

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE CROMO (Cr) SOBRE
O DESEMPENHO PRODUTIVO, A POPULAÇÃO DE
PROTOZOÁRIOS E A RESPOSTA IMUNITÁRIA EM
OVINOS**

BRUNO STÉFANO LIMA DALLAGO

ORIENTADOR: HELDER LOUVANDINI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 004/2008

**BRASÍLIA, DF
MAIO/2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Efeitos da Suplementação de Cromo (Cr) Sobre o Desempenho
Produtivo, a População de Protozoários e a Resposta Imunitária em
Ovinos

BRUNO STÉFANO LIMA DALLAGO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

Helder Louvandini, Prof. Dr. (Universidade de Brasília- UnB)
(ORIENTADOR)

Marcio Botelho de Castro, Prof. Dr. (Universidade de Brasília- UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

Roberto Guimarães Júnior, Dr. (EMBRAPA/Cerrados)
(EXAMINADOR EXTERNO)

Brasília/DF, 15 de Maio de 2008

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DALLAGO, B. S. L. **Efeitos da Suplementação de Cromo (Cr) Sobre o Desempenho Produtivo, a População de Protozoários e a Resposta Imunitária em Ovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 65p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dallago, Bruno Stéfano Lima

Efeitos da Suplementação de Cromo (Cr) Sobre o Desempenho Produtivo, a População de Protozoários e a Resposta Imunitária em Ovinos.

Orientação de Helder Louvandini- Brasília, 1998.

65 p.: Il.

Dissertação de Mestrado (M)- Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Anticorpos. 2. Cordeiros. 3. Linfócitos. 4. Nutrição. I. Louvandini, H. II. Título.

CDD

Agris/ FAO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais: Maricélia e Claudio, que não mediram esforços, suor e trabalho para garantir minha formação cultural, profissional e intelectual.

AGRADECIMENTOS

Obrigado Deus, por me conceder saúde e vontade para prosseguir, curiosidade para procurar, perseverança para acreditar, persistência para resistir, discernimento para escolher e paciência para raciocinar. Obrigado pela oportunidade concedida: vir ao mundo fazendo parte de uma família maravilhosa e bem estruturada. Agradeço por guiar meus passos, pelas facilitações que encontrei nesta trajetória e também por todos os obstáculos e adversidades que tive de enfrentar. Estas graças surgiram nos momentos apropriados e foram extremamente importantes para o meu aprendizado e desenvolvimento científico e cultural. Tudo fez parte do cenário e do enredo necessário para conquistar o objetivo proposto: ser MESTRE.

Agradecimentos especiais ao prof. Dr. Helder Louvandini por me dar o privilégio de ser seu orientado. Obrigado por ser um ponto de apoio em todos os momentos necessários. Agradeço por me ensinar os segredos da pesquisa e da ciência. Por abrir inúmeras portas e me ajudar a ser uma pessoa melhor.

À querida professora Dra. Connie por ser uma verdadeira mãe dentro da Universidade: sem o seu apoio professora, este trabalho não teria se concretizado.

Agradeço aos professores que me acompanharam nesta jornada. Em especial às professoras Giane Regina Paludo e Andréia Maranhão.

Ao Laboratório de Química Analítica de Plantas/CPAC/EMBRAPA.

Obrigado aos meus estagiários: Denise Caldeira, Edgard Franco, Aline Campeche, Rosana Branquinho, Pedro Ferreira, Tiago Paim, Bárbara Borges, Alessandro dos Santos, Juliana Silva, Amanda Antonelli, Danilo Montalvão e Eduardo Caixeta pela amizade, empenho e zelo com o experimento e com o Centro de Manejo de Ovinos. Tenho a certeza que vocês aprenderam muito no decorrer deste experimento.

Aos funcionários do CMO que se comprometeram com o sucesso do projeto: senhores Antônio Fernandes e Vilmar Padinho.

À responsável técnica do Laboratório de Nutrição Animal Margareth de Oliveira por realizar as análises bromatológicas necessárias para o sucesso do experimento.

Às residentes do Hospital Veterinário: Marta Vasconcelos, Tatiana Guerrero, Laís Greco Silva e Roberta Rendy; Vanessa Mustafa, Erika de Queiroz e Cristiane Vinhaes. Também agradeço pela ajuda à Nara de Almeida e à Thaís Sermoud Borges.

Obrigado à farmacêutica Rosângela Batista Vasconcelos que concordou em ir à UnB de madrugada para realizar o radioimunoensaio e também ao biólogo Rafael Burtet pelo apoio durante os testes de ELISA.

Àqueles que desejam e sempre desejaram o meu bem: meus tios, tias, primos, primas e à família Vasconcelos Braz pelo apoio e incentivo em todas as horas. Vocês fazem parte desta vitória!

À Shélida por ser minha companheira e preocupar-se comigo. Por ser especial, compreensiva e incentivar sempre o meu crescimento profissional. Por todo o seu carinho, amor, atenção e zelo. Muito obrigado!

Aos meus irmãos Brenno e Renzo pelo carinho, amizade, amor e paciência, pois com vocês tenho a certeza de que o convívio diário é um eterno aprendizado.

Finalmente, imensos agradecimentos à dupla de heróis que são meus pais Claudio e Maricélia. Obrigado eternamente pelo esforço diário em manter um ambiente favorável ao meu aprendizado. Pelo abraço amigo e colo aconchegante nos momentos necessários, pelos conselhos e ensinamentos que usarei como preceitos por toda a minha vida. Por serem assim: como vocês são!!!

A todos vocês, MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de determinar a influência da suplementação de cromo (Cr) dietético sobre o desempenho produtivo, população de protozoários ruminais e resposta imunitária em ovinos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições. Para tanto foram utilizados 24 ovinos inteiros da raça Santa Inês com peso vivo médio inicial de $22,89 \pm 2,23$ kg e idade aproximada de três meses e 15 dias distribuídos em quatro tratamentos com níveis crescentes de cromo suplementar na dieta sob a forma de picolinato de cromo (CrPic): placebo; 0,250; 0,375 e 0,500 mg de Cr/dia. A duração do experimento foi de 99 dias, dos quais os 15 primeiros dias foram destinados à adaptação às instalações e ao alimento a ser fornecido durante o experimento (feno de *Panicum maximum* cv Massai e concentrado composto por 85% de farinha de mandioca, 11,5% de sal mineral e 3,5% de uréia). A suplementação com cromo foi feita durante os 84 dias restantes. Durante o período experimental os animais permaneceram confinados em baias individuais. A quantidade de alimento oferecido foi mensurada diariamente enquanto o controle da quantidade de sobras foi realizado três vezes por semana. As pesagens dos animais foram realizadas quinzenalmente. Amostras de líquido ruminal foram colhidas no primeiro dia e nos dias 21, 43, 63 e 84 do experimento para quantificação de protozoários ruminais. Nos dias 28° e 56° de experimentação, os cordeiros foram desafiados com aplicação intramuscular de albumina de ovo para posterior quantificação de IgG sérica específica. Avaliação da imunidade celular foi feita por teste cutâneo de hipersensibilidade retardada utilizando fitohemaglutinina (PHA). O Cr suplementar não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) sobre o desempenho produtivo e imunidade humoral, mas afetou negativamente ($P < 0,05$) a população de protozoários ruminais e a resposta imunitária celular dos ovinos.

ABSTRACT

The effect of chromium supplementation on performance, ruminal protozoa and immune response of lambs was investigated using 24 lambs of Santa Inês breed with initial average weight of 22.89 ± 2.23 kg. The lambs were assigned in four treatments with different levels of chromium picolinate (CrPic): placebo, 0.250, 0.375 and 0.500 mg of Cr/day. The lambs were kept in individual pens during two weeks for adaptation and 84 days for chromium supplementation and were feed with *Panicum maximum* cv Massai hay and concentrate (85% of cassava flour, 11.5% of mineral salt and 3.5% of urea). The control of quantity of food offered was measured daily and the control of orts was taken three times a week. The lambs were weighted every two weeks. Samples of ruminal contents were taken in the first and at 21st, 43rd, 63rd e 84th days of experiment to quantify the protozoa population. On day 28 and 56, the lambs were injected with chicken ovalbumin. Serum samples were subjected to an ELISA tests in order to measure the antibody production to chicken ovalbumin. The cell-mediated immune response was determined by a delayed type hypersensitivity test (DTH) using phytohemagglutinin (PHA). The performance and humoral immunity were not affect by CrPic supplementation on lambs ($P>0.05$), but impaired the rumen protozoa population and the cellular immunity ($P<0.05$).

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	2
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 <i>Cenário da Ovinocultura Nacional e no Distrito Federal</i>	3
3.2 <i>História da Utilização do Cromo</i>	3
3.3 <i>Importância do Cromo</i>	4
3.4 <i>Caracterização Física e Química do Cromo</i>	7
3.5 <i>Cromo no Ambiente</i>	8
3.6 <i>Cromo nos Sistemas Biológicos e Fontes de Cromo</i>	9
3.7 <i>Cromo como Suplemento Alimentar</i>	11
3.8 <i>Metabolismo do Cromo</i>	13
3.9 <i>Cromo, Metabolismo e Produção Animal</i>	15
3.9.1 <i>Fator de Tolerância à glicose X Cromodulina</i>	17
3.9.2 <i>Cromo e o Metabolismo dos Carboidratos</i>	18
3.9.3 <i>Cromo e o Metabolismo dos Lipídios</i>	21
3.9.4 <i>Cromo e o Metabolismo de Proteínas</i>	22
3.9.5 <i>Cromo e o Metabolismo de Ácidos Nucléicos</i>	22

3.9.6 <i>Cromo e Produção Animal</i>	23
3.10 <i>Protozoários Ruminais e a Suplementação com Cr</i>	24
3.11 <i>Cromo e Imunidade</i>	25
3.11.1 <i>Imunidade Celular</i>	26
3.11.2 <i>Imunidade Humoral</i>	29
3.11.3 <i>Resistência a Doenças</i>	29
Capítulo Único	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 <i>Local</i>	35
2.2 <i>Animais e Instalações</i>	35
2.3 <i>Manejo Alimentar, Adaptação e Tratamentos</i>	35
2.4 <i>Colheita do Líquido Ruminal, pH ruminal e Contagem de Protozoários Ruminais</i>	37
2.5 <i>Determinação do Cromo</i>	37
2.6 <i>Desempenho Produtivo</i>	38
2.7 <i>Resposta Imunitária Humoral</i>	38
2.8 <i>Resposta Imunitária Celular</i>	39
2.9 <i>Delineamento Experimental e Análises Estatísticas</i>	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

3.1 <i>Consumo de Cromo e Desempenho Produtivo</i>	41
3.2 <i>pH Ruminal e Contagem de Protozoários Ruminais</i>	45
3.3 <i>Resposta Imunitária Humoral</i>	46
3.4 <i>Resposta Imunitária Celular</i>	48
4. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do Picolinato de Cromo (CrPic).	12
Figura 2. Protozoários ruminais corados com solução TBFS.	37
Figura 3. Mensuração da dobra de pele após injeção intra-dérmica de PHA.....	39
Figura 4. Concentração de protozoários ruminais em função do cromo suplementar.	45
Figura 5. Relação entre a espessura da dobra de pele após a injeção de PHA, (hipersensibilidade cutânea retardada) e o tempo.....	49
Figura 6. Relação entre o teor de Cr consumido e os coeficientes angulares das retas geradas a partir dos valores de dobra da pele após injeção de PHA.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sinais/Sintomas relacionados à deficiência de Cr e espécies envolvidas em cada processo.	7
Tabela 2. Composição bromatológica dos alimentos fornecidos aos ovinos em g kg ⁻¹ de matéria seca (MS).	36
Tabela 3. Médias dos valores referentes ao consumo com base na matéria seca (MS) e desempenho produtivo dos ovinos.	41
Tabela 4. Valores médios de absorvância no teste de ELISA.	46

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

APB	Tampão fosfatase alcalina
CMD	Consumo médio de matéria seca
Con A	Concanavalina A
Cr	Cromo
Cr⁺³	Cromo trivalente
Cr⁺⁶	Cromo hexavalente
CrCl₃	Cloreto de cromo
CrPic	Picolinato de cromo
DNCB	Dinitroclorobenzeno
DTH	Teste cutâneo de hipersensibilidade retardada.
ELISA	Ensaio imunossorbente ligado à enzima
g	Gramas
GMD	Ganho médio diário em peso
GT	Ganho em peso total
GTF	Fator de tolerância à glicose
HDL	Lipoproteína de alta densidade
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenoso
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL2	Interleucina 2
kg	Quilograma
km	Quilômetro
L	Litro

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMWCr	Substância ligante de cromo de baixo peso molecular
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm³	Milímetro cúbico
MS	Matéria seca
nm	Nanômetro
° C	Grau celsius
PBS	Tampão salina fosfato
PBST	Tampão salina fosfato Tween
PF	Peso final
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Peso inicial
PNPP	Para-nitro-fenil-fosfato
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
PWM	Mitógeno derivado da <i>Phytolacca americana</i>
rpm	Rotações por minuto
TBFS	Trypan blue formol salina
T_H1	Linfócito T auxiliar (helper)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
vol.	Volume

INTRODUÇÃO

Atualmente a premissa de que “a nutrição é um determinante da resposta imunitária e do desempenho produtivo” é amplamente aceita. Dados epidemiológicos e clínicos em humanos sugerem que as deficiências nutricionais alteram a imunocompetência e aumentam o risco de infecções. Em animais, diversos autores observaram as interações entre o estado nutricional do hospedeiro e a capacidade destes em debelar as infecções. Nesse contexto, a importância da energia e principalmente da proteína dietética na formação da resistência e na manutenção da resiliência do hospedeiro em relação ao desafio imunológico está relativamente bem estabelecida. Entretanto, com exceção de uns poucos elementos como o Selênio e o Zinco, o papel dos microminerais na interação hospedeiro-patógeno ainda permanece obscuro apesar de diversos elementos, entre eles o cromo (Cr), serem apontados como capazes de influenciar as atividades do sistema imunitário.

De maneira semelhante, pouco se sabe sobre a atuação do cromo no desempenho produtivo dos animais de produção, tanto no que se refere aos mecanismos de ação desse mineral quanto em relação ao resultado final de sua suplementação sobre o organismo animal. Pesquisas recentes nesse campo da nutrição tentam elucidar essas questões por meio da observação e análise dos resultados obtidos após a suplementação dietética do elemento. Contudo, os resultados obtidos nesses ensaios têm apresentado grande disparidade de modo que em algumas situações a suplementação de cromo tem se mostrado benéfica em termos de produtividade e imunidade enquanto que, em outras situações, não demonstrou qualquer interferência significativa.

Portanto, definir a influência da suplementação de cromo sobre os parâmetros imunitários e produtivos poderá fornecer mais uma ferramenta no combate às diversas enfermidades e auxiliará na busca por maior produtividade.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por finalidade determinar a influência e os efeitos da suplementação de cromo (Cr) dietético em níveis crescentes sob a forma de picolinato de cromo (CrPic) no desempenho produtivo, na resposta imunitária e no líquido ruminal em ovinos Santa Inês.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Mensurar o consumo alimentar;
- Quantificar o ganho em peso;
- Determinar a quantidade de protozoários ruminais após suplementação com CrPic;
- Determinar a produção de anticorpos em resposta ao desafio imunológico;
- Quantificar a resposta imunitária celular por meio de ensaio de hipersensibilidade retardada.

REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Cenário da Ovinocultura Nacional e no Distrito Federal*

Embora a ovinocultura no Brasil seja uma atividade em expansão, apresentando crescimento de 12,6% do rebanho (de 14,3 para 16,1 milhões de indivíduos) no período de 2002 a 2007 (ANUALPEC, 2007), o país não é auto-suficiente em carne ovina e importa cerca de 80% da carne consumida. A carne nacional não tem qualidade para competir com a do mercado externo e nem é produzida em quantidade suficiente para isso. Mesmo com o aumento da produção nacional de carne ovina, ainda existe um déficit que, segundo as estimativas, tende a persistir, pois a demanda é superior à oferta, dando espaço para as importações (SOUZA, 2006). Deste modo, maior eficiência do setor visando suprir o mercado com carne em maior quantidade e qualidade pode reduzir a dependência da produção externa e incentivar o crescimento econômico nacional.

No centro-oeste do Brasil, região considerada favorável à criação de ovinos em virtude das condições climáticas e ambientais (SIQUEIRA et al. 1986), a ovinocultura se instalou inicialmente como atividade de subsistência, constituindo importante fonte de proteína na alimentação da população em áreas rurais. Contudo, a aplicação de tecnologia adequada nos diversos campos do conhecimento como nutrição, genética, reprodução e sanidade entre outros e a utilização de técnicas de manejo apropriadas auxiliam no desenvolvimento da ovinocultura como atividade econômica, despontando na região como principal atividade em diversas fazendas (ONDEI, 2004).

3.2 *História da Utilização do Cromo*

O cromo foi descoberto na Rússia no ano de 1765 por P. S. Pallas, mas o elemento somente foi isolado em 1797 pelo químico francês Louis-Nicholas Vauquelin (1763-1829) (ARFSTEN, 1998) que separou o metal ao tratar a crocoíta ($PbCrO_4$), um minério advindo da Sibéria, com ácido clorídrico diluído. O óxido crômico (Cr_2O_3), resíduo dessa reação, quando foi aquecido na presença de carvão (agente redutor) produziu o metal Cr.

O termo “cromo” que deriva da palavra grega *chroma* e significa “cor” foi sugerido a Vauquelin por Antoine Fourcroy para denominar o novo elemento devido às

várias cores de seus compostos (ASIMOV, 1980). Um ano após a descoberta de Vaulquelin, o químico alemão Tassaert encontrou o cromo em um novo minério chamado de cromita, cuja fórmula molecular é $(\text{FeCrO}_2)_2$ (WEBELEMETNSTM, 2008).

Em 1820, o dicromato de potássio já era utilizado como pigmento em produtos da indústria têxtil e desde 1879 o minério cromita era rotineiramente utilizado na fabricação de refratários de altas temperaturas (ARFSTEN, 1998). No início do século XX, o cromo tornou-se um importante ingrediente das ligas metálicas resistentes à corrosão, sendo utilizado largamente com essa finalidade até os dias atuais (ENSMINGER et al., 1990).

A indicação do cromo como nutriente alimentar somente foi suscitada após a descoberta dos cientistas W. Mertz e K. Schwartz de que sais de cromo corrigiam o metabolismo anormal de açúcares em ratos alimentados com dietas baseadas no consumo de leveduras (ENSMINGER et al., 1990). Posteriormente, diversos experimentos indicaram os aspectos positivos da utilização de cromo na alimentação (JEEJEEBHOY et al. 1977; ABRAHAM et. al. 1982a,b; ANDERSON, 1987), de modo que até hoje esse mineral é utilizado como suplemento dietético por humanos, em especial por atletas no intuito de controlar o apetite, perder peso, “melhorar” a composição corporal – aumentando a proporção de músculos – reduzir o colesterol e prevenir o diabetes (VINCENT, 2004). Entretanto, existem dúvidas sobre a eficiência e inocuidade do cromo como suplemento alimentar. Nas últimas décadas inúmeros experimentos tentam elucidar as conseqüências da utilização de cromo na alimentação, mas apenas resultados controversos têm sido alcançados.

