alto de cobre (30 mg/kg), ganharam peso de maneira semelhante aos demais, pode-se afirmar que não houve efeito negativo do teor alto de suplementação no desempenho, mesmo estando acima do recomendado pelo NRC (2007), possivelmente pelo curto período de suplementação (três meses). Este dado é importante e comprova que não houve intoxicação nos animais, corroborando com a ausência de sintomas clínicos e com as análises laboratoriais dos tecidos e das enzimas hepáticas AST e ALT (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração sérica de AST e ALT de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Variável (U/L)	Tratamentos (mg de Cu/kg de MS)					Efeito tempo
	Co (0)	CuSO4 (10)	CuSO4 (30)	Cu-metionina (10)	Cu-metionina (30)	
AST	177,35 ± 12,88 ^{AB}	145,94 ± 12,65 ^B	196,5 ± 13,53 ^A	142,53 ± 12,65 ^B	177,35 ± 13,81 ^{AB}	P<0,05
ALT	20,53 ± 1,03 ^A	17,22 ± 1,03 ^B	15,50 ± 1,10 ^B	17,22 ± 1,03 ^B	20,75 ± 1,10 ^A	P<0,05
Tempo (dias)						
	0	28	56		84	Efeito tempo
AST	115,25 ± 11,65 ^B	271,96 ± 11,65 ^A	145,21 ± 11,65 ^B		139,31 ± 12,00 ^B	P<0,05
ALT	19,66 ± 0,95 ^{AB}	22,12 ± 0,95 ^A	17,35 ± 0,95 ^B		13,85 ± 0,95 ^C	P<0,05

Bampidis et al. (2010) em trabalho com ovinos, analisando os efeitos nos teores de AST e ALT da suplementação oral com CuSO₄ (60 e 90 mg de Cu/dia) por seis semanas, com a finalidade de estabelecer um método de diagnóstico do estagio pré-hemolítico de intoxicação cúprica crônica, não observaram diferença nas concentrações das enzimas entre os tratamentos, e encontraram valores médios de AST de 125 (U/l) e de ALT de 18 (U/l).

6.2 Cobre no soro

Não se verificou efeito significativo ($P>0,05$) da suplementação com o cobre independentemente das fontes e teores sobre os valores sanguíneos; entretanto, houve um efeito linear no tempo, causando redução da concentração de cobre no soro (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentrações médias de cobre (mg/kg) no soro de cordeiros durante o período de tempo nos diferentes dias de coleta (0, 28, 56 e 84 dias).

Variável	Tempo dias	Efeito
----------	------------	--------

(mg/kg)	0	28	56	84	Tempo
Cobre	0,92 ± 0,03 A	0,76 ± 0,03 B	0,77 ± 0,03 B	0,79 ± 0,03 B	P < 0,05

As concentrações séricas de cobre não sofreram efeito dos tratamentos, possivelmente pelo fato de que a dieta controle já atendia as exigências. É importante ressaltar que os valores encontrados (0,8-0,9 µg/mL) estão dentro da faixa considerado normal (ANDRIGUETTO et al., 1999). Um dado interessante é que mesmos nos animais suplementados acima das exigências o cobre sérico diminuiu ao longo do tempo. Isto mostra que os animais quando desmamados possuíam maiores teores de cobre, e resalta a importância da alimentação adequada das ovelhas prenhes. As concentrações séricas dos minerais não sofrem grandes variações em virtude da homeostase eficiente que existe no sangue. Quando há deficiência o teor diminui; já quando há excesso na dieta o valor não se altera.

6.3 Cobre no fígado

Não houve diferença ($P > 0,05$) na quantidade de cobre na biópsia do fígado dos animais indicando que os animais iniciaram o período experimental com o mesmo teor de cobre. As concentrações médias de cobre no fígado dos cordeiros no início (biópsia) e no final (abate) do período experimental estão apresentadas na Tabela 6.

São poucos os trabalhos na literatura que realizam biópsia de fígado em virtude principalmente da dificuldade, mas a biópsia permite que os dados de acúmulo no fígado sejam analisados com uma precisão maior. Uma das características é a grande variação entre os animais, como pode ser visto pelo erro padrão da média.

Tabela 6 - Concentrações médias de cobre (matéria seca) em mg/kg de fígado de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.