3.3 Importância do Cromo

Embora não exista um consenso sobre a essencialidade do cromo para os animais, muitos pesquisadores classificam esse micromineral como um elemento essencial por ativar certas enzimas e estabilizar proteínas e ácidos nucléicos. Em adição, provavelmente possui atividade sobre o metabolismo, sanidade e desempenho tanto nos animais de produção como nos animais de laboratório e em humanos (SELL, 1997).

Alguns pesquisadores têm revelado a importância de mais estudos em relação à utilização de cromo como suplemento alimentar ao apontarem falhas nos experimentos realizados com esse elemento-traço (como exemplo: não há provas de que os animais utilizados em alguns estudos estivessem de fato com deficiência de cromo) (VINCENT,

2003a) e indicarem a possibilidade de efeitos tóxicos associados ao uso desse mineral (WOSKI et al., 1999; STEARNS et al. 2002; SUBRAMANIAN et al., 2006). Dessa maneira, a importância do cromo e seu papel no metabolismo e homeostase são pontos questionados desde que sua essencialidade foi proposta por Schwarz & Mertz em 1959 (VINCENT, 2003a; ABOUL-ENEIN et al., 2005; LAY & LEVINA, 2008).

Esses dois estudiosos demonstraram um aumento na tolerância à glicose (capacidade de entrada da glicose nas células) em ratos após a suplementação de cromo trivalente (SCHWARZ & MERTZ, 1959). Posteriormente diversos estudos foram realizados com a finalidade de estabelecer o papel do cromo sobre o metabolismo, imunidade e sobre os parâmetros produtivos. No entanto, com exceção de sua influência sobre o metabolismo da glicose e atuação junto à insulina, o papel do cromo sobre os outros aspectos tem apresentado resultados controversos.

O principal papel fisiológico do cromo é potencializar a ação da insulina ao facilitar a interação entre esta substância e seus receptores. Isto se deve, provavelmente, à presença de Cr na molécula organometálica denominada “fator de tolerância à glicose” (GTF) (ANDERSON & BRANTNER, 1977; EVANS & BOWMAN, 1992; STRIFFLER et al., 1993). Na ausência de Cr^{3+} , o GTF é inativo e acredita-se que sua molécula seja composta de Cr^{3+} , ácido nicotínico, ácido glutâmico, glicina e cisteína (TOEPFER et al. 1977). Entretanto, até a existência do fator de tolerância à glicose é questionada, de modo que alguns pesquisadores acreditam ser esta molécula um artefato de técnica (SUMRALL & VINCENT, 1997; VINCENT, 2003a; VINCENT & STALLINGS, 2007).

Além disso, o metabolismo protéico, lipídico e de ácidos nucléicos podem ser sensíveis à suplementação de cromo (ANDERSON, 1987), mas isso ocorre, provavelmente, por efeitos indiretos do mineral que potencializa a ação da insulina e assim interfere no metabolismo como um todo (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

Tezuka et al. (1991) demonstraram que o Cr possui propriedades antioxidantes *in vivo* (por ser encontrado principalmente na forma trivalente quando no organismo animal) e é importante na ativação de algumas enzimas e na manutenção da estabilidade de proteínas e ácidos nucléicos (BOREL & ANDERSON, 1984). A suplementação de cromo em humanos melhorou a tolerância à glicose em pacientes com diabetes tipo II, diminuiu os níveis de LDL séricos e reduziu o teor de gordura corporal (McCARTY, 1993). Em adição, McCarty (1994) levantou a hipótese de que a suplementação de cromo a longo prazo reverteria a tendência que o cérebro apresenta em resistir à ação da insulina com o

aumento da idade, melhorando a função hipotalâmica e da glândula pituitária, além de atuar sobre a homeostase da glicose, o que inclui o controle do apetite, do metabolismo intermediário e da termoregulação. Segundo Burton et al. (1996), outra possibilidade interessante, é que a suplementação de Cr aumenta a longevidade e retarda os processos associados à idade através da melhora da função imunitária e aumento da resistência à doenças infecciosas.

Por outro lado, estudo recente não verificou qualquer efeito benéfico da utilização de cromo dietético (VINCENT, 2003b) e outras pesquisas apontaram o cromo como sendo responsável por danos ao organismo. Como exemplo, Stearns et al. (1995) afirmam que o picolinato de cromo causa danos aos cromossomos enquanto Hepburn et al. (2003) relataram danos oxidativos ao DNA *in vivo* e Stearns et al. (2002) observaram danos às mitocôndrias, ocorrência de apoptose além de classificarem o metal como substância mutagênica.

Embora seja relativamente rara, a deficiência de cromo provavelmente está relacionada a sintomas similares àqueles da diabetes, pois na ausência de cromo a atividade da insulina fica prejudicada. Esses sintomas podem incluir diminuição da tolerância à glicose, crescimento prejudicado, diminuição da fertilidade, elevação da concentração de insulina sérica, glicosúria, elevação das concentrações de colesterol e triacilgliceróis no sangue, desordens cerebrais, neuropatia periférica e trombose. (BOREL & ANDERSON, 1984). A Tabela 1 resume os principais achados clínicos relacionados à deficiência de cromo e as espécies que foram envolvidas nas respectivas alterações. Contudo, confirmar o estado de deficiência de Cr é extremamente difícil e embora diversos estudos tenham utilizado técnicas de tolerância à glicose para mensurar a resposta ao cromo suplementar, este procedimento não é prático quando realizado com um grande número de animais amostrados (ANDERSON, 1987).

Mesmo com a polêmica em torno do papel desempenhado pelo cromo dietético no metabolismo, no desempenho produtivo e atlético, na imunidade, nos parâmetros reprodutivos e no tratamento de certas doenças, e apesar da inocuidade desse mineral ser questionada de maneira contundente por muitos experimentos, no comércio de suplementos alimentares, as vendas de produtos contendo cromo ficam atrás somente da comercialização de suplementos contendo cálcio e são estimadas em US\$ 500.000.000,00 por ano apenas nos E.U.A. (MIRASOL, 2000). No campo da nutrição animal, o comércio de produtos contendo cromo para suplementação alimentar está em

franca expansão. Há no mercado diversos produtos cujo principal apelo publicitário é o aumento de rendimento dos animais, diminuição do cortisol plasmático, diminuição da liberação de ácido láctico além da melhora do *status* imunitário.

Tabela 1. Sinais/Sintomas relacionados à deficiência de Cr e espécies envolvidas em cada processo.

Sinal/Sintoma	Espécies
Intolerância à glicose	Humano, rato, mico-de-cheiro, porquinho-da-índia
Hiperinsulinemia	Humano, rato, suíno
Glicosúria	Humano, rato
Hiperglicemia pós-prandial	Humano, rato, camundongo
Crescimento prejudicado	Humano, rato, camundongo, peru
Hipoglicemia	Humano
Níveis séricos aumentados de colesterol	Humano, rato, camundongo, bovino, porco
Níveis séricos aumentados de triglicerídios	Humano, rato, camundongo, bovino, porco
Aterosclerose	Coelho, rato, camundongo
Neuropatia	Humano
Encefalopatia	Humano
Lesões de córnea	Rato, mico-de-cheiro
Glaucoma	Humano
Diminuição da fertilidade	Rato
Diminuição da quantidade de espermatozóides	Rato
Diminuição da longevidade	Rato, camundongo
Diminuição do número de receptores para insulina	Humano
Aumento da gordura corporal	Humano, suíno
Aumento da morbidade	Bovino

Fonte: Anderson, 1994 com adaptações.

3.4 Caracterização Física e Química do Cromo

O cromo é um metal de transição pertencente à família 6B da tabela periódica. Possui número atômico 24 e massa molecular de 51,996. Apresenta-se sólido à

temperatura ambiente e possui coloração variando do cinza ao vermelho, passando pelo verde. O cromo elementar apresenta as seguintes características: temperatura de fusão de 1900 °C enquanto o ponto de ebulição é 2672 °C; possui densidade relativa ($H_2O=1$) a 20 °C de 7,2; é insolúvel em água (SILVA & PEDROZO, 2001). Ocorre na natureza em diversos estados de oxidação, variando do Cr^{-2} a Cr^{+6} (PECHOVA & PAVLATA, 2007). Porém, os estados de oxidação mais comuns do cromo são as formas tri e hexavalente (Cr^{+3} e Cr^{+6} respectivamente).

3.5 Cromo no Ambiente

Embora não seja objeto direto deste estudo, a presença de cromo no ambiente, independente de sua forma, pode interferir em maior ou menor grau sobre a quantidade de cromo disponível e até mesmo na quantidade absorvida pelos animais de produção. Desta maneira, é importante que os pesquisadores envolvidos no estudo do cromo estejam a par da ocorrência e comportamento do metal no ambiente como um todo.

A distribuição ambiental de compostos contendo cromo depende do potencial de redox, do pH, da presença de substâncias oxidantes e redutoras, da cinética das reações de redução, da formação de complexos de Cr^{+3} ou da formação de sais insolúveis de Cr^{+3} , além da concentração total de cromo presente no sistema. Esta última variável depende, em sua maior parte, da ação do ser humano, isto é, regiões industrializadas apresentam teores de cromo no ambiente muito maiores que locais que sofrem pouca interferência do homem. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) o Cr^{+3} é a forma predominante nos solos e isto deve-se ao fato de que o Cr^{+6} é facilmente reduzido a Cr^{+3} pela matéria orgânica. Entretanto, a ocorrência do mineral no solo muitas vezes é resultado da ação antropogênica. Por exemplo, solos próximos a depósitos de lixo no Brasil apresentaram concentrações de cromo aumentadas de 1,5 a 3 vezes em relação a solos de referência (HEITZMANN, 1999). Na água, a concentração desse mineral varia de acordo com a presença de indústrias ou da natureza dos solos (WHO, 2003), mas normalmente a concentração de cromo não ultrapassa 2 ppb em meio aquoso (ATSDR, 2000). De uma maneira geral, o Cr^{+6} possui mobilidade relativamente alta em relação ao Cr^{+3} uma vez que esta forma é menos solúvel que aquela. No ar, tanto as formas tri e hexavalentes são encontradas, principalmente sob a forma de aerossóis e que podem ser removidas através da chuva, sendo depositadas no solo (WHO, 2003).

3.6 Cromo nos Sistemas Biológicos e Fontes de Cromo

O cromo adentra os sistemas biológicos, em menor escala, através da inalação de partículas contendo o mineral, bem como, em maior escala, via oral pela ingestão de água e alimentos contendo cromo. Alguns autores consideram também a possibilidade de absorção através da pele quando há contato direto com o mineral (ATSDR, 2000). Em adição, o fenômeno da bioacumulação é uma via poderosa de introdução do cromo nos sistemas: organismos integrantes da camada primária da cadeia alimentar, ao serem utilizados como fonte de nutrientes pelas demais camadas, “carreiam” o mineral para os demais níveis tróficos. Assim, a entrada de cromo nos níveis primários da cadeia alimentar é o principal fator regulador da quantidade de cromo nos sistemas biológicos em locais não poluídos ou que recebem pouca interferência do ser humano, por exemplo, na exploração pecuária extensiva.

O Cr é muito mais abundante nos solos que nos vegetais. Puls (1994) estudando solos canadenses verificou valores de 1 a 25 mg de Cr/kg de matéria seca de solo, enquanto dados provenientes de solos britânicos sugerem uma abundância maior do elemento com valores entre 10 a 121 mg de Cr/kg de matéria seca de solo (ARCHER & HODGSON, 1987). Com vegetais, os estudos realizados normalmente utilizam meios enriquecidos com cromo ou ocorrem em áreas contaminadas com o metal e visam, em sua maioria, averiguar a capacidade das plantas em remover o cromo do solo, uma técnica conhecida por “fitoremediação”. Pouca atenção é dada às espécies de plantas bem conhecidas ou com potencial agrônomico, mas diversas análises realizadas por McDowell et al. (1978) procuraram definir a concentração de muitos minerais (porém não o Cr) nas forrageiras tropicais. Essas análises verificaram a grande incidência de níveis deficientes ou marginais de minerais nas forragens. De qualquer modo, as quantidades de cromo aferidas em outros estudos com alguns vegetais como o repolho e a couve-flor ficam em torno de 1,6 a 2,0 mg de Cr/kg de matéria seca vegetal nos brotos (ZAYED et al., 1998).

Essa discrepância entre os teores de cromo no solo e nos vegetais deve-se provavelmente à relativa insolubilidade e inércia do Cr^{+3} , de modo que apenas o Cr^{+6} fica disponível para as plantas (OLSON et al., 1977b). Assim, pouco cromo é absorvido pelos vegetais, pois a maior parte do cromo no solo está na forma trivalente. Contudo, o pH do solo é um importante fator modulador da capacidade de absorção de cromo pelas plantas. Olson et al. (1977a) utilizando cromo radioativo (^{51}Cr) verificaram que a absorção de

Cr^{+3} e Cr^{+6} pelos vegetais ocorre de maneira inversa e que esta ação é dependente do pH: enquanto o Cr^{+3} é absorvido com maior intensidade em pH mais afastado da neutralidade (tanto ácido como alcalino), o Cr^{+6} tem pico de absorção em pH próximo de 6, diminuindo a intensidade de absorção quando se distancia desse valor. Deste modo, em solos ácidos como o do cerrado é de se esperar maiores teores de cromo nas forragens quando comparadas com forrageiras de outros locais. Porém esta diferença não tende a ter muitos efeitos uma vez que a maior parte do cromo absorvido pelas plantas se acumula na raiz dos vegetais (OLSON et al., 1977a) e os animais alimentam-se principalmente das folhas.

Os alimentos, em contraste aos solos, apresentam, em média, apenas 0,01 a 4,2 mg de Cr/kg de matéria seca, sendo que os cereais são relativamente mais pobres que as leguminosas (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 1992). Entretanto, além do cromo advindo dos alimentos, quantidades adicionais deste mineral provenientes do solo são ingeridas acidentalmente por animais em pastejo (UNDERWOOD & SUTTLE, 1999), o que pode interferir sobremaneira na quantidade de cromo disponível no trato gastrointestinal. Apenas para dimensionar a importância do solo como fonte direta de minerais dietéticos a animais em regime de pastejo, a ingestão acidental de solo por ruminantes pode chegar a 20% da matéria seca de sua dieta. Dados da Nova Zelândia sugerem uma ingestão anual de solo de aproximadamente 75 kg para ovelhas e 600 kg para vacas de leite (HEALY, 1974 *apud* McDOWELL, 1999). Esse tipo de ingestão é favorecido quando os solos têm uma estrutura fraca e pobre drenagem, além de elevada taxa de lotação (McDOWELL, 1999). Contudo, o consumo de solo não deve ser encarado como benéfico uma vez que a absorção de diversos minerais pode ficar prejudicada. Por exemplo, Rosa (1980) verificou que a inclusão de 10% de solo à dieta de ovinos reduziu a absorção de fósforo.

Nos alimentos, quantidades em torno de 40 a 60 μg de Cr/kg de matéria seca em um composto de tremoço, cevada e feno oferecido a ovelhas na Austrália foram encontradas por Gardner et al. (1998) enquanto que Olsen et al. (1996), mensuraram 2,6 μg de Cr/kg de matéria seca em uma dieta composta de milho e alfafa. Contudo, a forma na qual o cromo está presente na dieta pode ser mais importante que a quantidade do mineral. Anderson et al. (1996a) determinaram a biodisponibilidade do cromo proveniente de diferentes fontes pela incorporação do mineral em diversos tecidos de ratos. Neste estudo, demonstrou-se que a incorporação de cromo nos tecidos é altamente

dependente da forma administrada, sendo que as maiores taxas de incorporação ocorreram sob as formas de cromo-ácido dinicotínico, picolinato de cromo (CrPic), acetato de cromo, sulfato cromo-potássico e complexos de cromo/glicina. Em contraste, o cloreto de cromo foi avaliado como uma fonte pobre nesse mineral em vista da sua baixa biodisponibilidade.

Formas de cromo no estado hexavalente são mais solúveis que o Cr^{+3} e quando administradas diretamente no intestino são absorvidas 3 a 5 vezes melhor que a forma trivalente (ANDERSON, 1987). Por outro lado, quando a administração é oral, acredita-se que o Cr^{+6} é reduzido a Cr^{+3} antes de alcançar o sítio de absorção no intestino delgado, prejudicando sua absorção (DOISY et al., 1976).

De um modo geral, sabe-se que as formas orgânicas de cromo podem ser absorvidas com uma eficiência de 20 a 30 vezes maior que as formas inorgânicas (STARICH & BLINCOE, 1983). Provavelmente as razões para a baixa disponibilidade das fontes inorgânicas de Cr^{+3} estejam relacionadas à formação de óxido de cromo insolúvel, que se liga a agentes quelantes naturais no rúmen ou à interferência de formas iônicas de outros elementos (zinco, ferro e vanádium) (BOREL & ANDERSON, 1984). Outros fatores que podem contribuir para esta baixa disponibilidade das fontes inorgânicas de Cr^{+3} são a ausência de conversão, ou a conversão muito lenta do cromo inorgânico em cromo bioativo (RANTHOTRA & GELROTH, 1986) ou quantidades insatisfatórias de ácido nicotínico (URBERG & GEMEL, 1987) que está relacionado a formas altamente disponíveis de cromo como o GTF. Os complexos de cromo de ocorrência natural são conhecidos por sua alta disponibilidade biológica: experimentos com ratos sugerem que 10 a 25 % do cromo presente na levedura de cerveja é absorvido (UNDERWOOD, 1977). Outras fontes naturais de cromo são o chocolate, a pimenta e algumas carnes (TOEPFER et al., 1973).

3.7 Cromo como Suplemento Alimentar

O Cr talvez seja o metal de transição mais controverso em termos de função biológica. O Cr^{+6} sabidamente é um carcinógeno e uma das principais substâncias nocivas relacionadas à medicina do trabalho. Assim como os compostos tetra e pentavalentes, que são altamente reativos, o Cr^{+6} representa diversos riscos à saúde humana e animal (CONNETT & WETTERHAHN, 1983; LEVINA & LAY, 2005) de

modo que sua utilização como suplemento alimentar apresenta muitas contra-indicações. Já o cromo trivalente vem, a tempos, sendo questionado quanto à inocuidade de sua utilização para este fim bem como não existem provas cabais de seus benefícios. Entretanto é amplamente utilizado como suplemento alimentar por humanos e mais recentemente foi introduzido na nutrição animal.

Ultimamente, os estudos realizados com Cr^{+3} em humanos têm visado o uso desse mineral como um possível nutracêutico para o tratamento de diabetes do tipo II, enquanto em nutrição animal os estudos têm procurado melhorar a produtividade e a imunidade dos animais. As doses recomendadas a humanos nesses estudos, variam de 0,2 a 1,0 mg de Cr/dia por 1 a 10 meses (STEARNS, 2007). Isto representa 6 a 40 vezes mais que a dose total diária recomendada de 35 μg de cromo/dia (ANVISA, 2005). Especificamente em nutrição de ruminantes, o consumo de cromo tem sido feito *ad libitum* em misturas minerais. Muitos compostos de cromo trivalente têm sido utilizados na pesquisa envolvendo a suplementação alimentar deste mineral, entre eles o propionato de cromo (VINCENT & DAVIS, 2001), o L-histidinato de cromo (ANDERSON et al., 2001), o nicotinato de cromo e o mais utilizado: picolinato de cromo (CrPic).

O picolinato de cromo (CrPic), também conhecido por tripicolinato de cromo ou cromo tripicolinato possui fórmula $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$, onde o termo picolinato representa o 2-piridinacarboxilato. A estrutura química do CrPic está representada na Figura 1.

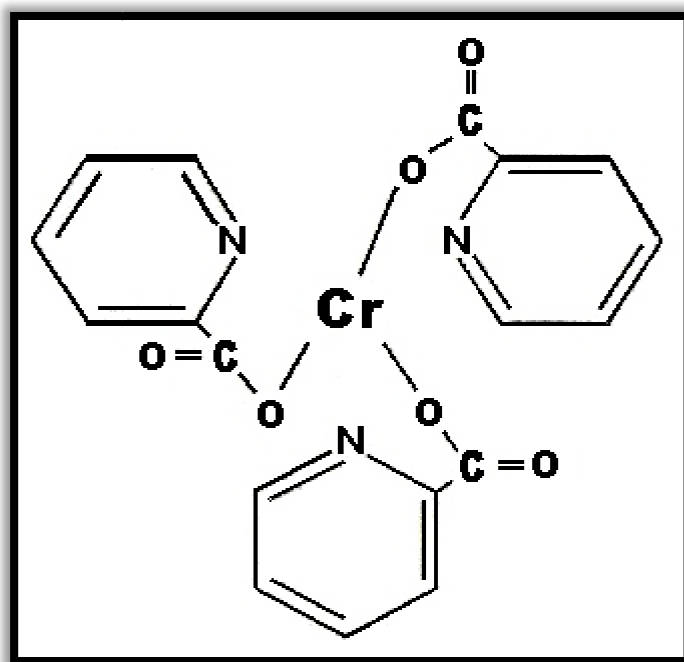


Figura 1. Estrutura química do Picolinato de Cromo (CrPic).

Fonte: Aboul-Enein et al., 2005.

O tripicolinato de cromo é um composto de cromo amplamente comercializado como suplemento nutricional para humanos sendo que suas vendas nos Estados Unidos movimentam cerca de meio bilhão de dólares por ano (MIRASOL, 2000). Em adição estima-se que mais de 10 milhões de pessoas por ano utilizam suplementos contendo CrPic (KOMOROWSKI & JUTURU, 2004). Entretanto, a comercialização de produtos contendo CrPic iniciou-se antes da aprovação do Ato de Educação e Sanidade de Suplementos Alimentares (“Dietary Supplement Health and Education Act”) em 1994. Assim, os suplementos utilizando esta molécula prescindem dos rigorosos testes utilizados para a aprovação de vendas de suplementos que são compulsórios a todos os produtos disponíveis aos consumidores após a aprovação do ato.

No Brasil, a legislação referente ao assunto é responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA no caso da suplementação alimentar para humanos e encontra-se disponível nas Portarias SVS/MS 27 a 43, 222 e 223 de 1998 e no caso de suplementação na dieta de animais, a responsabilidade passa a ser do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA por meio da Instrução Normativa N° 152, de 11 de Outubro de 2004 que infelizmente não faz qualquer referência à utilização de cromo na alimentação animal.

A suplementação de cromo sob a forma de picolinato demonstrou ser mais eficiente em termos de absorção quando comparado a outras formas ou a compostos inorgânicos (ANDERSON et al., 1996b; DiSILVESTRO & DY, 2008). Em adição, o CrPic foi a forma de suplementação eleita por todas as pesquisa financiadas pelo “National Institutes of Health” (NIH) para estudos clínicos com cromo (KOMOROWSKI & JUTURU, 2004).

O picolinato de cromo é estável em soluções aquosas e em fluidos gástricos sintéticos, além de ser internalizado de maneira intacta pelas células (HEPBURN & VINCENT, 2003). Em ratos, a concentração de CrPic na urina e no fígado (indicando sua metabolização) tem pico em no máximo 2 horas após a aplicação intravenosa do composto (HEPBURN & VINCENT, 2003).

3.8 Metabolismo do Cromo

Poucas informações sobre o metabolismo do cromo em animais de produção estão disponíveis, provavelmente devido à importância dada a este elemento como marcador

externo. Compostos contendo cromo, por exemplo o óxido crômico (Cr_2O_3), têm sido utilizados como marcadores externos por serem inertes e, portanto, não reagirem com o organismo: quando administrados oralmente em doses conhecidas, quase a totalidade do cromo é excretada nas fezes, fornecendo informações referentes ao consumo alimentar, à digestibilidade de matéria orgânica e à absorção de outros minerais e nutrientes. Em adição, o cromo possui certa afinidade por partículas fibrosas, o que pode facilitar o estudo de digestibilidade de fibras. O uso de radioisótopos sob a apresentação de quelatos solúveis, por exemplo o ^{51}Cr ácido etilenodiaminatetra-acético ($^{51}\text{CrEDTA}$) tem mostrado que a quelação não necessariamente aumenta sua absorção ou biodisponibilidade (DOWNES & McDONALD, 1964).

O cromo é absorvido primariamente no intestino delgado, sendo que em ratos o jejuno é o maior sítio de absorção enquanto que o duodeno e o íleo são menos eficientes (CHEN et al., 1973). Contudo, a eficiência de absorção é inversamente proporcional à ingestão alimentar. Anderson (1987) verificou que aproximadamente 2% do cromo dietético foram absorvidos em humanos que consumiram aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{dia}$, enquanto a eficiência de absorção diminuiu para 0,5% quando a ingestão foi maior que 40 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Pacientes (humanos) diabéticos apresentaram absorção anormalmente alta (de 2 a 4 vezes maior que um indivíduo normal) (DOISY et al., 1976).

Uma vez absorvido, acredita-se que o cromo circule no plasma associado à β -globulina numa concentração de aproximadamente 0,01 a 0,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Anderson, 1987), sendo que valores inferiores podem ser encontrados em animais com infecção (BOREL & ANDERSON, 1984). Por outro lado, Kerger et al. (1996) defendem que após a absorção do metal, parte do cromo ingerido circula pelo organismo animal ao ligar-se às células vermelhas do sangue interagindo com a hemoglobina e parte circula através do plasma sangüíneo. As quantidades de cromo em cada via de transporte dependem diretamente da forma com a qual o cromo se apresenta inicialmente – Cr^{+3} ou Cr^{+6} e se sob forma inorgânica ou orgânica. Segundo Mertz (1993), a detecção e mensuração das concentrações de Cr no soro necessitam de rigoroso controle contra a contaminação das amostras durante a preparação e análise: o procedimento deve ser realizado em salas especialmente limpas, em obediência às regras de controle de qualidade e utilização de material próprio para tal (BOREL & ANDERSON, 1984).

O cromo pode apresentar efeitos importantes sobre o transporte sérico de ferro, diminuindo a quantidade deste mineral no soro, reduzindo a capacidade de ligação do

ferro e reduzindo a ferritina. Em concentrações supra-fisiológicas, o cromo liga-se inespecificamente a outras proteínas plasmáticas (PRASAD, 1978).

Após sua administração, o cromo plasmático é totalmente depurado pelos rins em poucos dias. Entretanto, o cromo presente no restante do organismo demora a ser excretado podendo apresentar meia-vida de até 83 dias (BOREL & ANDERSON, 1984). Alguns tecidos como os ossos e o epidídimo possuem a capacidade de reter o mineral mais que outros tecidos como o coração, os pulmões, pâncreas e o cérebro (NRC, 1997). A quantidade de cromo plasmático não apresenta alta correlação com os níveis dos estoques corporais desse mineral. Portanto, a concentração plasmática de cromo não é um bom indicador da situação metabólica do mineral. Em adição, a concentração total de cromo no organismo diminui com o aumento da idade. Isto é reflexo da diminuição da incorporação do mineral nos tecidos, apesar da causa para tal acontecimento ser desconhecida (NRC, 1997).

O cromo é excretado principalmente pela urina, mas pequenas quantidades podem ser perdidas no cabelo, transpiração e bile. A taxa de excreção em humanos é próxima de 0,22 µg/dia (BOREL & ANDERSON, 1984), nível considerado normal quando se trata de indivíduos que consomem diariamente cromo em quantidades típicas (62-85 µg/dia). Entretanto, após situações de estresse, trauma ou exercício, a quantidade de cromo excretada na urina pode aumentar. Anderson (1988), verificou que, em adultos, exercício intenso resultou em um aumento de 5 vezes na quantidade de cromo excretada na urina em 2 horas após o esforço e a quantidade total de cromo excretado na urina durante o dia do exercício foi 2 vezes maior que a quantidade excretada no dia subsequente. Resultados semelhantes foram descritos por Engel et al. (2002), ao utilizarem como modelo atletas maratonistas. Deste modo, a mensuração de cromo na urina ou a taxa de excreção de cromo não são bons parâmetros para definir o estado metabólico do mineral.

3.9 Cromo, Metabolismo e Produção Animal

Os nutrientes dietéticos estão diretamente relacionados à manutenção da vida e à produtividade animal. De todo o alimento ingerido, parte é digerido e utilizado nos diversos processos corporais, com maior ou menor alocação dos nutrientes de acordo com as exigências funcionais. Por exemplo, todos os animais utilizam parte dos nutrientes absorvidos na manutenção de funções essenciais como o metabolismo basal, a regulação

da temperatura corporal e reparo de tecidos. A quantidade e qualidade de nutrientes utilizados para esse fim é conhecida por “requerimentos de manutenção”. Por outro lado, a quantidade e qualidade dos nutrientes necessários para o crescimento, engorda, produção de leite, de ovos e de lã além do gasto envolvido na execução do trabalho/exercício é conhecido por “requerimentos de produção” (ENSMINGER et al., 1990). Deste modo, os nutrientes são direcionados a todos os processos metabólicos, porém esse envolvimento está intimamente relacionado às prioridades impostas pelo organismo, de modo que quanto maior a prioridade de uma função, menor é a sua susceptibilidade a alterações no plano nutricional (KYRIAZAKIS & COOP, 1999). Assim, as funções de manutenção, que garantem a sobrevivência do animal são pouco atingidas, ou demoram a ser afetadas por variações na quantidade de minerais ou vitaminas ou até mesmo de outros nutrientes, pois o organismo animal lança mão de mecanismos de compensação e reservas nutricionais a fim de atender a demanda. Ao contrário das funções de manutenção, aquelas não essenciais à vida são afetadas mais drasticamente por alterações no plano nutricional por excesso ou racionamento de nutrientes.

As exigências nutricionais para a manutenção e produção animal são fortemente afetadas por diversos fatores, entre os quais podemos citar: o exercício, o estresse, a sanidade, o tamanho corpóreo, nível de produtividade, estado reprodutivo, idade, raça, sexo e a classe animal (reprodutor, animal em engorda, matriz em lactação entre outras) (ENSMINGER et al., 1990). Assim, para que o animal expresse todo o seu potencial produtivo é necessário que suas exigências nutricionais sejam atendidas.

De acordo com McDowell (1999), o nível dietético de um mineral suficiente para proporcionar máximo desempenho é chamado de requerimento mínimo e estabelece o início da zona ótima de funcionamento do organismo animal. Contudo, as concentrações minerais variam desde a carência, passando pela deficiência e níveis marginais (ainda seguros, mas antieconômicos), até concentrações que causam toxicidade e podem resultar em morte.

A interferência do cromo sobre os parâmetros metabólicos pode influenciar tanto na manutenção de processos vitais quanto na produtividade animal, pois não se sabe bem ao certo seu papel sobre o metabolismo das diferentes biomoléculas, que por sua vez são responsáveis por todos os processos bioquímicos do organismo. Portanto, o atual conhecimento referente à atuação do Cr no metabolismo será abordado adiante

apresentando inicialmente as duas moléculas relatadas por diversos estudiosos como suspeitas no efetivo desempenho das funções do cromo.

3.9.1 *Fator de Tolerância à glicose X Cromodulina*

Acredita-se que boa parte das funções metabólicas exercidas pelo cromo ocorra em virtude da presença, no organismo animal, de uma ou mais moléculas bioativas que contenham o mineral em sua estrutura. Especificamente em relação a esse elemento-traço, duas moléculas são apontadas como possíveis responsáveis por seus efeitos metabólicos: O “Fator de Tolerância à Glicose” (GTF) e a “Cromodulina” ou “Substância Ligante de Cromo de Baixo Peso Molecular” (LMWCr).

De acordo com Mallard et al. (1999), existem diversas formas estruturais do GTF, onde os extratos de leveduras apenas representariam uma destas formas. Ou, por outro lado, o GTF seria uma mistura de diversas formas químicas, de modo que existiriam análogos sintéticos como o nicotinato de cromo, proteinato de cromo, o picolinato de cromo e o cromo ácido aminoquelatado. Ainda em concordância aos mesmos autores, a cromodulina pode ser uma das formas de GTF; o GTF pode ser um precursor da cromodulina ou as duas moléculas podem não ser relacionadas entre si, com funções metabólicas específicas.

A existência do fator de tolerância à glicose foi relatado por Schwartz & Mertz, ao estudarem ratos alimentados com dietas deficientes em cromo e que quando receberam um composto rico em Cr^{+3} derivado de leveduras, apresentaram melhora no quadro de intolerância à glicose (SCHWARZ & MERTZ, 1959). Em seguida, diversos estudos procuraram estabelecer a natureza química do GTF e, posteriormente, análises de cinética dos efeitos biológicos do GTF foram realizados (ANDERSON, 1987; VINCENT, 1994) de modo que pesquisas recentes indicam que esta molécula é simplesmente uma fonte de Cr prontamente disponível e não possui atividade biológica intrínseca (VINCENT et al., 1996).

Por outro lado, uma substância natural contendo Cr^{+3} inicialmente chamada de “Substância Ligante de Cromo de Baixo Peso Molecular” (LMWCr) foi originalmente descrita por Yamamoto et al. (1987) e posteriormente recebeu a denominação de “Cromodulina”, devido à homologia com a proteína “Calmodulina” (relacionada ao cálcio – Ca). Essa substância é hoje, de acordo com Vincent et al. (1996), a única

molécula candidata a ser a forma biológica ativa de Cr. A cromodulina foi descrita como um pequeno peptídeo ligado a quatro núcleos de Cr^{+3} (JACQUAMET et al., 2003) capaz de intensificar a atividade da tirosinocinase em receptores de insulina humanos (DAVIS & VINCENT, 1997; VINCENT & BENNETT, 2007).

Vincent (2003a) propôs um mecanismo de ação para a Cromodulina: a apocromodulina, uma pró-enzima, é armazenada em células sensíveis à insulina. Quando ocorrem elevações da insulina plasmática, devido ao aumento na glicemia, este hormônio se liga ao seu receptor que por sua vez sofre uma modificação espacial resultando na autofosforilação dos resíduos de tirosina no interior do receptor. Essa autofosforilação transforma o receptor em uma tirosinocinase ativa e transmite o sinal/informação da insulina para a célula. Ao mesmo tempo, o aumento da concentração sanguínea de insulina desencadeia um influxo de cromo plasmático em direção ao interior das células sensíveis à insulina. Este influxo resulta na ligação do Cr com a apocromodulina, ocupando os quatro sítios de ligação antes vazios, dando origem à holocromodulina ou Cr_4 -cromodulina. A partir daí, a holocromodulina liga-se ao receptor de insulina, provavelmente para auxiliar na manutenção da conformação ativada do receptor, o que amplifica a atividade autofosforilativa e aumenta o sinal da insulina. Quando esta função deve cessar, a diminuição dos níveis de insulina plasmática facilitam a relaxação das moléculas do receptor de insulina e a holocromodulina é então enviada para o sangue. A alta constante de ligação entre o Cr e a cromodulina sugere que uma vez unidos, o mineral e o peptídeo em questão não são separados em nível fisiológico para serem reaproveitados na formação da apocromodulina (DAVIS & VINCENT, 1997). Por último, a cromodulina é eficientemente excretada na urina, talvez pela atuação da proteína de transporte de ferro (Fe) conhecida por transferrina que pode ser a responsável pela manutenção das concentrações de cromo plasmático e pelo transporte de cromo aos tecidos como resposta à presença de insulina.

3.9.2 *Cromo e o Metabolismo dos Carboidratos*

Os primeiros indícios da participação do cromo sobre o metabolismo de carboidratos datam de 1957 quando Schwarz & Mertz observaram que animais apresentando certa resistência à glicose possuíam níveis diminuídos de GTF. Posteriormente, Anderson (1987) demonstrou que sob a influência de Cr (quando este

está associado à insulina nos tecidos) a absorção, a utilização para a lipogênese e a oxidação da glicose, bem como a glicogênese tornam-se aumentadas. Entretanto, na presença de cromo isoladamente, não foi observado nenhum desses efeitos.

Existem relatos, em humanos, de que pacientes apresentando sintomatologia semelhante à da diabetes tipo II, quando suplementados com cromo (200 – 1000 µg/dia) obtiveram melhoras significativas em seu quadro geral: foram observados efeitos benéficos sobre o colesterol, no controle da glicemia e nos níveis de insulina sérica, indicando que diminuição da tolerância à glicose nos tecidos periféricos é a alteração bioquímica primária da deficiência de cromo (Anderson et al., 1996b). Entretanto, melhoras no quadro clínico não foram observadas em todos os casos, talvez em função da possibilidade de que as reservas de cromo nestes indivíduos estivessem em níveis satisfatórios ou adequados ou devido ao envolvimento de fatores etiológicos concorrentes. O cromo possui a capacidade de aumentar ou potencializar a atividade da insulina, mas não substitui este hormônio (NRC, 1997).

Em concordância a Anderson et al. (1996b), Jeejeebhoy (1999) ao estudar pacientes submetidos à dieta parenteral total e que por isso estavam suscetíveis à deficiência de cromo, verificou que seus objetos de estudo apresentavam uma síndrome de hiperglicemia não responsiva à insulina, mas cujo quadro era revertido após a administração i.v. de Cr. Deste modo, o pesquisador levanta a hipótese de que o cromo pode apresentar algum tipo de propriedade farmacológica que seja independente de qualquer deficiência nutricional, uma vez que mesmo em pacientes com altas concentrações de cromo sérico, o tratamento apresentou resultado satisfatório.

No campo da nutrição animal, as repostas à suplementação de cromo têm sido variáveis. Estudo realizado com suínos demonstrou aumento na glicemia após a suplementação durante 21 dias com 200 ppb de CrPic (ARAÚJO et al., 2007). Ao contrário, Page et al. (1993) e Amoikon et al. (1995) não constataram aumento da glicose sérica em suínos alimentados com rações contendo diferentes níveis de CrPic em enquanto que Lien et al. (2001) e Van de Ligt et al. (2002) relataram diminuição da concentração de glicose plasmática em suínos em jejum que foram suplementados com 200 ppb de CrPic.