Cu fígado (mg/kg)	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)						EPM	Contrastes ortogonais			
	Co	CuSO ₄	CuSO ₄	Cu-metionina	Cu-metionina			A	B	C	D
	0	10	30	10	30						
Biópsia	39,90 ^A	47,85 ^A	48,83 ^A	29,51 ^A	60,77 ^A	13,34	0,65	0,81	0,96	0,11	
Abate	168,01 ^C	247,86 ^B	284,95 ^{AB}	263,02 ^B	341,29 ^A	23,33	<0,01	0,13	0,27	0,02	

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar); EPM = erro padrão da média; A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

A concentração hepática do mineral foi maior nos animais suplementados ($P < 0,05$) quando comparados com o grupo controle (contraste A), superior nos animais suplementados com 30mg/kg de cobre metionina em relação aos suplementados com a mesma fonte no nível de 10mg/kg de cobre (contraste D). Mostrando que a fonte orgânica propiciou maior depósito hepático. Resultado semelhante encontrado por Pal et al., (2010) em trabalho que estudou os efeitos na biodisponibilidade relativa da suplementação alimentar com Cu- e Zn-metionina e na forma de sulfato em ovelhas por um período de 140 dias, e avaliou as concentrações desses micronutrientes no plasma, tecido e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).

Zervas et al., (1990) suplementando 30mg de CuSO₄/kg de MS na ração de cordeiros por um período de 90 dias, descreveu teores de cobre no fígado de 350 e 2400 (mg/kg) em animais não suplementados e suplementados, respectivamente. Porém, nesse trabalho o autor teve o intuito de intoxicar os animais, e alguns morreram antes do final do período experimental. Os diferentes resultados entre doses e sinais de intoxicação confirmam a diferença entre as diferentes raças. Segundo Silva Sobrinho et al. (1996), algumas raças se intoxicam com maior frequência. A raça North Ronaldsay é a mais sensível à intoxicação, seguida pela Texel. A menos sensível é a raça Merino cuja exigência do elemento são maiores e apresentam resistência para sobreviver a uma crise hemolítica.

6.4 Cobre no músculo

Os resultados dos teores de cobre nas amostras de músculo estão apresentados na tabela 7. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre as fontes e teores de cobre utilizados nas concentrações de cobre no músculo dos animais. Este é um dado importante quando se utiliza teores de suplementação acima das exigências, como no presente experimento. No caso do cobre, mesmo o orgânico, não houve alteração no músculo, mostrando que o procedimento é seguro para o consumidor final.

Tabela 7 - Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de músculo (*Longissimus*) de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.

Variável (mg/kg)	Tratamentos (mg de Cu/kg de MS)					SEM	Contrastes ortogonais			
	Co	CuSO4	CuSO4	Cu-metionina	Cu-metionina		A	B	C	D
Cu músculo	1,77 A	1,95 A	2,08 A	1,83 A	2,00 A	0,11	0,11	0,39	0,41	0,26

A= Controle comparado com os demais; B= Inorgânico comparado com orgânico; C= Inorgânico 10mg/kg comparado com Inorgânico 30mg/kg; D= Orgânico 10mg/kg comparado com Orgânico 30mg/kg.

Em trabalho com ovinos suplementados com 30mg de CuSO_4 /kg de MS na ração, por um período de 90 dias, Zervas et al., (1990) encontrou valores de 5,00 a 8,00 mg/kg de cobre no tecido muscular dos animais controle e suplementados, respectivamente.

6.5 Cobre no rim

Os animais que receberam 30mg/kg de MS de Cu-metionina tiveram maior concentração de Cu ($P<0,05$) no tecido renal, comparados aos animais que receberam 10 mg/kg de MS da mesma fonte (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de tecido renal de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.

	Tratamentos (mg de cobre /kg de MS)					SEM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu- metionina 10	Cu- metionina 30		A	B	C	D
Cu no rim (mg/kg)	4,01 B	3,71 B	5,31 AB	3,86 B	6,65 A	0,79	0,33	0,35	0,16	0,02

A= Controle comparado com os demais; B= Inorgânico comparado com orgânico; C= Inorgânico 10mg/kg comparado com Inorgânico 30mg/kg; D= Orgânico 10mg/kg comparado com Orgânico 30mg/kg.