Bezerros em lactação suplementados com 0,4 mg de Cr/kg de dieta sob a forma de cloreto de cromo apresentaram forte diminuição das concentrações de glicose plasmática em 15 a 180 minutos após a infusão intravenosa de insulina quando comparado com os

controles (KEGLEY et al., 1997). O mesmo efeito foi obtido em bezerros que receberam um complexo de cromo-ácido nicotínico, porém a redução dos níveis de glicose sérica ocorreram somente após 90 a 180 minutos do desafio com a insulina (KEGLEY et al., 1997). Esses autores creditam a diferença das concentrações de glicose entre animais controle e tratados com cromo ao aumento da sensibilidade à insulina exógena ou a um aumento do tempo de ação da insulina nos animais que receberam cromo na dieta.

Em bovinos com o rúmen funcionalmente ativo, a suplementação de cromo (0,4 mg de Cr/kg de dieta) sob diferentes formas (cromo-ácido nicotínico, levedura com alto teor de cromo ou cloreto de cromo) não afetou a depuração de glicose após a administração i.v. desta substância (KEGLEY & SPEARS, 1995).

Embora McClary et al. (1988) tenham verificado que durante a gestação adiantada vacas primíparas podem ser mais resistentes à insulina que as múltíparas, Subiyatno et al. (1996) verificaram que vacas primíparas suplementadas com cromo amino-quelado apresentaram melhora na sensibilidade à insulina com base na diminuição da relação insulina/glicose séricos, mas não detectaram diferenças na taxa de depuração da glicose em seguida a um teste hiperglicêmico em vacas suplementadas ou não com cromo.

Em experimento realizado por Sano et al. (1999), ovinos cruzados (Corriedale X Suffolk) receberam administração concomitante de insulina e glicose i.v. a fim de se analisar modificações na responsividade e sensibilidade tecidual à insulina e à glicose além de estudar a cinética destas duas substâncias sob a influência do Cr. Entretanto, nenhuma diferença digna de nota foi observada entre os animais que não receberam Cr suplementar e aqueles que receberam suplementação na dose de 0,5 mg de Cr/kg de dieta a partir de um composto de leveduras.

Kitchalong et al. (1995) conduziram testes de tolerância à glicose e de infusão i.v. de insulina em ovinos recebendo suplementação de 250 µg de Cr/kg de dieta sob a forma de picolinato de cromo e não constataram qualquer alteração significativa em relação aos animais controle nos níveis plasmáticos de insulina ou glicose. Diferentemente, Gentry et al. (1999), ao testarem dois níveis de proteína dietética associados a 400 ppb de Cr na forma de CrPic em ovinos Suffolk por 84 dias, verificaram diminuição nas taxas de depuração de glicose nos animais que receberam alta proteína, mas não nos animais que foram alimentados com baixa proteína dietética.

3.9.3 Cromo e o Metabolismo dos Lipídios

Diversos estudos sugerem que o cromo é necessário para o metabolismo normal de lipídios e para a redução da prevalência de aterosclerose. De acordo com alguns estudiosos, a suplementação com este elemento-traço reduz as concentrações totais de colesterol, aumentando a proporção de HDL (RIALES & ALBRINK, 1981; ANDERSON, 1995) e diminuindo a proporção de LDL e triacilgliceróis (LEFAVI et al., 1993; ANDERSON, 1995). Contudo, Anderson (1987) indica que os efeitos da suplementação de cromo em humanos nem sempre é consistente, e de acordo com Lefavi et al. (1993) os efeitos deste mineral sobre o metabolismo lipídico são independentes dos efeitos sobre o metabolismo da glicose.

Amoikon et al. (1995) suplementando suínos com diferentes níveis de CrPic verificaram aumentos no colesterol plasmático enquanto que Page et al. (1993) relataram redução no colesterol total de suínos suplementados com o mineral sob a forma de picolinato de cromo.

Em um experimento utilizando bezerros como modelo animal verificou-se que durante as primeiras 5 semanas de idade a suplementação de cromo na dose de 1 mg/kg de dieta na forma de CrPic diminui as concentrações plasmáticas pré-prandiais de ácidos graxos não-esterificados, corroborando aos efeitos promovidos pela insulina de estimular e inibir a lipogênese e a lipólise respectivamente, no tecido adiposo (DEPEW et al., 1998).

Bunting et al. (1994) não observaram efeitos da suplementação de tripicolinato de cromo sobre as concentrações de ácidos graxos livres no plasma de bezerros em crescimento, porém as concentrações de colesterol plasmático diminuíram em alguns dos animais-teste. Entretanto, os dados obtidos por Wolf et al. (1993) vão de encontro aos dados relatados por Bunting et al. (1994): a suplementação de cromo polinicotinato elevou as concentrações séricas de colesterol em bovinos em terminação.

Após a infusão de propionato i.v. em vacas, as concentrações séricas de ácidos graxos não-esterificados foram menores nos animais que receberam suplementação com cromo (0,5 mg de Cr/dia) em comparação àqueles que não a receberam (SUBIYATNO et al. 1996).

Kitchalong et al. (1995) relatam uma diminuição de 17% na concentração total de colesterol circulante em ovinos nas primeiras 2 semanas de suplementação com cromo

(250 µg de Cr/kg de dieta na forma de CrPic), fato este não verificado nos mesmos animais após 7 ou 11 semanas de suplementação. Em adição, os mesmos pesquisadores verificaram quedas de 21,7% nas concentrações séricas de ácidos graxos não-esterificados nos animais suplementados com Cr.

3.9.4 Cromo e o Metabolismo de Proteínas

O cromo está envolvido no metabolismo protéico devido ao papel exercido pela insulina na absorção de aminoácidos nos tecidos. Segundo Vernon & Sasaki (1991), a insulina desempenha profunda influência sobre a síntese protéica. Assim, visto que a sensibilidade à insulina pode ser diretamente afetada pelo cromo, a síntese proteica também pode ser.

A uréia e a albumina plasmáticas se mostraram bons indicadores do *status* de nitrogênio (N) corporal (LABORDE et al., 1995) e portanto foram utilizados por diversos pesquisadores para mensurar o balanço protéico em vários organismos. Assim, a suplementação de cromo aumentou a incorporação de aminoácidos nos tecidos de ratos (ROGINSKI & MERTZ, 1969) e Kitchalong et al. (1995) não verificaram qualquer variação nos indicadores de balanço do N por influência do CrPic. Resultados semelhantes foram relatados por Gentry et al. (1999): não houve diferença nas concentrações de parâmetros mensurados no plasma sanguíneo como a uréia, a albumina, proteínas totais e creatinina entre os animais suplementados ou não com cromo.

3.9.5 Cromo e o Metabolismo de Ácidos Nucléicos

Em seu estado de oxidação trivalente, o cromo está envolvido na integridade estrutural e expressão da informação genética nos animais. A ligação entre o cromo e os ácidos nucleicos ocorre com maior afinidade do que com outros íons metálicos (OKADA et al., 1982). Este mineral tem papel protetor sobre o RNA, atuando contra a desnaturação por calor (NRC, 1997). Além disso, verificou-se que há certa concentração de cromo no núcleo de células animais e foi demonstrado que o cromo aumenta a síntese de RNA *in vitro* (OKADA et al., 1982) e *in vivo* (OKADA et al., 1983) em camundongos, corroborando à hipótese de que o cromo está envolvido no funcionamento da expressão gênica.

Em oposição, muitos artigos científicos abordam os possíveis efeitos nocivos do cromo, especialmente do Cr^{+6} , sobre o material genético. Destaque para: Blasiak et al. (1999), ATSDR (2000) e Cieslák-Golonka (1995). Bagchi et al. (2002) relatam a ocorrência de fragmentação do DNA em células tratadas com picolinato de cromo enquanto Vincent (2003a) chama atenção para possível associação do CrPic com danos indiretos ao DNA.

3.9.6 Cromo e Produção Animal

O aporte adequado de elementos-traço é essencial para a manutenção de um nível ótimo de crescimento e desempenho animal (SOLAIMAN et al., 2006). A atividade pecuária voltada para a produção de carne leva em consideração como principais parâmetros de avaliação do desempenho produtivo o peso final do animal, o ganho médio em peso diário (GMD), o consumo alimentar e a eficiência alimentar. Porém outros parâmetros que envolvem análises quantitativas e qualitativas do produto final também são utilizados para avaliar a eficiência e desempenho animal.

Alguns experimentos visando avaliar a influência da suplementação de Cr sobre os parâmetros produtivos foram realizados principalmente com bovinos, ovinos e suínos. Contudo os resultados mostraram-se variáveis, mesmo se comparados intra-espécies. Isto pode estar relacionado à hipótese levantada por alguns pesquisadores envolvidos no estudo do cromo que apontam a presença de fator estressante (longas viagens, exercícios prolongados e restrição alimentar entre outros agentes estressores) como componente essencial para a ocorrência de resultados benéficos ao desempenho produtivo associados à suplementação do mineral (CHANG & MOWAT, 1992; MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; KEGLEY et al., 1997).

Kitchalong et al. (1995) verificaram que o CrPic não afetou o ganho médio diário em peso nem o consumo diário de matéria seca em ovinos em crescimento. Resultados semelhantes foram descritos por Samsell & Spears (1989) e Bunting et al. (1994) que utilizaram em seus estudos ovinos e vacas leiteiras respectivamente. Em contraste, experimento conduzido por Moonsie-Shageer & Mowat (1993) demonstrou que a suplementação de Cr pode melhorar o desempenho no que se refere ao GMD e consumo diário de matéria seca em bovinos de corte submetidos a longas viagens (mais de 26 horas). Chang & Mowat (1992) verificaram que a suplementação de Cr para bovinos

estressados devido a transporte prolongado seguido da alocação em baias com 2,5 m²/animal apresentou efeito positivo sobre o ganho médio diário em peso e sobre a eficiência alimentar enquanto Gentry et al. (1999) relataram aumentos no GMD, na ingestão de matéria seca e na eficiência alimentar nos animais que receberam alta proteína dietética associado à suplementação de Cr. Entretanto, neste mesmo experimento, o peso da carcaça, do coração e da gordura pélvica não foi afetado pela suplementação de cromo.

O ganho médio diário em peso de bezerros recebendo sucedâneo não foi afetado pela suplementação de 1 mg de cromo/kg de dieta sob a forma de CrPic (DEPEW et al., 1995). De maneira semelhante, Kegley et al. (1997) não verificaram alterações no desempenho produtivo quando bezerros lactentes foram suplementados com 0,4 mg de Cr/kg de dieta tanto sob a forma de cromo-ácido nicotínico quanto de cloreto de cromo.

As mensurações de área do músculo *longissimus dorsi* e da quantidade de gordura de cobertura em bovinos também não foram influenciadas pela suplementação de cromo (WOLF et al., 1993; CHANG et al., 1992). Contudo, as carnes oriundas de bovinos suplementados com diferentes níveis de Cr receberam classificações qualitativas melhores em relação às carnes provenientes de animais não suplementados em virtude do aumento da gordura de marmoreio (CLAEYS et al., 1994).

A composição do leite também mostrou-se inalterada em virtude da suplementação de Cr (YANG et al., 1996; BESONG et al., 1996). Porém, Yang et al. (1996) suplementando a dieta de vacas primíparas e múltiparas com Cr, verificaram que a produção leiteira das vacas primíparas era aumentada, mas não a produção das múltiparas.

Com suínos, o Cr demonstrou ter influência produtiva positiva em alguns estudos enquanto em outros parece não ter exercido qualquer efeito. Assim, Page et al. (1993) relataram aumento na proporção de músculos na carcaça e redução na proporção de gordura corporal enquanto Amoikon et al. (1995) e Evock-Clover et al. (1993) não detectaram diferenças significativas no crescimento e desempenho de suínos.

3.10 Protozoários Ruminais e a Suplementação com Cr

O alimento ingerido pelo ruminante passa inicialmente pelos pré-estômagos, de modo que os nutrientes presentes na dieta são primeiramente disponibilizados à

microbiota destes órgãos. Essa microbiota é capaz de utilizar os nutrientes dietéticos gerando compostos que serão posteriormente utilizados pelo animal hospedeiro em uma relação reciprocamente benéfica. Estas interações ocorrem com maior intensidade no interior do rúmen. Assim, toda e qualquer modificação na dieta pode alterar a complexa interação ecológica dos microrganismos ruminais entre si e destes com o animal hospedeiro, afetando positiva ou negativamente os processos digestivos, a eficiência alimentar e em última instância a produção animal.

Um dos parâmetros de elevado interesse científico e grande potencial modificador dos processos fermentativos é a quantidade e a espécie dos protozoários ruminais (VIEIRA, 1986). Estes são microrganismos unicelulares, anaeróbios, que variam em tamanho (20 a 200 μm) e apresentam organização interna complexa altamente diferenciada (DEHORITY, 1993 *apud* ARCURI et al., 2006). Estão envolvidos na manutenção do pH ruminal, na detoxificação de micotoxinas e na digestão de partículas vegetais (VIEIRA, 1986). Entretanto, embora os protozoários ruminais tenham importante papel sobre os processos digestivos do rúmen e sobre a manutenção do bem-estar e sanidade do hospedeiro (VIEIRA, 1986), existem evidências conclusivas de que esses microrganismos não são essenciais para a digestão do ruminante (BECKER & EVEREST, 1930). Deste modo, muitos experimentos vêm tentando verificar o papel da defaunação sobre diversos aspectos, como a produção de ácidos graxos voláteis e a produção de amônia.

Sabe-se que algumas substâncias são tóxicas aos protozoários ruminais, sendo conhecidas como agentes defaunantes. O cromo, embora não esteja envolvido como tal, pode desempenhar este papel visto que é um metal pesado. Contudo não há estudos descritos na literatura nesse sentido. Assim, existe a possibilidade de que a suplementação dietética de cromo interfira sobre a população de protozoários ruminais que, por sua vez, tem ação direta sobre a fermentação ruminal e conseqüentemente sobre a produtividade animal.

3.11 *Cromo e Imunidade*

Alguns estudos indicaram que o Cr pode afetar a resposta imunitária e a resistência a doenças em bovinos (CHANG et al., 1996; BURTON et al., 1996; KEGLEY et al., 1997; SPEARS, 2000) e ovinos (GENTRY et al., 1999). Entretanto, as respostas ao

cromo suplementar têm sido muito variáveis e os fatores que podem contribuir com essas variações estão relacionados à falta de uniformidade entre os estudos em diversos fatores: nos níveis corpóreos iniciais de Cr dos animais, na quantidade de Cr disponível na dieta basal, na forma com a qual o cromo foi suplementado e no tipo ou grau de estresse aos quais os animais foram submetidos no período próximo ou durante o experimento.

Os benefícios mais consistentes da suplementação de cromo sobre a imunidade são encontrados em animais que foram submetidos a estresses como longas viagens, parto, desmame ou alta produção de leite. Burton et al. (1993) afirmaram que concentrações reduzidas de cortisol no sangue de animais suplementados com Cr implicam na melhora da resposta imunitária. Somado a isto, um aumento na produção de imunoglobulinas, nos títulos de anticorpos e na modulação da resposta inflamatória podem ser efeitos prováveis da suplementação de cromo (CHANG & MOWAT, 1992; MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; WRIGHT et al., 1994). Contudo, nem sempre os resultados da suplementação de cromo são satisfatórios, mesmo naqueles estudos que utilizaram animais submetidos a estresses. Como exemplo, Chang et al. (1996) não verificaram efeitos benéficos sobre a sanidade ou parâmetros relacionados à prevalência de mastite nos animais suplementados com o mineral. Kegley et al. (1997) afirmaram que nenhuma das respostas imunes mensuradas durante o experimento (concentração sérica de IgG e IgM, leucograma, hipersensibilidade cutânea devido à aplicação de dinitroclorobenzeno) tanto antes como depois do estresse (transporte prolongado) e do desafio com a inoculação intranasal de vírus da IBR foram afetadas pelo Cr suplementar. Arthington et al. (1997) também não verificaram qualquer diferença significativa na capacidade de fagocitose de neutrófilos, na proliferação de linfócitos estimulados por mitógenos, na concentração plasmática de TNF- α e no leucograma dos animais suplementados com o elemento.

3.11.1 *Imunidade Celular*

Grande parte dos estudos realizados com a finalidade de se investigar os efeitos do cromo sobre a imunidade celular foram baseados na habilidade de proliferação dos linfócitos em resposta à estimulação com mitógenos. Contudo, alguns autores sugerem a investigação dos possíveis efeitos diretos do Cr sobre os diversos subgrupos de linfócitos

T, linfócitos B e monócitos no intuito de se determinar o exato mecanismo de ação do cromo sobre a imunidade celular.

Burton et al. (1993) demonstraram que os linfócitos periféricos de vacas leiteiras suplementadas com 0,5 mg de Cr/kg de dieta sob a forma de quelato de cromo durante o período aproximado de 22 semanas (6 semanas antes da data esperada do parto até a 16ª semana pós-parto) apresentaram resposta blastogênica aumentada à estimulação com concanavalina A (Con A). Neste mesmo experimento, a adição de cromo à dieta evitou o decréscimo na resposta blastogênica observada nos animais controle duas semanas pré-parto. Em outro estudo, a adição de soro sanguíneo proveniente de vacas suplementadas a culturas de linfócitos isolados de vacas controle, também aumentou a proliferação dos linfócitos quando induzidos por Con A (Burton et al., 1995) e tal proliferação não parece estar relacionada às concentrações de insulina ou de outros hormônios presentes no soro das vacas suplementadas.

Adição direta de Cr sob a forma de aminoácido quelatado ou CrCl_3 aos linfócitos obtidos de animais não suplementados também aumentou a resposta blastogênica à estimulação com Con A (CHANG et al., 1994; 1996).

Em bezerros estressados (devido ao transporte e chegada num novo local), a suplementação de Cr quelatado (0,14 mg/kg de dieta) aumentou a proliferação de linfócitos *in vitro* provenientes de animais com sinais de doença (verificada através da inspeção visual e temperatura retal), mas não provocou o mesmo efeito em animais aparentemente saudáveis (CHANG et al., 1994). Em contraste, a suplementação de Cr (3 mg/dia sob a forma de levedura) não afetou a proliferação de linfócitos obtidos de animais previamente inoculados com o herpesvírus-1 bovino, mesmo após indução com mitógenos (Con A, fitohemaglutinina e PWM – mitógeno derivado da *Phytolacca americana*, planta popularmente conhecida como “tintureira”) (ARTHINGTON et al., 1997). Outros estudos em bovinos não verificaram efeitos da suplementação de Cr (0,4 mg/kg de dieta sob as formas de CrCl_3 , complexo de Cr-ácido nicotínico ou levedura) na proliferação estimulada por fitohemaglutinina (PHA) ou PWM (KEGLEY & SPEARS, 1995; KEGLEY et al., 1996).

Os efeitos do cromo sobre a imunidade mediada por células também foram avaliados *in vivo* pela mensuração da sensibilidade cutânea (utilizando um paquímetro) após a aplicação percutânea de dinitroclorobenzeno (DNCB) ou injeção intradérmica de PHA. Em bezerros submetidos a transporte prolongado e sensibilizados com DNCB, a

suplementação de Cr não afetou a resposta inflamatória (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; KEGLEY et al., 1997), mas em contrapartida, a adição de 0,4 mg de Cr/kg de dieta (na apresentação de CrCl₃ ou complexo de Cr-ácido nicotínico) aumentou a resposta inflamatória à injeção intradérmica de PHA em bezerros que recebiam um substituto do leite (KEGLEY et al., 1996).

Poucos experimentos avaliaram os efeitos do cromo sobre a produção de mediadores da inflamação. Porém, resultados de alguns estudos iniciais sugerem que o Cr possui uma função como imunomodulador, apesar de não ter interferido positivamente na produção de citocinas: células mononucleares provenientes de vacas leiteiras suplementadas com 0,5 mg de Cr/dia com quelato de Cr produziram baixas concentrações de interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) após a estimulação com Con A em relação às células oriundas de vacas controle (que não receberam suplementação de Cr) (BURTON et al., 1996). Entretanto, em outro estudo, as concentrações de TNF- α não foram afetadas pela suplementação de Cr (na forma de levêdo) em animais antes ou após a inoculação de herpesvírus-1 bovino (ARTHINGTON et al., 1997).

Não existem evidências de que o cromo seja capaz de alterar a capacidade dos fagócitos em destruir ou fagocitar os microrganismos. Neutrófilos isolados de vacas leiteiras suplementadas com 0,5 mg de Cr/kg de dieta e neutrófilos isolados de vacas não suplementadas com Cr apresentaram a mesma capacidade fagocítica em ensaios de fagocitose (CHANG et al., 1996). De maneira semelhante, a adição de levedura à dieta de bezerros não alterou a habilidade dos neutrófilos em eliminar *Staphylococcus aureus* (ARTHINGTON et al., 1997).

Em ovinos, Gentry et al. (1999) mensuraram a resposta proliferativa dos linfócitos periféricos e verificaram que os animais alimentados com dietas de alta concentração protéica (100% dos requerimentos estabelecidos pelo NRC/1985) e suplementados com Cr apresentaram uma resposta aumentada à incubação com 4 μ g/mL de PHA. Entretanto, a proliferação dos linfócitos provenientes de animais alimentados com dietas de baixa concentração de proteínas (80% dos requerimentos estabelecidos pelo NRC/1985), mesmo suplementados com Cr, apresentou as menores taxas. Contudo, nesse experimento os autores não mensuraram a quantidade de cromo presente na dieta base, o que pode ter influenciado de maneira significativa nos resultados.

3.11.2 *Imunidade Humoral*

Os efeitos do cromo dietético sobre a imunidade humoral têm sido avaliados pela quantificação da produção de anticorpos específicos após a inoculação de uma proteína ou vacina. Burton et al. (1993) verificaram que tanto as respostas humorais primárias como as respostas humorais secundárias à albumina do ovo foram maiores no grupo de animais suplementados com 0,5 mg de Cr quelatado/kg de dieta. É importante ressaltar que este resultado foi obtido utilizando-se vacas no período próximo ao parto e que, portanto, estavam submetidas ao estresse: a primeira inoculação ocorreu 2 semanas pré-parto e a segunda, 2 semanas pós-parto. Nesse mesmo estudo, os animais foram desafiados com eritrócitos humanos, mas a adição de cromo à dieta não afetou a resposta humoral a esse antígeno.

Em animais submetidos a estresse físico e metabólico devido ao transporte e à restrição alimentar, a suplementação de cromo (0,2-1,0 mg/kg de dieta durante 30 dias sob a apresentação de levedura) aumentou a resposta primária de anticorpos, mas não a resposta secundária aos eritrócitos humanos (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993). Em contraste, a adição de 0,4 mg de Cr/kg de dieta na forma de ácido nicotínico aumentou a resposta de anticorpos específicos contra os eritrócitos de suínos (KEGLEY et al., 1996). Em adição, Burton et al. (1994) verificaram que a suplementação de Cr na forma de quelatos de cromo 6 dias antes e 28 dias após a vacinação aumentou os títulos séricos de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), mas não contra os vírus da parainfluenza tipo 3.

3.11.3 *Resistência a Doenças*

Os efeitos do cromo dietético sobre as respostas fisiológicas têm sido avaliados tanto em infecções naturais quanto em desafios experimentais. Os estudos realizados com infecções naturais, normalmente têm utilizado bovinos estressados pelo transporte prolongado ou restrição alimentar, onde se verifica uma maior prevalência de doenças respiratórias. Nesses casos, a suplementação de cromo reduziu a morbidade em alguns estudos como os de Moonsie-Shageer & Mowat (1993), Mowat et al. (1993) e Lindell et al. (1994), mas não em outros estudos como aqueles realizados por Chang & Mowat (1992), Chang et al. (1995) e Mathison & Engstrom (1995).

Em desafios experimentais, iniciou-se a suplementação de cromo 49-75 dias antes do desafio e os animais suplementados com 0,4 mg de Cr/kg de dieta (na forma de ácido nicotínico ou CrCl_3) apresentaram tendência de menor temperatura corporal após a inoculação intranasal de vírus da IBR seguido por inoculação de *Pasteurella haemolytica* intratraqueal 5 dias mais tarde (KEGLEY et al., 1996). A suplementação de 0,4 mg de Cr/kg de dieta sob a forma de ácido nicotínico nos 56 dias anteriores ao início do estímulo estressante (transporte) não afetou a temperatura retal ou o consumo voluntário de bezerros desafiados com vírus da IBR (KEGLEY et al., 1997). Em adição, a temperatura retal de bezerros desafiados com herpesvírus bovino tipo 1 não apresentou diferenças devido à adição de cromo (ARTHINGTON et al., 1997).

Capítulo Único

Efeitos da Suplementação de Cromo (Cr) Sobre o Desempenho Produtivo, a População de Protozoários e a Resposta Imunitária em Ovinos

Efeitos da Suplementação de Cromo (Cr) Sobre o Desempenho Produtivo, a População de Protozoários e a Resposta Imunitária em Ovinos

B. S. L. Dallago¹, H. Louvandini¹, C. McManus¹, D. F. Caldeira¹, A. C. Lopes¹, P. H. F. Teles¹, R. P. Branquinho¹, E. F. Gomes¹, R. T. Burtet²

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, CEP 70910-900 - Brasília-DF, Brasil

²Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900 – Brasília-DF, Brasil

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de determinar a influência da suplementação de cromo (Cr) dietético sobre o desempenho produtivo, população de protozoários ruminais e resposta imunitária em ovinos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições. Para tanto foram utilizados 24 ovinos inteiros da raça Santa Inês com peso vivo médio inicial de $22,89 \pm 2,23$ kg e idade aproximada de três meses e 15 dias distribuídos em quatro tratamentos com níveis crescentes de cromo suplementar na dieta sob a forma de picolinato de cromo (CrPic): placebo; 0,250; 0,375 e 0,500 mg de Cr/dia. A duração do experimento foi de 99 dias, dos quais os 15 primeiros dias foram destinados à adaptação às instalações e ao alimento a ser fornecido durante o experimento (feno de *Panicum maximum* cv Massai e concentrado composto por 85% de farinha de mandioca, 11,5% de sal mineral e 3,5% de uréia). A suplementação com cromo foi feita durante os 84 dias restantes. Durante o período experimental os animais permaneceram confinados em baias individuais. A quantidade de alimento oferecido foi mensurada diariamente enquanto o controle da quantidade de sobras foi realizado três vezes por semana. As pesagens dos animais foram realizadas quinzenalmente. Amostras de líquido ruminal foram colhidas no primeiro dia e nos dias 21, 43, 63 e 84 do experimento para quantificação de protozoários ruminais. Nos dias 28º e 56º de experimentação, os cordeiros foram desafiados com aplicação intramuscular de albumina de ovo para posterior quantificação de IgG sérica específica. Avaliação da imunidade celular foi feita por teste cutâneo de hipersensibilidade retardada utilizando fitohemaglutinina (PHA). O Cr suplementar não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) sobre o desempenho produtivo e imunidade humoral, mas afetou negativamente ($P < 0,05$) a população de protozoários ruminais e a resposta imunitária celular dos ovinos. Palavras-chave: Anticorpos, Cordeiros, Linfócitos, Nutrição

Effects of Chromium (Cr) Supplementation on Performance, Ruminal Protozoa and Immune response of Lambs

ABSTRACT

The effect of chromium supplementation on performance, ruminal protozoa and immune response of lambs was investigated using 24 lambs of Santa Inês breed with initial average weight of 22.89 ± 2.23 kg. The lambs were assigned in four treatments with different levels of chromium picolinate (CrPic): placebo, 0.250, 0.375 and 0.500 mg of Cr/day. The lambs were kept in individual pens during two weeks for adaptation and 84 days for chromium supplementation and were feed with *Panicum maximum* cv Massai hay and concentrate (85% of cassava flour, 11.5% of mineral salt and 3.5% of urea). The control of quantity of food offered was measured daily and the control of orts was taken three times a week. The lambs were weighted every two weeks. Samples of ruminal contents were taken in the first and at 21st, 43rd, 63rd e 84th days of experiment to quantify the protozoa population. On day 28 and 56, the lambs were injected with chicken ovalbumin. Serum samples were subjected to an ELISA tests in order to measure the antibody production to chicken ovalbumin. The cell-mediated immune response was determined by a delayed type hypersensitivity test (DTH) using phytohemagglutinin (PHA). The performance and humoral immunity were not affect by CrPic supplementation on lambs ($P>0.05$), but impaired the rumen protozoa population and the cellular immunity ($P<0.05$).

Key-words: Antibodies, Lambs, Lymphocytes, Mineral, Nutrition

1. INTRODUÇÃO

Pouco se sabe sobre a atuação do cromo (Cr) no desempenho produtivo dos animais de produção, tanto no que se refere aos mecanismos de ação desse mineral quanto em relação ao resultado final de sua suplementação sobre o organismo animal. O principal papel fisiológico do cromo é potencializar a ação da insulina ao facilitar a interação entre esta substância e seus receptores (NRC, 1997) e assim o metabolismo protéico, lipídico e de ácidos nucleicos também podem ser sensíveis à suplementação de cromo (ANDERSON, 1987) o que reflete tanto na manutenção de processos vitais quanto na produtividade animal. Sabe-se que algumas substâncias são tóxicas aos protozoários ruminais. O cromo, embora não esteja envolvido como agente defaunante, pode desempenhar este papel visto que é um metal pesado.

Por outro lado, a suplementação de Cr tem mostrado resultados controversos quando avaliada sob o ponto de vista imunitário: muitos trabalhos relatam efeitos positivos da suplementação com o mineral (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; CHANG & MOWAT, 1992) enquanto outros descrevem não haver influência deste elemento-traço sobre os parâmetros imunitários (ARTHINGTON et al., 1997; KEGLEY et al., 1997). Assim, definir a influência da suplementação de cromo sobre os parâmetros imunitários e produtivos poderá fornecer mais uma ferramenta no combate às diversas enfermidades e auxiliará na busca por maior produtividade.

No intuito de progredir nessa busca, o presente experimento teve por finalidade investigar os efeitos da suplementação de cromo sobre o desempenho produtivo, sobre a população de protozoários ruminais e também a influência do mineral na capacidade imunitária dos animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Local*

Este experimento foi desenvolvido no período de Julho a Outubro de 2007 no Centro de Manejo de Ovinos da Fazenda Água Limpa de propriedade da Universidade de Brasília – UnB e localizada no Núcleo Rural Vargem Bonita a aproximadamente 25 km do centro de Brasília - DF. O clima da região é do tipo AW pela classificação de Köppen, com temperatura média anual de 21,1 °C, tendo 16 °C e 34 °C como mínima e máxima absolutas, respectivamente. A precipitação anual média é de 1.578,5 mm e a média anual de umidade relativa do ar em 2007, foi de 72%.

2.2 *Animais e Instalações*

Foram utilizados 24 cordeiros machos inteiros da raça Santa Inês pertencentes ao rebanho da Fazenda Água Limpa – FAL/UnB. Os animais possuíam peso vivo médio inicial de $22,89 \pm 2,23$ kg e idade aproximada de três meses e 15 dias. Antes do início do experimento, todos os animais foram tratados com cloridrato de Levamisol p.o. (Fort Dodge Ripercol-L[®]) na dose recomendada pelo fabricante e receberam injeção i.m. de ferro (Tortuga Ferrodex[®]) e vitaminas A, D e E (Pfizer A-D-E[®]) nas doses recomendadas pelos fabricantes além de serem submetidos a exame clínico, exame coprológico e mensuração do hematócrito a fim de evitar que animais doentes ou com parasitas gastrintestinais iniciassem o experimento.

Os ovinos foram alocados em baias individuais medindo 1,40 x 2,10 metros, protegidas das intempéries climáticas. No interior de cada uma das baias havia um cocho para água, um para o volumoso e outro para o concentrado e a baia era recoberta com cama para evitar o contato direto dos animais com o chão.

2.3 *Manejo Alimentar, Adaptação e Tratamentos*

Com base no peso vivo os 24 cordeiros foram distribuídos em quatro tratamentos contendo seis animais. Os cordeiros eram alimentados duas vezes ao dia da seguinte

maneira: pela manhã recebiam todo o concentrado composto de 85% de farinha de mandioca, 11,5% de sal mineral e 3,5% de uréia e metade do volumoso constituído de feno de *Panicum maximum* cv Massai sendo que a outra metade foi fornecida no período da tarde, respeitando-se sobre de 10% (*ad libitum*). As análises bromatológicas dos alimentos utilizados foram feitas de acordo com Silva & Queiroz (2006) e encontram-se na Tabela 2. Para estas análises, foram tomadas várias amostras, as quais foram misturadas obtendo-se uma amostra composta.

Tabela 2. Composição bromatológica dos alimentos fornecidos aos ovinos em g kg⁻¹ de matéria seca (MS).

Constituintes	Concentrado	Feno de <i>Panicum maximum</i> cv. Massai
Matéria seca (g/kg)	904,1	873,6
Fibra em Detergente Neutro (g/kg MS)	68,0	721,2
Fibra em Detergente Ácido (g/kg MS)	32,4	408,5
Proteína (g/kg MS)	104,4	63,3
Extrato etéreo (g/kg MS)	7,4	24,3
Matéria mineral (g/kg MS)	105,4	67,3
Fósforo (g/kg MS)	6,1	1,0
Cromo (ppm)	0,025	0,0145

Com o desenvolvimento dos ovinos a quantidade inicial de 300g de concentrado/animal/dia foi aumentada para 400g de concentrado/animal/dia, a partir do 42º dia de experimentação. O controle da quantidade de alimento oferecido foi diário, e o das sobras, três vezes por semana (segunda – quarta – sexta). A água foi consumida *ad libitum*.

Os animais permaneceram confinados durante todo o experimento (99 dias) e passaram por um período inicial de duas semanas para adaptação às novas condições. Acompanhamento clínico foi realizado duas vezes durante o experimento e envolveu auscultação pulmonar e de vias aéreas superiores, auscultação cardíaca, aferição da temperatura e avaliação de mucosas. O resultado destes exames apresentaram-se dentro dos parâmetros normais. Deste modo, nenhum cordeiro apresentou sinais de doença durante o período experimental.

A suplementação de cromo foi feita pela ingestão diária individual pela manhã de cápsulas com concentrações crescentes de picolinato de cromo (CrPic) nas seguintes quantidades: placebo (tratamento Cr0); 0,250 mg de Cr (tratamento Cr1); 0,375 mg de Cr (tratamento Cr2) e 0,500 mg de Cr (tratamento Cr3).

2.4 Colheita do Líquido Ruminal, pH ruminal e Contagem de Protozoários Ruminais

Amostras de líquido ruminal foram colhidas no primeiro dia e nos dias 21, 43, 63 e 84 do experimento para quantificação de protozoários do rúmen. Nestes dias, 3 horas após terem recebido a dieta matinal, cerca de 15 a 20 mL de líquido ruminal foram colhidos via esôfago por meio de sonda flexível de silicone acoplada à bomba de vácuo. O líquido foi imediatamente filtrado em gaze estéril e seu pH e temperatura foram aferidos com o auxílio de peagâmetro modelo pH330i (WMW[®]). Posteriormente, o líquido ruminal foi diluído em solução de TBFS (Trypan Blue Formol Salina) na proporção de 1:5 (vol/vol) líquido ruminal:TBFS e armazenado a 4° C para posterior análise. A contagem de protozoários ruminais ocorreu por microscopia de luz em aumento de 400x utilizando-se um hemacitômetro (câmara de Neubauer). A Figura 2 ilustra o procedimento.

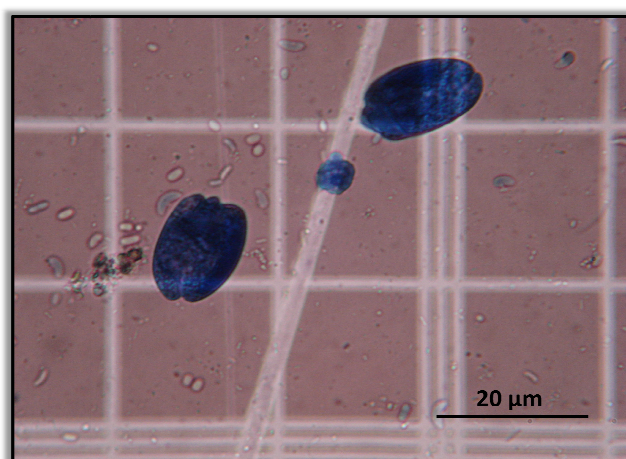


Figura 2. Protozoários ruminais corados com solução TBFS.

2.5 Determinação do Cromo

Todas as determinações de cromo realizadas neste experimento foram feitas por Espectrometria de emissão atômica indutivamente acoplada a plasma de argônio em espectrômetro de modelo Thermo Jarrell Ash IRIS/AP[®] - Laboratório de Química Analítica de Plantas/CPAC/EMBRAPA. Estas amostras foram incineradas em mufla a 450 °C e posteriormente submetidas a digestão clorídrica conforme descrito por Silva & Queiroz (2006). A água consumida pelos animais foi analisada do mesmo modo, com a ressalva de que por apresentar-se líquida não foi necessário realizar a digestão clorídrica.

2.6 Desempenho Produtivo

Os cordeiros foram pesados quinzenalmente. O ganho médio diário em peso (GMD) foi calculado com base na diferença dos pesos inicial e final de cada um dos animais dividida por 84 dias de experimentação. O consumo médio diário de matéria seca (CMD) foi calculado através da diferença entre a quantidade de alimento ofertada por dia e da sobra de feno e concentrado recolhidos antes de uma nova refeição, dividido pelo número de controles de sobra efetuados.