No mesmo trabalho citado acima, de Zervas et al., (1990), o autor encontrou valores de 14,00 e 50,00 mg/kg de Cu na MS no tecido renal de animais controle e suplementados, respectivamente. Os resultados do acúmulo de cobre no rim foram praticamente os mesmos apresentados para o fígado, com o cobre metionina na concentração de 30 mg/kg apresentando o maior valor, mas estatisticamente semelhante ao CuSO₄ na mesma concentração (30mg/kg).

6.6 Balanço Metabólico de Cobre

O teor de cobre na ração correspondeu ao esperado. A ração basal apresentou 9,09 mg de Cu/kg de MS. As rações com inclusão de 10 mg de Cu/kg de ração na MS

tanto na fonte sulfato de cobre, como na fonte cobre metionina corresponderam às análises com valores semelhantes (20,79 mg/kg e 21,35mg/kg) ; e a inclusão de 30 mg de Cu/kg de ração na MS também correspondeu ao esperado (39,13 mg/kg e 41,46 mg/kg).

Em experimentos com microelementos minerais é bastante comum os autores utilizarem os valores esperados e não os analisados, em virtude da dificuldade na obtenção de uma dieta homogênea. Os resultados obtidos no presente experimento comprovam o rigor nos procedimentos experimentais realizados e também a importância da utilização da ração escolhida.

A Ingestão do Cu correspondeu ao esperado uma vez que o tratamento controle teve a menor ingestão, seguida do teor 10mg/kg de MS que não teve diferença entre as fontes e a inclusão de 30mg/kg MS que também não teve diferença entre as fontes. Estes valores de ingestão corresponderam ao Cu oferecido aos animais nos referidos tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 - Quantidade de cobre excretado na urina (mg/kg), retenção aparente de cobre (mg/kg) e porcentagem de cobre retido em função do cobre ingerido (%) de cordeiros suplementados com diferentes níveis e fontes de cobre.

Variáveis (mg/kg)	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)					SEM	Contrastes ortogonais			
	Co	CuSO ₄	CuSO ₄	Cu-met	Cu-met		A	B	C	D
	0	10	30	10	30					
Cu Ingerido	9,09 ^C	20,78 ^B	39,13 ^A	21,35 ^B	41,46 ^A	1,42	<0,01	0,32	<0,01	<0,01
Cu Fezes	3,55 ^D	12,9 ^C	26,03 ^B	15,82 ^C	33,50 ^A	1,10	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Absorção aparente	5,53 ^B	7,89 ^B	13,10 ^A	5,52 ^B	7,96 ^B	0,89	<0,01	<0,01	<0,01	0,07
% Cu Absorv	60,20 ^A	38,00 ^B	33,24 ^B	25,56 ^C	19,03 ^C	2,50	<0,01	<0,01	0,18	0,09
Cu Urina	0,08 ^{AB}	0,05 ^B	0,08 ^{AB}	0,02 ^B	0,14 ^A	0,03	0,93	0,52	0,30	<0,01
Cu Retido	5,46 ^B	7,84 ^B	13,01 ^A	5,50 ^B	7,82 ^B	0,89	<0,01	<0,01	<0,01	0,09
% Cu Retido	59,39 ^A	37,79 ^B	33,02 ^B	25,45 ^C	18,70 ^C	2,50	<0,01	<0,01	0,18	0,08

A= Controle comparado com os demais; B= Inorgânico comparado com orgânico; C= Inorgânico 10mg/kg comparado com Inorgânico 30mg/kg; D= Orgânico 10mg/kg comparado com Orgânico 30mg/kg.

A absorção e a retenção aparentes do cobre foram maiores para a fonte inorgânica, comparada com a orgânica. Estes resultados contrastam com os resultados de acúmulo no fígado, que foi maior para a fonte orgânica. Os valores da absorção aparente do cobre estão altos, apesar de que os animais foram utilizados logo depois o desmame. Nos ruminantes adultos a absorção é ao redor de 10%, enquanto que nos lactantes 70 a 85% (SPEARS, 2003).

Nos animais sem suplementação, recebendo dieta com cobre no teor recomendado pelo NCR (2007), a absorção foi maior que nos animais recebendo teores elevados, mostrando que existe um mecanismo de controle.