2.7 Resposta Imunitária Humoral

Nos dias 28º e 56º de experimentação, todos os cordeiros foram desafiados com 2 mg i.m. de albumina de ovo (SIGMA[®] A5503) em 4 mL de mistura 1:1 (vol/vol) de PBS:adjuvante incompleto de Freund (PIERCE[®] 77145). Tendo em vista o caráter oleoso do Adjuvante Incompleto de Freund, foi realizada uma forte agitação na seringa momentos antes da injeção visando aumentar as chances de reconhecimento do antígeno pelo sistema imunitário. Nos dias 46º e 74º do experimento, foi colhido sangue em tubo sem anti-coagulante que em seguida foi submetido a centrifugação (1.700 rpm por 15 minutos) para separação do soro sanguíneo. O soro foi armazenado a -18 °C até que se procedessem as análises dos títulos de IgG anti-albumina de ovo no Laboratório de Biologia Molecular/UnB através de método ELISA descrito por Minton et al. (1991) e pormenorizado a seguir.

Placas plásticas de fundo chato (TPP[®] 92696) contendo 96 poços foram sensibilizadas (100 µL/poço) com solução de ovoalbumina + PBS na concentração de 10 µg/mL e incubadas a 23 °C por 1 hora. Em seguida o conteúdo livre dos poços foi descartado e cada poço foi lavado 3 vezes com solução de PBST 0,1% (150 µL de PBST/poço), procedimento este, conhecido por “lavagem”. A partir daí, procedeu-se com o bloqueio da placa. Para tanto, cada poço foi preenchido com 200 µL de gelatina a 3% e permaneceram deste modo por 1 hora a 23 °C. Posteriormente, repetiu-se o procedimento de lavagem com PBST 0,1% e em seguida os soros testes foram adicionados em triplicata na diluição de 1:20 (vol/vol) de soro:PBS. A placa foi incubada a 23 °C por 2 horas e então foi submetida a mais um procedimento de lavagem. Em seqüência, o anticorpo anti-IgG de ovinos conjugado com fosfatase alcalina (PIERCE[®] 31360) diluído 1:10000 (vol/vol) anticorpo:PBS foi adicionado (100 µL/poço) e a placa novamente foi submetida

a incubação por 1 hora a 23 °C, quando recebeu a última lavagem com PBST, sendo preenchida, em seguida, com solução de APB (100 µL/poço) até que a solução de revelação estivesse pronta (cerca de 3 minutos). Após o descarte da solução de APB presente na placa, a solução de revelação composta por PNPP (PIERCE® 34047) e APB na proporção de 2 tabletes de PNPP para cada 10 mL de APB foi adicionada (100 µL/poço). A leitura das placas foi realizada por leitora da marca SGCQC® modelo ELx 800 em comprimento de onda de 405 nm, 60 minutos após a adição da solução de revelação.

2.8 Resposta Imunitária Celular

Para avaliação dos efeitos do Cr sobre a imunidade celular, foi realizado um teste cutâneo de hipersensibilidade retardada utilizando fitohemaglutinina (INVITROGEN® 10576015) segundo a técnica descrita por Kegley & Spears (1995). No 22º dia de experimentação a região cervical no antímero direito do animal foi cuidadosamente limpa, tricotomizada e desinfetada com álcool 70%. Em seguida, um círculo com diâmetro aproximado de 4 cm foi demarcado e a espessura da dobra de pele na região foi mensurada 3 vezes com um paquímetro. Os valores obtidos foram anotados. A partir daí, foi injetado (no centro do círculo) 100 µL de fitohemaglutinina (PHA) intra-dérmico e o aumento da espessura da dobra da pele foi acompanhado em intervalos pré-determinados de 15, 30, 60, 120, 240, 360, 1440 e 2880 minutos com auxílio do paquímetro, sendo que a cada intervalo 3 medidas foram efetuadas, tendo seus valores anotados. A Figura 3 ilustra o procedimento.



Figura 3. Mensuração da dobra de pele após injeção intra-dérmica de PHA.

2.9 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro níveis crescentes de Cr suplementar (0; 0,25; 0,375 e 0,500 mg/dia) e seis repetições cada.

A análise dos dados foi feita através do Statistical Analysis System (SAS, 1999) usando os procedimentos de regressões polinomiais pertinentes com nível de significância a 5%.

Para a análise dos dados referentes ao teste cutâneo de hipersensibilidade retardada foram realizadas regressões lineares baseadas nas mensurações de espessura de pele feitas no decorrer do tempo para cada animal. Deste modo foi possível confirmar o comportamento linear de crescimento da espessura de pele em relação ao tempo (0 minutos ao pico em 1440 minutos pós-injeção). Em seguida, o coeficiente angular das equações de retas obtidas por esse procedimento foram utilizadas na análise de variância entre tratamentos por regressão polinomial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Consumo de Cromo e Desempenho Produtivo

A Tabela 3 apresenta o consumo médio de Cr por parte dos animais bem como os dados referentes ao peso médio inicial (PI), peso médio final (PF), ganho médio diário em peso (GMD), ganho em peso total (GT) e consumo médio diário de matéria seca (CMD) nos diferentes tratamentos. A ingestão de Cr através da água de beber foi desprezível, haja vista a detecção de quantidades ínfimas de 6,8 ppb (0,0068 mg/L) de Cr na água fornecida aos animais.

A suplementação dietética de Cr sob a forma de CrPic nas doses de 0,250; 0,375 e 0,500 mg de Cr/dia não demonstrou efeitos significativos sobre os parâmetros de desempenho produtivo mensurados: peso dos cordeiros, GMD, GT e CMD.

Tabela 3. Médias dos valores referentes ao consumo com base na matéria seca (MS) e desempenho produtivo dos ovinos.

Item	Tratamentos (mg de Cr/dia)				CV ¹	Regressão (P=0,05)
	0,000	0,250	0,375	0,500		
Consumo de Cr (mg/kg de MS)	0,014	0,264	0,389	0,514		
Consumo médio diário (kg de MS)	0,923	0,798	0,863	0,797	12,68	NS ²
Peso inicial (kg)	23,600	22,570	22,200	23,180	10,10	NS
Peso final (kg)	30,167	29,067	29,367	29,600	8,29	NS
Ganho médio diário (kg)	0,078	0,077	0,085	0,076	21,61	NS
Ganho total (kg)	6,567	6,500	7,167	6,417	21,61	NS

¹CV = coeficiente de variação

²NS = não significativo

Embora os requerimentos dietéticos de cromo não estejam definidos, mesmo porque a essencialidade deste mineral ainda não é unanimidade no meio científico, o NRC (2005) estabeleceu que os níveis máximos toleráveis de Cr são: 3.000 mg de Cr/kg quando na forma de óxidos e de 100 mg de Cr/kg sob a forma de cloretos. Ainda que o presente experimento tenha trabalhado com uma forma orgânica de Cr, e sabidamente esta forma apresente maior capacidade de absorção que formas inorgânicas (STARICH & BLINCOE, 1983), os níveis do mineral aqui empregado estiveram cerca de 1.000 vezes abaixo dos limites impostos pelo NRC (2005). Pesquisas utilizando o Cr como

suplemento alimentar para animais de produção utilizaram diversas formas (orgânicas, inorgânicas e sintéticas) do elemento-traço como o cloreto de cromo, leveduras, cromo-ácido nicotínico, proteinato de cromo, metalosato de cromo e o picolinato de cromo em diferentes modelos animais como os bovinos, suínos, ovinos e frangos. Contudo, nesses experimentos os níveis de Cr dietético, independentemente de sua forma, não ultrapassaram 1,0 mg de Cr/kg da dieta. Vale ressaltar que experimentos utilizando a suplementação de Cr realizados com ovinos (KITCHALONG et al., 1995; GARDNER et al., 1998; GENTRY et al., 1999; MOSTAFA-TEHRANI et al., 2006), em sua maioria, trabalharam com valores não inferiores a 0,2 mg de Cr/kg de dieta e não ultrapassaram o nível de 0,4 mg de Cr/kg da dieta, enquanto experimentos com bovinos (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; BURTON et al., 1993; KEGLEY & SPEARS, 1995; KEGLEY et al., 1996; ARTHINGTON et al. 1997; KEGLEY et al., 1997), que por sua vez possuem massa corporal muito maior, mesmo em se tratando de bezerros, os níveis de suplementação de Cr não foram além de 3,0 mg de Cr/kg da dieta. O experimento realizado por Page et al. (1993) utilizou diversos níveis de Cr dietético (0, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/kg da dieta) sob a forma de CrPic e revelou que em alguns parâmetros mensurados como o GMD e a proporção de músculos na carcaça, a suplementação de 0,8 mg de Cr/kg da dieta apresentou efeitos positivos (elevação da área do músculo *longissimus dorsi*) em menor intensidade quando comparado a níveis de suplementação um pouco menor (0,4 mg de Cr/kg da dieta). Mallard et al. (1999) faz referência a este tipo de comportamento chamando-o de “zona de ação biológica”, onde os padrões de resposta a elevações na concentração dietética de Cr atingem um pico e à medida em que os níveis dietéticos continuam a aumentar além de um certo ponto, a suplementação passa a apresentar efeitos positivos numa escala decrescente. Deste modo, com base em experimentos anteriores, incrementos no nível de suplementação de cromo além de 0,6 mg de Cr/kg da dieta não são indicados justificando a manipulação do mineral em níveis entre 0,25 a 0,5 mg de Cr/dia utilizados no presente experimento e que forneceram respectivamente 0,264 mg de Cr/kg da dieta, 0,389 mg de Cr/kg da dieta e 0,514 mg de Cr/kg da dieta.

Em adição, o CrPic parece não exercer qualquer efeito sobre o apetite uma vez que o consumo médio diário também não foi afetado pela suplementação do mineral. Corroborando a isso, Kitchalong et al. (1995) e Mostafa-Tehrani et al. (2006) não detectaram alterações significativas no consumo de matéria seca por parte de ovinos

suplementados com Cr e Page et al. (1993) relatam não haver diferença no consumo alimentar entre suínos que receberam ou não suplementação de Cr. Em oposição, Moonsie-Shageer & Mowat (1993) observaram aumento no consumo de matéria seca por parte de bovinos quando suplementados com Cr.

Os resultados referentes ao CMD refletem diretamente sobre os parâmetros de desempenho produtivo uma vez estes dependem grandemente daquele. Como não houve diferença significativa na ingestão de alimento, era de se esperar que também não seriam detectadas diferenças nos parâmetros produtivos pois o aporte de nutrientes foi semelhante para todos os animais. Assim, apenas fatores individuais relacionados ao metabolismo dos nutrientes ou fatores coletivos em virtude do tratamento seriam capazes de modificar o aproveitamento dos alimentos, refletindo sobre o desempenho animal e logicamente sobre a eficiência alimentar. Contudo esse não foi o caso, demonstrando que o CrPic não influenciou significativamente os índices de desempenho produtivo.

Outros estudos utilizando ovinos como modelo animal encontraram resultados semelhantes. Por exemplo, Gentry et al. (1999) relataram que nenhuma diferença significativa sobre o GMD e peso da carcaça foi observada entre os tratamentos. Do mesmo modo, Kitchalong et al. (1995) verificaram que o ganho médio diário de peso e a média de peso final de ovinos Suffolk não foram influenciados pela suplementação de 0,250 mg de CrPic/kg de dieta. Em adição, estudo mais recente conduzido por Mostafa-Tehrani et al. (2006) revela que não houve diferença significativa no peso final, ganho em peso total ou na média de ganho em peso entre ovinos que receberam ou não diversos níveis de Cr dietético (200, 600 ou 1000 µg de Cr/kg da dieta) sob a forma de nicotinato de Cr ou cloreto de cromo. Em nenhum destes estudos havia a presença concomitante de agentes estressores.

Com bovinos, a resposta à suplementação de cromo mostrou-se variável, de modo que Chang & Mowat (1992), Moonsie-Shageer & Mowat (1993) e Kegley et al. (1997) verificaram efeitos positivos da suplementação deste mineral sobre o ganho de peso enquanto Bunting et al. (1994), Mathison & Engstrom (1995) e Swanson et al. (2000) não observaram qualquer efeito positivo da suplementação sobre este parâmetro. Contudo, é importante destacar que condições estressantes estavam presentes nos experimentos conduzidos por Chang & Mowat (1992), Moonsie-Shageer & Mowat (1993), Kegley et al. (1997) e ausentes nos trabalhos desenvolvidos por Bunting et al. (1994) e Swanson et al. (2000).

Respostas variáveis à suplementação de Cr também foram relatadas em experimentos realizados com suínos. Page et al. (1993) verificaram elevações no ganho de peso de animais suplementados com 0,050 e 0,200 mg de CrPic/kg de dieta porém registraram decréscimos no mesmo parâmetro nos animais que receberam 0,100 mg desta substância/kg de dieta. Mooney & Cromwell (1997) observaram a interferência positiva da suplementação de CrPic sobre o ganho médio em peso, mas não sobre a conversão alimentar. Por outro lado, Evock-Clover et al. (1993) e Amoikon et al. (1995) não detectaram diferenças significativas no crescimento e desempenho de suínos.

Assim, os resultados aqui apresentados, associados aos resultados obtidos por outros pesquisadores (CHANG & MOWAT, 1992; MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; KEGLEY et al., 1997) reforçam a idéia de que a melhora no desempenho produtivo de animais suplementados com Cr está condicionada à ocorrência de períodos de estresse uma vez que os resultados positivos da utilização de Cr sobre o desempenho produtivo ocorreram em sua maioria sob a influência de um estressor, seja ele uma longa viagem, períodos de restrição alimentar, alta demanda energética, alta carga de exercícios físicos, prenhez ou amamentação. Quando não há a presença de um fator estressor, a suplementação com o elemento-traço parece não afetar de forma significativa o desempenho animal como pôde ser constatado no presente experimento. Isto pode estar relacionado ao papel potencializador exercido pelo cromo sobre a insulina, pois na presença de um estressor, ou seja, quando há elevada concentração sérica de cortisol, a demanda metabólica por carboidratos torna-se aumentada, elevando a glicemia. Com isto, o Cr é mobilizado para atuar junto à insulina e, em seguida, invariavelmente é excretado pela urina, elevando a concentração de Cr urinário e reduzindo a concentração de Cr no organismo. No caso de um animal suplementado com o mineral, o Cr perdido via urina seria repostado pelo Cr suplementar, suprimindo a demanda orgânica pelo mineral. Em um animal não suplementado, a ação da insulina ficaria prejudicada em virtude da ausência de Cr na quantidade demandada pelo organismo. Assim, o aporte de glicose para as células estaria diminuído, reduzindo a quantidade de energia prontamente disponível a estas, enquanto na ausência de agente estressor, a demanda por Cr não se elevaria, de maneira tal que o cromo suplementar não seria requisitado pelo organismo e, portanto, a suplementação seria dispensável.

3.2 pH Ruminal e Contagem de Protozoários Ruminais

O pH ruminal não foi influenciado pelos tratamentos com valores médios de $6,476 \pm 0,279$ estando dentro da variação normal. A Figura 4 apresenta os valores médios de concentração de protozoários ruminais das cinco colheitas de líquido ruminal por tratamento. Houve relação linear negativa entre o consumo de Cr e a contagem de protozoários ($p=0,0013$), ou seja, quanto maior a suplementação dietética de Cr, menor a concentração de protozoários ruminais.

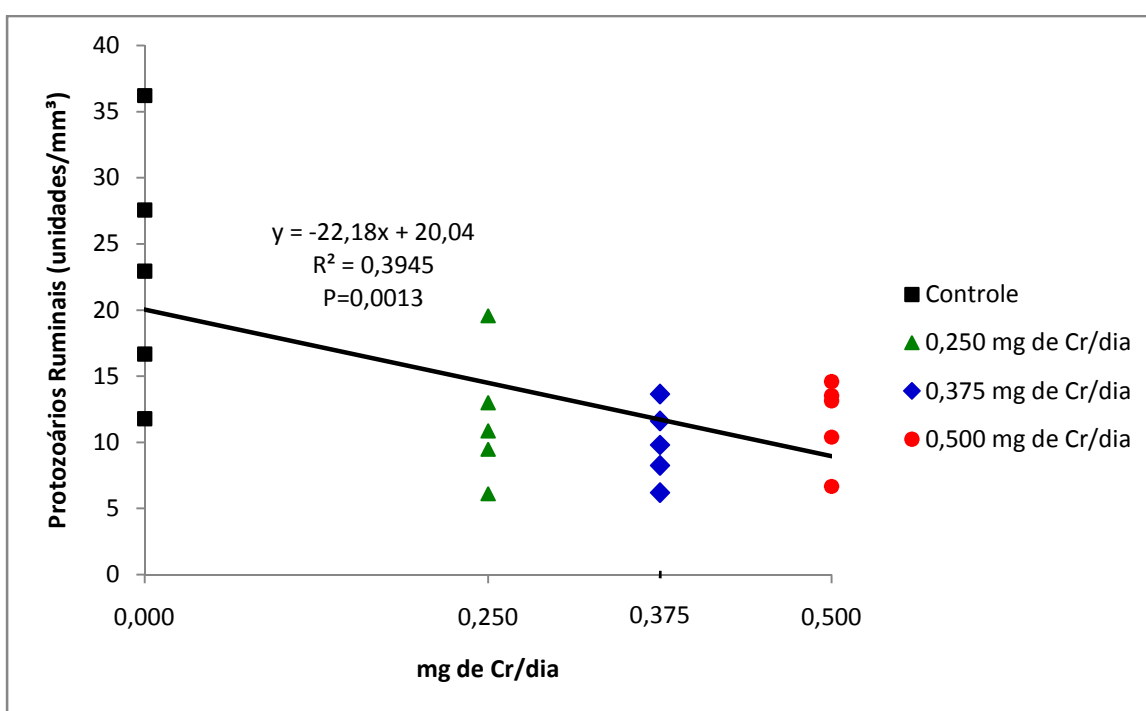


Figura 4. Concentração de protozoários ruminais em função do cromo suplementar.

Embora o cromo trivalente não seja apontado como agente defaunante (NRC, 2006), o elemento é um metal pesado e, portanto, possui potencial tóxico podendo causar danos ao material genético, interferir sobre funções metabólicas essenciais ou formar compostos altamente reativos (MERRILL et al., 2001; HODGSON et al., 2004; KLAASSEN, 2006; STOECKER, 2006) o que aumentaria o estresse oxidativo nestes microrganismos ruminais levando-os à morte, ou prejudicando sua reprodução, o que explicaria os efeitos observados aqui.

A manipulação da microbiota ruminal é uma realidade e as pesquisas nesta direção devem levar em consideração que o rúmen é um nicho ecológico complexo onde a sobrevivência de certos organismos dependem da existência de outros e a auto-

regulação existente é importante para o ruminante como um todo (MACKIE, 1997). Assim, prejuízo na população de protozoários ruminais pode comprometer a sanidade e a produtividade do animal hospedeiro por afetar o equilíbrio ecológico no interior do rúmen. |

Dehoroty (2004) afirmou que a modificação mais importante em consequência da ausência de protozoários ruminais é o aumento no número de bactérias no rúmen, o que pode, em última análise, refletir sobre o crescimento animal. Alguns estudiosos acreditam que as proteínas provenientes de protozoários possuam o mesmo valor biológico, mas que tenham maior digestibilidade que as proteínas bacterianas (McNAUGHT et al., 1954; DEHOROTY, 2004), embora apresentem menor taxa de passagem (DEHOROTY, 2004). Em adição, Chandhary et al. (1995) concluíram que a defaunação diminui a degradabilidade de carboidratos estruturais, o que reduz a vantagem biológica dos ruminantes de se alimentarem de pastagens.

Takenaka & Itabashi (1995) estudaram animais mono-defaunados e verificaram que de acordo com a espécie de protozoários extinta, há um comportamento distinto das bactérias indicando que mesmo a defaunação de uma determinada espécie provoca alterações gerais na ecologia ruminal uma vez que a proliferação de determinado gênero modifica as quantidades de substratos e metabólitos presentes no rúmen. Deste modo, o prejuízo sobre os protozoários ruminais causado pelo cromo merece maiores investigações.

3.3 Resposta Imunitária Humoral

Os valores referentes à absorvância em 405 nm de anticorpos IgG anti-albumina de ovo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios de absorvância no teste de ELISA.

Absorvância ¹ %	Tratamentos (mg de Cr/dia)				CV ²	Regressão (P<0,05)
	0,000	0,250	0,375	0,500		
1º Desafio	0,4941	0,5013	0,5094	0,5202	11,57	NS ³
2º Desafio	0,7938	0,8966	0,9308	0,9353	14,87	NS

¹Os valores foram mensurados em absorvância a 405 nm

²CV = coeficiente de variação

³NS = não significativo

Em nenhum dos dois desafios realizados foi observada relação significativa entre as quantidades de IgG e os teores de CrPic dietético nos ovinos. Deste modo, a suplementação CrPic não melhorou a produção de IgG em resposta ao desafio imune.

O emprego de desafio imunitário para mensurar o efeito da suplementação com Cr sobre a imunidade humoral é um método relativamente bem difundido no meio científico. Contudo, sua utilização tem ocorrido quase que exclusivamente em bovinos (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; BURTON et al., 1993; KEGLEY & SPEARS, 1995; KEGLEY et al., 1996) com resultados controversos da atuação do Cr suplementar sobre a produção de anticorpos específicos. Na literatura consultada não foi observada o emprego da albumina de ovo para averiguar o papel do Cr sobre a produção de anticorpos em ovinos dificultando a discussão destes resultados com trabalhos da mesma espécie aqui avaliada.

Em oposição aos resultados obtidos no presente trabalho, Burton et al. (1993) verificaram a ocorrência de títulos aumentados de anticorpos contra albumina de ovo em vacas leiteiras no período periparto ou em início de lactação que receberam dieta suplementada com 0,5 mg de Cr quelatado/dia, mas nos mesmos animais, e sob as mesmas condições, não foi detectada diferenças significativas na produção de anticorpos contra eritrócitos humanos. Moonsie-Shageer & Mowat (1993) observaram títulos aumentados de anticorpos contra eritrócitos humanos 14 dias após o desafio com o imunógeno em bovinos submetidos a viagem por mais de 26 horas e que haviam sido tratados com Cr nas doses de 0,2; 0,5 e 1 mg de Cr/kg da dieta. Em adição, experimento utilizando bovinos submetidos a viagem de curta distância (menos de 100 km) demonstrou que a suplementação com levedura ou CrCl₃ não apresentou efeitos sobre os títulos séricos de IgM e IgG em resposta a desafio por vacinação contra *Pasteurella hemolytica* porém, quando sob a forma de nicotinato de Cr, a suplementação apresentou resultado positivo sobre a produção de IgG específica para a vacina (KEGLEY & SPEARS, 1995). Posteriormente Kegley et al. (1996) relataram que, em bezerras lactantes que recebiam substitutos de leite como principal fonte alimentar, o título séricos de anticorpos contra eritrócitos suínos não sofreu interferência da suplementação de 0,4 mg de Cr/kg de dieta independentemente das formas testadas (cromo-ácido nicotínico ou CrCl₃).

Resultados ainda mais intrigantes foram descritos por Kegley et al. (1997) ao verificarem que em situações livres de agente estressor as concentrações séricas de IgM

não foram afetadas pela suplementação de 0,4 mg de nicotinato de Cr/kg de matéria seca da dieta, mas nos animais que foram suplementados com o elemento as concentrações de IgG no soro estiveram diminuídas. Entretanto, quando os mesmos animais foram submetidos a transporte prolongado, efeitos da suplementação sobre estes parâmetros não foram notados.

Diversos pesquisadores utilizando outras espécies animais suscitaram a capacidade do Cr em modular a produção de anticorpos embora poucos tenham se arriscado a hipotetizar o mecanismo de ação pelo qual o Cr exerce sua influência. Isto deve-se, em parte, aos resultados inconsistentes entre as pesquisas, de modo que alguns estudos apontam a suplementação do mineral como algo positivo (MOONSIE-SHAGEER, 1993; BURTON et al., 1993; KEGLEY & SPEARS, 1995) enquanto outros relatam não haver diferença entre a utilização ou não do suplemento (KEGLEY et al., 1996) ou até mesmo a ocorrência de efeitos negativos (KEGLEY et al., 1997)

Segundo Mallard et al. (1999) as divergências relatadas na literatura quanto a atuação do Cr suplementar em relação à produção de anticorpos específicos possui um aparente comportamento antígeno-dependente no qual fatores como diferenças no tipo de antígeno, na dose administrada, no adjuvante utilizado, na via de administração e a história prévia de exposição do animal interferem sobremaneira na produção de anticorpos. Obviamente todos estes fatores exercem influência sobre a avaliação da resposta imunitária humoral, mas num desafio natural, os mesmos fatores também terão relevância na capacidade do indivíduo rechaçar uma infecção. Assim, embora a dificuldade em comparar os resultados entre experimentos persista, os resultados devem ser considerados válidos quando observados em uma situação específica dentro de população em particular a exemplo do presente trabalho.

3.4 Resposta Imunitária Celular

A Figura 5 ilustra as retas geradas por regressão linear das médias de crescimento da dobra de pele dos ovinos em relação ao tempo decorrido após a injeção intradérmica de fitohemaglutinina nos quatro tratamentos.

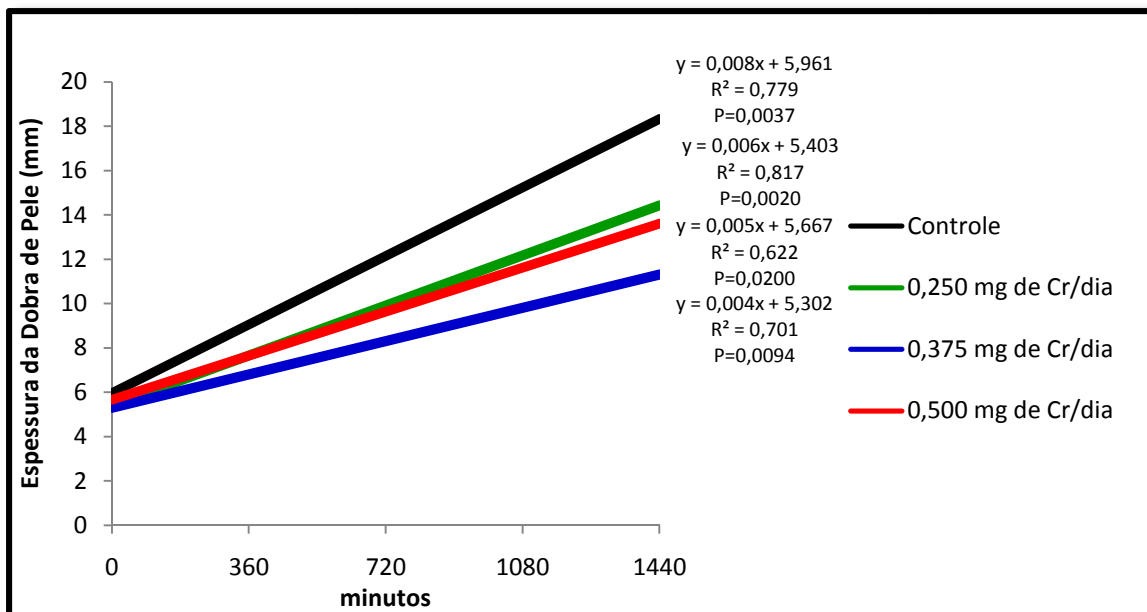


Figura 5. Relação entre a espessura da dobra de pele após a injeção de PHA, (hipersensibilidade cutânea retardada) e o tempo.

A Figura 6 apresenta os coeficientes angulares associados ao crescimento da dobra de pele após a sensibilização com o mitógeno. Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,023$) de modo que níveis crescentes de cromo na dieta implicaram em respostas menos acentuadas ao teste de hipersensibilidade cutânea retardada.

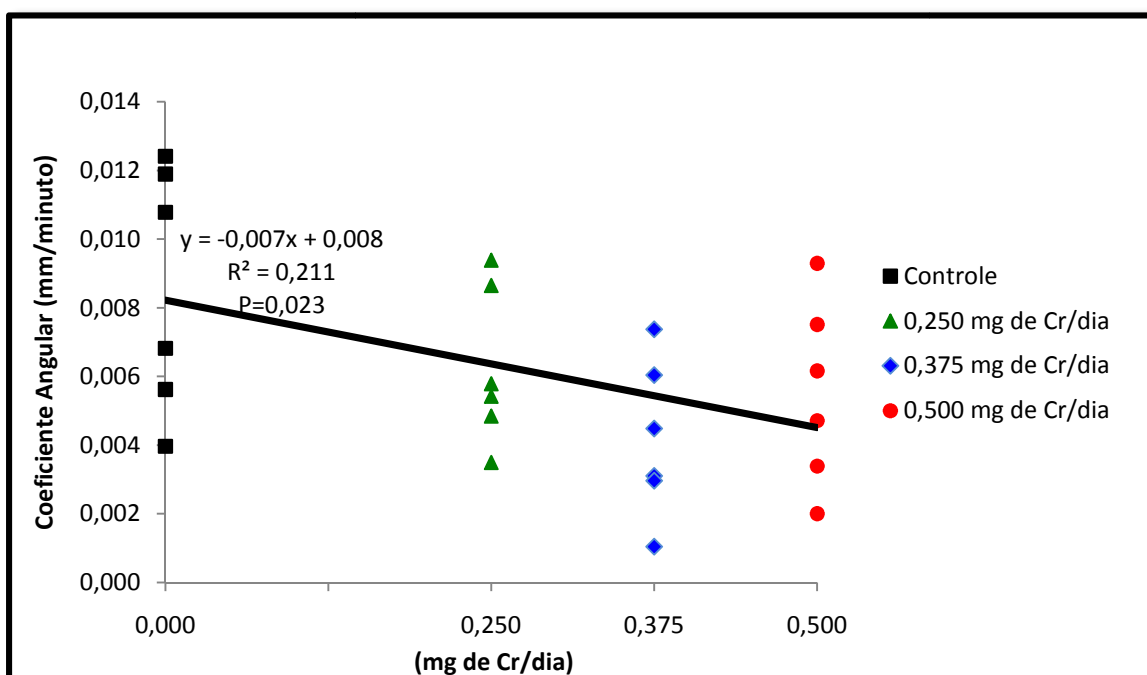


Figura 6. Relação entre o teor de Cr consumido e os coeficientes angulares das retas geradas a partir dos valores de dobra da pele após injeção de PHA.

Portanto, a suplementação dietética de CrPic a ovinos nos níveis de 0,250; 0,375 e 0,500 mg/dia afetou de forma negativa ao menos a capacidade de mobilização de linfócitos T frente a um desafio cutâneo, haja visto que a fitohemaglutinina liga-se especificamente a resíduos de açúcares nas glicoproteínas de superfície de células T, o que resulta na ativação destes linfócitos (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Uma vez ativados, os linfócitos T tornam-se responsáveis pela produção de sinais que irão culminar na efetivação da resposta imunitária celular, em especial, na ativação de macrófagos (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Experimento realizado por Burton et al. (1996) reforça os resultados apresentados no teste de hipersensibilidade cutânea realizado no presente trabalho. Naquele estudo, as células mononucleares provenientes de vacas leiteiras suplementadas com 0,5 mg de Cr/dia produziram baixas concentrações de IL-2, IFN- γ e TNF- α após estimulação com Con A. O TNF e o IFN- γ são os principais responsáveis pelo extravasamento de macromoléculas plasmáticas causadoras da induração e crescimento da dobra da pele nas reações de hipersensibilidade cutânea retardada e estão diretamente envolvidos na resposta imunitária celular desencadeada por linfócitos T_{H1} (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Deste modo, ambos os experimentos revelam um provável efeito imunossupressor do Cr em relação à ativação ou diferenciação de linfócitos T, em especial, de linfócitos T_{H1}.

Contudo, o mecanismo de ação do cromo sobre o sistema imunitário permanece desconhecido, mas diversos estudos investigaram os efeitos do Cr dietético sobre a imunidade celular. Muitos desses estudos utilizaram ensaios *in vitro* de proliferação de linfócitos em resposta a mitógenos (CHANG & MOWAT, 1992; BURTON et al., 1993; BURTON et al., 1996; ARTHINGTON et al., 1997; GENTRY et al., 1999) enquanto outros empregaram o teste de hipersensibilidade cutânea retardada como ferramentas para quantificar a resposta imunitária celular (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; KEGLEY & SPEARS, 1995; KEGLEY et al., 1997). Os dois testes possuem inúmeras vantagens e apresentam algumas desvantagens, porém a técnica *in vivo* tende a ser mais fidedigna uma vez que sofre influência dos diversos fatores naturais envolvidos na interação antígeno/animal. Exemplos desses fatores são a interferência da temperatura ambiente, o estresse em virtude do manejo diário e o desafio constante de outros antígenos que competem com o teste pelos recursos do sistema imunitário. Em oposição, o teste *in vitro* oferece um ambiente artificial: temperatura e disponibilidade de nutrientes

são controlados pelo meio de cultura. Em adição, a proliferação *in vitro* sofre interferência da ausência dos fatores humorais necessários para uma resposta imune efetiva, uma vez que o procedimento é extracorpóreo. Contudo, o conhecimento gerado por ambas as técnicas devem ser levados em consideração pois de uma forma ou de outra refletem, pelo menos em parte, a capacidade imunitária do indivíduo.

Utilizando o método *in vitro*, Gentry et al. (1999) relataram que, quando incubados em meio contendo PHA (4 µg/mL), os leucócitos mononucleares periféricos provenientes de ovinos suplementados (0,4 mg de Cr/kg de dieta associado a alta proteína dietética) mostraram índices de proliferação aumentados em contraste à células colhidas de animais suplementados com Cr na mesma dose mas que eram tratados com níveis protéicos baixos na dieta, indicando uma interação entre o Cr e a proteína dietética.

Arthington et al. (1997) utilizaram ensaios de proliferação de linfócitos e testes com *Staphylococcus aureus* previamente opsonizados para avaliar os efeitos do cromo suplementar (3 mg de Cr/dia sob a forma de levedura) sobre a capacidade de multiplicação de linfócitos e sobre a capacidade fagocítica de neutrófilos. Contudo, ambos os parâmetros não foram afetados pela suplementação com o elemento-traço.

Moonsie-Shageer & Mowat (1993) empregaram o dinitroclorobenzeno (DNCB) para induzir uma resposta cutânea semelhante à resposta de hipersensibilidade retardada. Porém, a suplementação com 0,2; 0,5 ou 1 mg de Cr/kg de dieta não influenciou as reações da pele.

Em oposição ao presente trabalho, a suplementação de 0,4 mg de Cr/kg da dieta sob a forma de levedura demonstrou afetar positivamente a resposta à sensibilização intradérmica de PHA em bovinos 52 dias após o início da suplementação (KEGLEY & SPEARS, 1995). Entretanto, nos animais que receberam a mesma dose de Cr, mas sob as formas de CrCl₃ ou cromo ácido nicotínico, a resposta cutânea à fitohemaglutinina não foi influenciada (KEGLEY & SPEARS, 1995).

4. CONCLUSÃO

A suplementação dietética de picolinato de cromo (CrPic) não apresentou efeito sobre o desempenho e a resposta imunitária humoral de ovinos. Por outro lado, a resposta imunitária celular e a população de protozoários ruminais foram prejudicados pela suplementação do mineral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H. Ativação de Linfócitos T. In: _____. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier. p.169-195, 2005.
- ABOUL-ENEIN, H. Y.; KOLL, M.; HOENEN, H. A Validated Method for Analysis of Chromium Picolinate in Nutraceuticals by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. **Biomedical Chromatography**. v. 19, p. 119-122, 2005.
- ABRAHAM, A. S.; SONNENBLICK, M.; EINI, M. The Action of Chromium on Serum Lipids and on Atherosclerosis in Cholesterol-fed Rabbits. **Atherosclerosis**. v. 42, p. 185-195, 1982a.
- ABRAHAM, A. S.; SONNENBLICK, M.; EINI, M. The Effect of Chromium on Cholesterol-induced Atherosclerosis in Rabbits. **Atherosclerosis**. v.41, p. 371-379, 1982b.
- AMOIKON, E. K.; FERNANDEZ, J. M.; SOUTHERN, L. L.; THOMPSON, D. L.; WARD, T. L.; OLCOTT, B. M.. Effect of Chromium Tripicolinate on Growth, Glucose Tolerance, Insulin Sensitivity, Plasma Metabolites, and Growth Hormone in Pigs. **J. Anim. Sci.** , v. 73, p. 1123-1130, 1995.
- ANDERSON, R. A. & BRANTNER, J. H. Binding of chromium by porcine insulin. **Fed. Proc.** v. 36, p. 1123, 1977.
- ANDERSON, R. A. Chromium, glucose tolerance, and lipid metabolism. **J. Adv. Med.** v. 8, p. 37, 1995.
- ANDERSON, R. A. Chromium. In: MERTZ, E. **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**. 1st edition. New York: Academic Press, p.225-244, 1987.
- ANDERSON, R. A. Chromium. In: SMITH, K. T. **Trace Minerals in Food**. New York: Marcel Dekker, 1988.
- ANDERSON, R. A. POLANSKY, M. M.; BRYDEN, N. A. Chromium-histidine Complexes as Nutrient Supplements. United States Patent 6689383. **Chem. Abstr.** v. 134, 2001.
- ANDERSON, R. A. Stress Effects on Chromium Nutrition of Humans and Farm Animals. In: LYONS, P. & JACQUES, K. A. **Proceedings of Alltech's 10th Annual Symposium, Biotechnology in the Feed Industry**. Nottingham: University Press, pp.267-274, 1994.
- ANDERSON, R. A.; BRYDEN, N. A.; POLANSKY, M. M.; GAUTSCHI, K. Dietary Chromium Effects on Tissue Chromium Concentrations and Chromium Absorption in Rats. **J. Trace Elem. Exp. Med.** v. 9, p. 11-17, 1996b.