Comparando-se os resultados do balanço com as concentrações de cobre no fígado, nota-se que há uma relação inversa: quanto menor o acúmulo, maior é a absorção. Isso provavelmente aconteceu pelo fato de o balanço ter sido realizado no final do experimento, quando os animais já estavam "repletos" ou quase no limite de eliminação; controlando uma intoxicação próxima, iminente.

6.7 Ceruloplasmina

A partir dos resultados obtidos nas análises de ceruloplasmina (Tabela 10), pôde-se verificar que houve efeito significativo da interação entre tratamento e tempo sobre o teor de ceruloplasmina ($P < 0,05$). Entretanto, não houve efeito dos tratamentos sobre os valores de ceruloplasmina ($P > 0,05$). Antonelli (2007), avaliando a prevenção da intoxicação cúprica acumulativa utilizando sal mineral rico em molibdênio, também não obteve diferença significativa da atividade de ceruloplasmina entre os tratamentos. Entretanto, estes resultados contrastam com os obtidos em estudo de "status" de Cu em ovelhas alimentadas com quantidades crescentes de cobre a partir de CuSO_4 ou cobre proteinado nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg da dieta, em que foi concluído que o Cu proteinado proporcionou maior atividade de ceruloplasmina comparada com o CuSO_4 (ECKERT et al. 1999).

Tabela 10 - Concentração média de ceruloplasmina de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e teores de cobre.

Tratamentos	Tempo (dias)				Efeito tempo
	0	28	56	84	P
Controle	2,35 ± 0,39 ^{Aa}	2,54 ± 0,42 ^{Aa}	2,08 ± 0,39 ^{Aa}	2,42 ± 0,42 ^{Aa}	P>0,05
CuSO₄ (10mg/kg)	2,34 ± 0,39 ^{Aa}	2,49 ± 0,39 ^{Aa}	1,33 ± 0,39 ^{Aa}	2,03 ± 0,39 ^{Aa}	P>0,05
CuSO₄ (30mg/kg)	1,99 ± 0,42 ^{Ba}	1,039 ± 0,39 ^{Bb}	1,22 ± 0,39 ^{Ba}	3,57 ± 0,39 ^{Aa}	P<0,05
Cu-metionina (10mg/kg)	1,49 ± 0,42 ^{Aa}	2,12 ± 0,39 ^{Aab}	1,67 ± 0,39 ^{Aa}	2,33 ± 0,39 ^{Aa}	P>0,05
Cu-metionina (30mg/kg)	1,61 ± 0,39 ^{Aa}	1,34 ± 0,39 ^{Ab}	1,71 ± 0,39 ^{Aa}	2,34 ± 0,39 ^{Aa}	P>0,05

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si (P>0,05) e médias seguidas de letras diferentes maiúsculas nas linhas e letras diferentes minúsculas nas colunas, diferem entre si (P<0,05).

Engle e Johnson (2003); trabalhando com novilhas suplementadas com diferentes fontes de cobre (CuSO₄ e complexo Cu-aminoácido) e teores (10 e 20mg/kg de MS) obtiveram maior atividade da ceruloplasmina com o Cu-aminoácido em relação ao CuSO₄ na dose de 20mg/kg de MS.

A ceruloplasmina é uma proteína sintetizada pelo fígado e responsável pelo transporte do cobre no organismo (O'DELL e SUNDE, 1997). Quando há um aumento do cobre no soro, é até certo ponto de se esperar que haja um aumento da ceruloplasmina. Como no presente estudo não houve aumento no cobre sérico, também não houve aumento na ceruloplasmina, o que mostra a coerência destes resultados.

6.8 Superóxido Dismutase (SOD)

À partir dos resultados das análises das atividades da enzima superóxido dismutase (SOD) nas amostras hepáticas (Tabela 11), a suplementação com cobre, independentemente da fonte e concentração, proporcionou maior atividade desta enzima no fígado dos cordeiros (P<0,05), quando comparado ao grupo controle.

Essa suplementação acima da dieta basal seja na forma de metionina ou na forma de sulfato resultou em aumento do teor de cobre no fígado, indicando uma positiva correlação entre o cobre no fígado e atividade da SOD, corroborando com o trabalho de Pal et al. (2010).

O aumento significativo da SOD confirma se tratar de uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos. Portanto, a suplementação com esse mineral pode aumentar sua atividade, (JONES & SUTTLE, 1981).

Os animais suplementados com Cu-metionina obtiveram maior atividade da SOD ($P < 0,05$) em relação aos suplementados com CuSO_4 . Porém, não houve efeito significativo da suplementação com cobre entre os teores dentro de cada fonte ($P > 0,05$). Esse resultado pode indicar que houve maior biodisponibilidade do elemento com o uso da fonte orgânica de cobre. E que a análise da SOD parece ser bastante sensível para se detectar o status do cobre no organismo.

Tabela 11 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína no fígado de ovinos Merino X texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

	Tratamentos (mg de cobre /kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO_4 10	CuSO_4 30	Cu- metionina 10	Cu- metionina 30		A	B	C	D
SOD ($\mu\text{mol/mg prot}$)	22,41 ^C	30,42 ^B	31,36 ^B	37,86 ^A	38,1 ^A	1,27	<0,01	<0,01	0,61	0,80
SOD (U/mL hom)	4480,9 ^C	6084,4 ^B	6271,3 ^B	7571,9 ^A	7660,5 ^A	253,90	<0,01	<0,01	0,61	0,80

Co = Dieta controle (sem suplementação de cobre); EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO_4 comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO_4 comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO_4 ; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

Em estudo sobre a Influência de diferentes teores e fontes de suplementação de cobre no desempenho, alguns parâmetros sanguíneos, digestibilidade e balanço mineral em cordeiros, a fonte e teor de cobre não teve nenhum efeito significativo

sobre a atividade de superóxido dismutase nos glóbulos vermelhos, entretanto, a capacidade antioxidante total aumentou entre os 0-65 dias, mas não houve diferenças significativas entre os tratamentos (DEZFOULIAN *et al.*, 2012)

Em trabalho de Pal *et al.*, (2010) a suplementação de Cu e Zn acima da dieta controle em ambas as fontes resultou em aumento da concentração dos elementos no plasma, assim como na atividade da SOD aos 30 dias, o que indicou uma positiva correlação entre o cobre e zinco com a atividade da SOD no plasma.

Um aumento da atividade da SOD no fígado ou sangue em função da suplementação com cobre foi também descrito em experimentos com ovinos, suínos e bovinos (XIN *et al.*, 1991; LAURIDSEN *et al.*, 1999a; LAURIDSEN, HOJSGAARD e SORENSEN, 1999b; SHARMA *et al.*, 2005; SENTHILKUMAR *et al.*, 2009; CORREA, 2010; CHENG *et al.*, 2011).

6.9 Biodisponibilidade do cobre

Na Figura 1 são apresentados os valores de cobre no fígado das diferentes fontes e teores com as respectivas equações de regressão para o sulfato de cobre e o cobre metionina. Houve um efeito linear das concentrações de cobre no fígado para as diferentes fontes ($P < 0,001$).

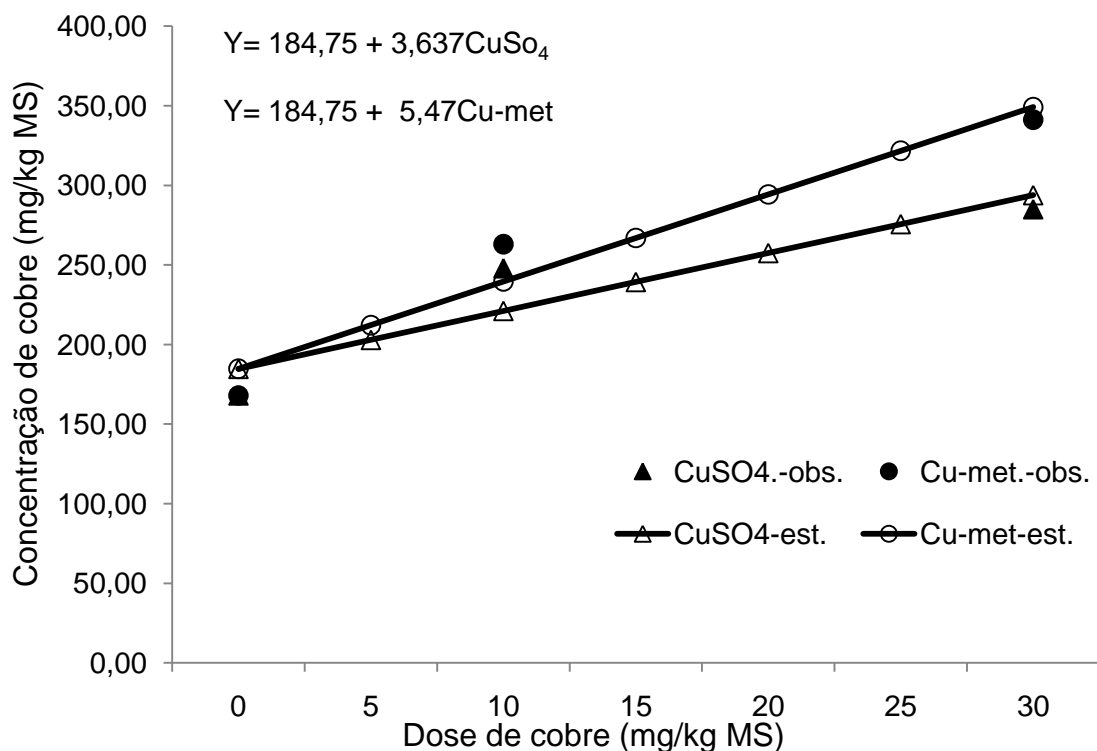


Figura 1- Concentração de cobre no fígado em mg/kg MS para as fontes orgânica e inorgânica com as respectivas equações de regressão.

A biodisponibilidade relativa do cobre, determinada pela concentração de cobre no fígado, utilizando a técnica do “slope ratio” segundo Ammerman et al. (1995), considerando o sulfato de cobre como padrão (100%), apresentou para o cobre metionina disponibilidade de 150,64%.

Pal et al. (2010), em estudo de biodisponibilidade comparando Cu-metionina e CuSO₄, utilizando como parâmetros valores de cobre hepático e atividade da SOD no fígado em ovelhas, a biodisponibilidade estimada pelo regressão múltipla “slope ratio” foi de 151%.

Os minerais constituintes de moléculas orgânicas são recomendados principalmente devido à sua maior biodisponibilidade, apesar de que isto nem sempre é comprovado cientificamente. Contudo, Wittenberg; Boila; Shariff, (1990) não encontraram melhor biodisponibilidade do proteinato de cobre comparado ao sulfato

de cobre. Entretanto, outros trabalhos encontraram resultados positivos para as fontes orgânicas semelhantes ao presente estudo (DU et al., 1996).

Os quelatos de minerais podem ser vantajosos por serem pequenos e por isso pode ser absorvido rapidamente sem entrar no mecanismo competitivo com outros íons no intestino; são compostos minerais mais estáveis, menos vulneráveis às interações adversas na área intestinal; podem garantir a suplementação de microelementos com dosagens inferiores às normalmente utilizados com os ingredientes inorgânicos, reduzindo os requisitos do nutriente para os animais; e podem reduzir os riscos de contaminação do meio ambiente. Porém, há necessidade de estudar melhor a seletividade dos agentes quelantes em relação aos minerais, à espécie e à quantidade mais efetiva, seu modo de ação e seu comportamento em diferentes espécies animais e interação com diferentes dietas. As necessidades dietéticas para minerais podem ser bem reduzidos pela adição de agentes quelantes à dieta animal, mas a relação custo benefício precisa ser mais bem estabelecida.

7 CONCLUSÕES

A suplementação com as diferentes fontes de cobre em diferentes concentrações utilizados acima das exigências não influenciou o desempenho de cordeiros mestiços Merino x Texel, não foram observados sintomas clínicos de intoxicação nos animais recebendo cobre acima das recomendações por um período de 90 dias .

A suplementação com cobre acima das exigências aumentou o teor de cobre no fígado e rim, mas não alterou o cobre no sangue e no músculo.

A ceruloplasmina não sofreu alteração com a suplementação de cobre na dieta, mas a Superóxido Dismutase se mostrou sensível.

A biodisponibilidade do cobre metionina foi superior à do cobre inorgânico quando determinada pelo acúmulo no fígado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONELLI, A. C., **Avaliação do uso de um sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos**, Tese (doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007. 122f.

AMMERMAN, C. B. et al., *Bioavailability of nutrients for animals*: London, Academic press, 1995.

ANDRIGUETTO, J. M. e. al., 1981, Os minerais na nutrição animal, Nobel, São Paulo, *Nutrição animal*, p. 173-255.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 1999. 395p. v.1.

AAFCO. Association of American Feed Control Officials. Official Publication. Oxford, 2000.

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

BAKER, D. H., and AMMERMAN, C. B., 1995. Cooper Bioavailability, in Ammerman, C. B., Baker, D. H., Lewis, A. J., ed., *Bioavailability of nutrients for animals*: London, Academic press, p. 127-149.

BAMPIDIS, V. A., et al., Serum enzyme status of Chios ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate. **Research in Veterinary Science**. 88 (2010) 456-457.

BERCHIELLI, T.T. et al. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583.p.

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

CHENG, J. et al. Effects of different copper sources and levels on plasma superoxide dismutase, lipid peroxidation, and copper status of lambs. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 144, n. 1-3, p. 570-579, Dec. 2011. Disponível em: <ISI>://WOS:000298192900056>. Acesso em: 2 dez. 2011.

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

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. 124 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

DEZFOULIAN, A. H. et al., Influence of different levels and sources of copper supplementation on performance, some blood parameters, nutrient digestibility and mineral balance in lambs. **Livestock Science**, v.147, 9-19, 2012.

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

ENGLE, T. E.. Effects of mineral nutrition of immune function and factors that affect trace mineral requirements of beef cattle. In: RANGE BEEF COW SYMPOSIUM, 2001, Nebraska. Proceedings... Nebraska : University of Nebraska, 2001.

ENGLE, T. E. e JOHNSON, L. R. The effects of copper sources and concentration on lipid metabolism in growing and finishing Angus steers. **Asian Australasian Journal of Animal Science**. 2003 Vol 16, No 8: 1131-1136

FERREIRA, W. M. et al., **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, n.6, p.636-42, 2002.

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.

IVAN, M. Effect of faunation on ruminal solubility and liver content of copper in sheep fed low or high copper diets. **Journal of animal science**. 1998. 66:1496-1501.

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. 916p.

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

LAURIDSEN, C. et al. Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E, and copper. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 1, p. 105-115, Jan. 1999a. Disponível em: <ISI>://WOS:000078553000013>. Acesso em: 12 ago. 2011.

LAURIDSEN, C.; HOJSGAARD, S.; SORENSEN, M. T. Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E, and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 4, p. 906-916, Apr. 1999b. Disponível em: <ISI>://WOS:000084444800015>. Acesso em: 12 ago. 2011.

LUGINBUHL, J.M., POORE, M.H., SPEARS, J.W., BROWN, T.T., 2000. Effect of dietary copper level on performance and copper status of growing meat goats. *Sheep Goat Res. J.* 16, 65–71.

LUZA, S. C., and H. C. SPEISKY, 1996, Liver copper storage and transport during development: Implications for cytotoxicity: **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. S812-S820.

MacPHERSON, A.; HEMINGAY, R. G. The relative merit of various blood analyses and liver function tests in giving an early diagnosis of chronic copper poisoning in sheep. **British Veterinary Journal**, v. 125, n. 5, p. 213-221, 1969.

MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. 7.ed. Belo Horizonte: CVP Consultoria Veterinária e Publicações, 2003.

MAYNARD, L.A. **Nutrição animal**. 3.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1984.p.260-280.

McCORD, J. M.; FRIDOVIC. I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 244, n. 22, p. 6049-6055,1969. Disponível em: <ISI>://WOS:A1969E736300001>. Acesso em: 12 ago. 2011.

McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. New York: Academic Press, 1992.

McDOWELL, L., 2003, Minerals in animal and human nutrition, Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science B.V, p. 235-270.

MILES, P.H., WILKINSON, N. S., McDowell, L. R. **Analysis of minerals for animal nutrition research**. 3a ed. Department of Animal Sciences – University of Florida. Gainesville, Florida, USA 2001.

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.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Mineral tolerance of animals**. 2 ed, Washington: National Academy Press, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL . **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. Washington: National Academy Press, 2007

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

ORTOLANI, E. L. Intoxicações metabólicas em ovinos: Intoxicação cúprica, In: SILVA SOBRINHO, A. G.; BATISTA, A. M. V.; SIQUEIRA, E. R.; ORTOLANI, E. L.; SUSIN, I.; SILVA, J. I. C.; TEIXEIRA, J. C., BORBA, M. F. S.. **Nutrição de ovinos**, Jaboticabal: Funep, 1996. P. 241-246.

PAL, D. T., N. K. S. GOWDA, C. S. PRASAD, R. AMARNATH, U. BHARADWAJ, G. S. BABU, and K. T. SAMPATH, 2010, Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes: **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 24, p. 89-94.

ROEPCKE, C. B. S. ; **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. Curitiba, 2007, 133 p. Dissertação de mestrado em Processos Biotecnológicos - Universidade Federal do Paraná.

SALVADOR, S.C. et al. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos I: consumo e digestão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, Jun/ 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352008000300024&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 31 out. de 2009.

SAS Institute Inc. 2004. SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SAYLOR W. W. e LEACH Jr. R. M. Intracellular Distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. **The journal of nutrition**. 2008.

SENTHILKUMAR, P. 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**, Dordrecht, v. 41, n. 4, p. 645-653, Apr. 2009. Disponível em: <ISI>://WOS:000264334400031>. Acesso em: 17 nov. 2011.

SCHOSINS.Kh, H. P. LEHMANN, and M. F. BEELERr, 1974, Measurement of ceruloplasmina from its oxidase activity in serum by use of ortho-dianisidine dihydrochloride: **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 1556-1563.

SHARMA, M. C. et al. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. **Research in Veterinary Science**, London, v. 79, n. 2, p. 113-123, Oct. 2005. Disponível em: <ISI>://WOS:000230549600005>. >. Acesso em: 17 nov. 2011.

SILVA SOBRINHO, A. G. **Nutrição de Ovinos**. Jaboticabal. FUNEP. 258 p. 1996.

SOARES, P. C. Efeitos da intoxicação cúprica e do tratamento com tetratiomolibdato sobre a função renal e o metabolismo oxidativo de ovinos. São Paulo, 2004, 117.f. Disponível em: <HTTP://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/.../Pierre_Castro_Soares.pdf > Acesso em: 04 ago 2011

SPEARS, J. W. Micronutrients and immune function in cattle. In: **Nutrition society**, 59., 2000, Raleigh. Proceedings... Raleigh: NC, 2000. p. 587–594.

SPEARS, J.W.; Organic trace minerals in ruminant nutrition. **Anim. Feed Sci. Techn.**, v.58, p.151-163, 1996.

SPEARS, J. W. Trace mineral bioavailability in ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1506S–1509S, 2003.

TOKARNIA, C. H., et al. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos. Revisão dos estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. **Pesq. Vet. Bras.** 19(2):47-62, abr./jun. 1999.

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

UNDERWOOD, E. J., 1983, Los minerales en la nutrición del ganado, Zaragoza, Ditorial Acriba, p. 1-7; 107-127.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. The mineral nutrition of livestock. 3.ed. New York: CABI, 1999. 624p

THRALL, M. A., et al., Veterinary hematology and clinical chemistry. Ames, Iowa, Blackwell Publishing, c2006 Oxford, England. x, 518 p. [001587089]

WITTENBERG, K. M., BOILAA, R. J. & SHARIFF, M. A. (1990) Comparison of copper sulfate and copper proteinate as copper sources for copper-depleted steers fed high molybdenum diets. **Can. J. Anim. Sci.** 70: 895–904.

XIN, Z., WATERMAN, D. F., HEMKEN, R. W. et al. Effects of copper status on neutrophil function, superoxide dismutase, and copper distribution in steers. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 3078-3085, 1991.

ZANETTI, M. A.; **Revista Brasileira do Zebu e seus Cruzamentos**, ABCZ Ed. 52 set/2009. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/revista/materia.php?mostrar=%20Edi%20a%20N%2052%20-%20setembro/2009&id=4185>> Acesso em: 29 de set. de 2010.

ZANETTI, M.A. & PETTINATI, R.L., Balanço de fontes orgânicas e inorgânicas de selênio, **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 26, n. 4, p. 455-460, 1991.

ZANETTI, M. A., CUNHA, J. A., Biodisponibilidade de Fontes Orgânicas e Inorgânicas de Selênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n.3, 623-7, 1997.

ZERVAS, G., NIKOLAOU, E., and MANTZIOS, A., Comparative study of chronic copper poisoning in lambs and young goats. **Anim. Proc.** V.50, 497-506, 1990.