- ANDERSON, R. A.; CHENG, N.; BRYDEN, N. Beneficial effects of chromium for people with type II diabetes. **Diabetes**. v.45, p. 124A, 1996a.
- [ANUALPEC]-Anuário da Pecuária Brasileira. 1ª ed. São Paulo. INSTITUTO FNP 332p, 2007.
- [ANVISA]-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 269, de 22 de Setembro de 2005.
- ARAÚJO J. S.; OLIVEIRA, V.; FIALHO, E. T.; LIMA, J. A. F. Efeito do Picolinato de Cromo na Digestibilidade dos Nutrientes e Metabólitos Sangüíneos de Suínos. **Arch. Zootec.** v.56, p. 137-143, 2007.
- ARCHER, F. C. & HODGSON, J. H. Total and extractable trace element content of soils in England and Wales. **Journal of Soil Science**. v. 38, p. 421-431, 1987.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do Rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: Funep, p. 111-140, 2006.
- ARFSTEN, D. P. Chromium, 1998. In: J. T. ZELIKOFF, **Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals**. London: Taylor & Francis, p. 63-92, 1998.
- ARTHINGTON, J. D.; CORAH, L. R.; MINTON, J. E. Supplemental Dietary Chromium Does not Influence ACTH, Cortisol, or Immune Responses in Young Calves Inoculated with Bovine Herpesvirus-1. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 217-223, 1997.
- ASIMOV, I. **Gênios da Humanidade**. Rio de Janeiro: Bloch Editores, v.1, p.213, 1980.
- [ATSDR]-AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological Profile for Chromium**. Syracuse: U. S. Department of Health & Human Services, 2000.
- BAGCHI, D.; STOHS, S. J.; DOWNS, B. W.; BAGCHI, M.; PREUSS, H. G.. Cytotoxicity and Oxidative Mechanisms of Different Forms of Chromium. **Toxicology**, v. 180, p. 5-22, 2002.
- BECKER, E. R. & EVEREST, R. C. Comparative growth of normal and infusoria-free lambs. **Am. J. Hyg.** v. 11, p. 362 – 370, 1930.
- BESONG, S.; JACKSON, J.; TRAMMEL, S.; AMARAL-PHILLIPS, D. (Effect of Supplemental Chromium Picolinate on Liver Triglycerides, Blood Metabolites, Milk Yield and Milk Composition in Early Lactation Cows. **J. Dairy Sci.**, Suppl. 79, n. 1, 1996.
- BLASIAK, J.; TRZECIAK, A.; DRZEWOSKI, J.; WOJEWÓDZKA, M. DNA Damage and Repair in Human Lymphocytes and Gastric Mucosa Cells Exposed to Chromium and Curcumin. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, p. 19-31, 1999.

- BOREL, J. S. & ANDERSON, R. A. Chromium In: FRIEDEN, E. **Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements**. New York: Plenum Press, p. 175-199, 1984.
- BUNTING, L. D.; FERNANDEZ, J. M.; THOMPSON, D. L.; SOUTHERN, L. L. Influence of Chromium Picolinate on glucose Usage and Metabolic Criteria in Growing Holstein calves. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 1591-1599, 1994.
- BURTON, J. L.; MALLARD, B. A.; MOWAT, D. N. Effects of Supplemental Chromium on Immune Responses of Periparturient and Early Lactation Dairy Cows. **J. Anim. Sci.** v. 71, p. 1532-1539, 1993.
- BURTON, J. L.; MALLARD, B. A.; MOWAT, D. N. Effects of Supplemental Chromium on Antibody Responses of Newly Weaned Feedlot Calves to Immunization with Infectious Bovine Rhinotracheitis and Parainfluenza 3 virus. **Can. J. Vet. Res.** v. 58, p. 148-151, 1994.
- BURTON, J. L.; MALLARD, B. A.; NONNECKE, B. J.; DUBESKI, P. L.; ELSASSER, T. H. Effects of Supplemental Chromium on Production of Cytokines by Mitogen-Stimulated Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells. **J. Dairy Sci.** v. 79, p. 2237-2246, 1996.
- BURTON, J. L.; NONNECKE, B. J.; ELSASSER, T. H. Immunomodulatory activity of blood serum from chromium-supplemented periparturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 49, p. 29-38, 1995.
- CHANDHARY, L. C.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, K. K. Rumen Fermentation Pattern and Digestion of Structural Carbohydrates in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Calves as Affected by Ciliate Protozoa. **Animal Feed Science and Technology**. v. 56, p. 111-117, 1995.
- CHANG, X. & MOWAT, D. N. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. **Journal of Animal Science**. v. 70, 559-565, 1992.
- CHANG, X.; MALLARD, B. A.; MOWAT, D. N. Effects of chromium on health status, blood neutrophil phagocytosis and in vitro lymphocyte blastogenesis of dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 52, p. 37-52, 1996.
- CHANG, X.; MALLARD, B. A.; MOWAT, D. N. Proliferation of Peripheral blood lymphocytes of Feeder calves in Response to Chromium. **Nutrition Research**. v. 14, p. 851-864, 1994.
- CHANG, X.; MOWAT, D. N.; MALLARD, B. A. Supplemental chromium and niacin for stressed feeder calves. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 75, p. 351-358, 1995.
- CHANG, X.; MOWAT, D. N.; SPIERS, G. A. Carcass Characteristics and Tissue-Mineral Contents of Steers Fed Supplemental Chromium. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 663-669, 1992.

- CHEN, N. S. C.; TSAI, A.; DYER, I. A. Effect of chelating agents on chromium absorption in rats. **J. Nutr.** v. 103, p. 1182-1186, 1973.
- CIESLAK-GOLONKA, M. Toxic and Mutagenic Effect of Chromium(VI) - A **Review Polyhedron**, v. 21, p. 3667-3689, 1995.
- CLAEYS, M. C.; SPEARS, J. W.; KEGLEY, E. B. Performance, Blood Metabolites and Carcass Characteristics of Steers Fed Supplemental Organic or Inorganic Chromium. **J. Anim. Sci** , Suppl.1, v. 72, p. 132, 1994.
- CONNETT, P. H. & WETTERHAHN, K. E. Metabolism of the Carcinogen Chromate by Cellular Constituents. **Struct. Bonding (Berlin)**. v.54, p. 93-124, 1983.
- DAVIS, C. M. & VINCENT, J. B. Isolation and Characterization of a Biologically Active Chromium Oligopeptide from Bovine Liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.339, p. 335-343, 1997.
- DEHORITY, B. A. Distribution, Specificity and Role of the Rumen Protozoa. In: _____ **Rumen Microbiology**. Nottingham: University Press, p. 129-155, 2004.
- DEHORITY, B. A. **Laboratory Manual for Classification and Morphology of Rumen Ciliate Protozoa**. Boca Raton, Fla: CRC Press, p. 325, 1993.
- DEPEW, C. L.; BUNTING, L. D.; FERNANDEZ, J. M. Blood Metabolite Responses in Preweaned Holstein Calves Given Chromium Picolinate. **Journal of Animal Science** v.73 (Suppl. 1), p. 276, 1995.
- DEPEW, C. L.; BUNTING, L. D.; FERNANDEZ, J. M.; ADKINSON, R. W. Performance and Metabolic Responses Of Young Dairy Calves Fed Diets Supplemented with Chromium Tripicolinate. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2916-2923, 1998.
- DiSILVESTRO, R. A. & DY, E. Comparison of Acute Absorption of Commercially Available Chromium Supplements, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. *Article in press*, 2008.
- DOISY, R. J.; STREENTEN, D. H. P.; FREIBERG, J. M. Chromium metabolism in man and biological effects. In: PRASAD, A. S. **Trace Elements in Human Health and Disease**, vol. II, New York: Plenum Medical Book Company, 1976.
- DOWNES, A. M. & McDONALD, I. W. The chromium-Si complex of ethylene diaminetetracetic acid as soluble rumen marker. **British Journal of Nutrition**. v. 18, p. 153-163, 1964.
- ENGEL, A.; BERGER, C. E.; KRÖNER, A.; KLUGER, R.; BARON, R.; STEFFAN, I. Effects of Marathon Running on the Trace Minerals Chromium, Cobalt, Nickel, and Molybdenum. **J. Trace. Elem. Exp. Med.** v. 15, p. 201-209, 2002.

- ENSMINGER, M. E.; OLDFIELD, J. E.; HEINEMANN, W. W. **Nutrients/Metabolism**. In: _____ Feeds & Nutrition. 2 ed. California: Ensminger Publishing Company, p. 67-172, 1990.
- EVANS, G. W. & BOWMAN, T. D. Chromium picolinate increases membrane fluidity and rate of insulin internalization. **J. Inorg. Biochem.** v. 46, p. 243-250, 1992.
- EVOCK-CLOVER, C. M.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A.; STEELE, N. C. Dietary Chromium Supplementation With or Without Somatotropin Treatment Alters Serum Hormones and Metabolites in Growing Pigs Without Affecting Growth Performance. **J. Nutr.** v. 123, p. 1504-1512, 1993.
- GARDNER, G. E.; PETHICK, D. W.; SMITH, C. Effect of chromium chelative supplementation on the metabolism of glycogen and lipid in adult Merino sheep. **Australian Journal of Agricultural Research.** v. 49, p. 137-145, 1998.
- GENTRY, L. R.; FERNANDEZ, J. M.; WARD, T.; WHITE, T. W.; SOUTHERN, L. L.; BIDNER, T. D.; et al. Dietary Protein and Chromium Tripicolinate in Suffolk Wether Lambs: Effects on Production Characteristics, Metabolic and Hormonal Responses, and Immune Status. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p. 1284-1294, 1999.
- HEALY, W. B. **Trace Elem. Metab. Anim. Proc. Int. Symp.** 2nd edition, p. 448, 1974.
- HEITZMANN, J. F. **Alterações na Composição do Solo nas Proximidades de Depósitos de Resíduos Domésticos na Bacia do Rio Piracicaba, São Paulo, Brasil.** São Paulo: Associação Brasileira de Geologia e Engenharia Ambiental, Síntese de Tese n. 9, 1999.
- HEPBURN, D. D. & VINCENT, J. B. Tissue and Subcellular Distribution of Chromium Picolinate with Time After Entering the Bloodstream. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v.94, p. 86, 2003.
- HODGSON, E.; COPE, W. G.; LEIDY, R. B. Classes of Toxicants: Use Classes. In: HODGSON, E. **A Textbook of Modern Toxicology.** 3rd edition. New Jersey: Wiley-Interscience, p.49-74, 2004.
- JACQUAMET, L.; SUN, Y.; HATFIELD, J.; GU, W.; CRAMER, S. P.; CROWDER, M. W.; LORIGAN, G. A.; VINCENT, J. B.; LATOUR, J. M. Characterization of Chromodulin by X-ray absorption and electron paramagnetic resonance spectroscopies and magnetic susceptibility measurements. **J. Am. Chem. Soc.** v.125, p. 774-780, 2003.
- JEEJEEBHOY, K. N. Chromium and Parenteral Nutrition. **J. Trace Elem. Exp. Med.** v. 12, p. 85-89, 1999.
- JEEJEEBHOY, K. N.; CHU, R. C.; MARLISS, E. B.; GREENBERG, G. R. BRUCE-ROBERTSON. Chromium Deficiency, Glucose Intolerance, and Neuropathy Reversed by Chromium Supplementation, in a Patient Receiving Long-term total Parenteral Nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.** v.30, p. 531-538, 1977.

- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. Trace Elements in Plants In: _____ **Trace Elements in Soils and Plants**. 2nd edition. Florida: CRC Press, 1992.
- KEGLEY, E. B. & SPEARS, J. W. Immune response, glucose metabolism, and performance of stressed feeder calves fed inorganic or organic chromium. **Journal of Animal Science**. v. 73, p. 2721-2726, 1995.
- KEGLEY, E. B.; SPEARS, J. W.; BROWN Jr., T. T. Effect of Shipping and Chromium Supplementation on Performance, Immune Response, and Disease Resistance of Steers. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 1956-1964, 1997.
- KEGLEY, E. B.; SPEARS, J. W.; BROWN, T. T. Immune response and disease resistance of calves fed chromium nicotinic acid complex or chromium chloride. **Journal of Dairy Science**. v. 79, p. 1278-1283, 1996.
- KERGER, B. D.; PAUSTENBACH, D. J.; CORBETT, G. E.; FINLEY, B. L. Absorption and Elimination of Trivalent and Hexavalent Chromium in Humans Following Ingestion of a Bolus Dose in Drinking Water. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 141, p. 145-158, 1996.
- KITCHALONG, L.; FERNANDEZ, J. M.; BUNTING, L. D. Influence of Chromium Tripicolinate on Glucose Metabolism and Nutrient Partitioning in Growing Lambs. **J. Anim. Sci.** v. 73, p. 2694-2705, 1995.
- KLAASSEN, C. D. Metais Pesados e Antagonistas dos Metais Pesados. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11^a edição, Rio de Janeiro: McGrawhill, p. 1585-1605, 2006.
- KOMOROWSKI, J. K. & JUTURU, V. Dietary Chromium Picolinate: Efficacy and Safety. **J. Trace Elem. Exp. Med.** v. 17, p. 291-293, 2004.
- KYRIAZAKIS, I. & COOP, R. L. Nutrition-parasite Interaction. **Veterinary Parasitology**. v.84, p. 187-204, 1999.
- LABORDE, C. J.; CHPA, A. M.; BURLEIGH, D. W.; SALGADO, D. J.; FERNANDEZ, J. M. Effects of Processing and Storage on the Measurement of Nitrogenous Compounds in Ovine Blood. **Small Ruminant Res.**, v. 17, p. 159-166, 1995.
- LAY, P. A. & LEVINA, A. Chemical Properties and Toxicity of Chromium(III) Nutritional Supplements. **Chem. Res. Toxicol.** *Article in press*, 2008.
- LEFAVI, R. G.; WILSON, G. D.; KEITH, R. E. Lipid-lowering effect of a dietary chromium (III)-nicotinic acid complex in male athletes. **Nutr. Res.** v.13, p. 239-249, 1993.
- LEVINA, A. & LAY, P. A. Mechanistic Studies of Relevance to the Biological Activities of Chromium. **Coord. Chem. Rev.** v.249, p. 281-198, 2005.

- LIEN, T. F.; WU, B. J.; WANG, M. S.; SHIAO, T. Y.; SHIAO, B. H.; LIN, J. J.; LU, C.; HU, Y. Effect of Supplemental Levels of Chromium Picolinate on the Growth Performance, Serum Traits, Carcass Characteristics and Lipid Metabolism of Growing-finishing Pigs. **Anim. Sci.** v. 73, p. 2203-2042, 2001.
- LINDELL, S. A.; BRANDT Jr., R. T.; MILTON, J. E. Supplemental Cr and revaccination effects on performance and health of newly weaned calves. **Journal of Animal Science.** v. 72, Suppl. 1-133, 1994.
- MACKIE, R. Gut Environment and Evolution of Mutualistic Fermentative Digestion. In: MACKIE, R. & WHITE, B. A. **Gastrointestinal Microbiology.** New York: International Thompson Publishing, v. 1 p. 13-18, 1997.
- MALLARD, B. A.; BORGS, P.; IRELAND, M. J.; McBRIDE, B. W.; BROWN, B. D.; IRWIN, J. Immunomodulatory Effects of Chromium(III) in Ruminants: A Review of Potential Health Benefits and Effects on Production and Milk Quality. **The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine,** v.12, p. 131-140, 1999.
- MATHINSON, G. M. & ENGSTROM, D. F. Chromium and protein supplements for growing-finishing beef steers fed barley-based diets. **Canadian Journal of Animal Science.** v. 75, p. 549-558, 1995.
- McCARTY, M. F. Homologous Physiological Effects of Phenformin and Chromium Picolinate. **Medical Hypotheses.** v. 41, p. 316-124, 1993.
- McCARTY, M. F. Longevity Effect of Chromium picolinate-“rejuvenation” of hypothalamic function? **Medical Hypotheses.** v. 43, p. 253-265, 1994.
- McCLARY, D.; SARTIN, J. L.; KEMPPAINEN, R. J.; WILLIAMS, J. Insulin and Growth Hormone Responses to Glucose Infusion in Mature and First-lactation Dairy Cows. **Am. J. Vet. Res.,** v. 49, p. 1702-1704, 1988.
- McDOWELL, L. R. **Minerais para Ruminantes sob Pastejo em Regiões Tropicais, Enfatizando o Brasil.** 3ª edição, Flórida: IMC, p.1-92, 1999.
- McDOWELL, L. R.; CONRAD, J. H.; THOMAS, J. E.; FICK, K. R. **Trop. Agric. (Trinidad),** v. 2, p. 273, 1978.
- McNAUGHT, M. L.; OWEN, E. C.; KATHLEEN, M. H.; KON, S. K. The Utilization of Non-protein Nitrogen in the Bovine Rumen 8. The Nutritive Value of the Proteins of Preparations of Dried Rumen Bacteria, Rumen Protozoa and Brewe’s Yeast for Rats. **Biochemical Journal.** v. 56, p. 151-156, 1954.
- MERRILL, J. C.; MORTON, J. J. P.; SOILEAU, S. D. Metals. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of Toxicology.** 4th edition. Boston: Taylor & Francis, p. 649-698, 2001.
- MERTZ, W. Essencial trace metals: New definitions based on new paradigms. **Nutr. Rev.** v. 51, p. 287-295, 1993.

- MINTON, J. E.; REDDY, P. G.; BLECHA, F. Removal of nocturnal secretion of melatonin fails to reduce antibody synthesis and interleukin-2 production of lambs. **J. Anim. Sci.** v. 69, p. 565-570, 1991.
- MIRASOL, F. Chromium Picolinate Market Sees Rubust Growth abd High Demand. **Chemical Market Reporter.** v. 257, 2000.
- MOONEY, K. W. & CROMWELL, G. L. Efficacy of Chromium Picolinate and Chromium Chloride as Potential Carcass Modifiers in Swine. **J. Anim. Sci.** v. 75, p. 2661-2671, 1997.
- MOONSIE-SHAGEER, S. & MOWAT, D. N. Effect of Level of Supplemental Chromium on Performance, Serum Constituents, and Immune Status of Stressed Feeder calves. **J. Anim. Sci.** v. 71, p. 232-238, 1993.
- MOSTAFA-TEHRANI, A.; GHORBANI, G.; ZARE-SHAHNEH, A.; MIRHADI, S. A. Non-carcass Components and Wholesale Cuts of Iranian Fat-tailed Lambs Fed Chromium Nicotinate or Chromium Chloride. **Small Ruminant Research.** v. 63, p. 12-19, 2006.
- MOWAT, D. N.; CHANG, X.; YANG, W. Z. Chelated Chromium for Stressed Feeder Calves. **Can. J. Anim. Sci.** v. 73, p. 49-55, 1993.
- [NRC]-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Mineral tolerance of animals**, 2nd ed. Washington, DC: The National Academies Press, 2005.
- [NRC]-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**, Washington, DC: The National Academies Press, 2006.
- [NRC]-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The Role of Chromium in Animal Nutrition**. Washington D. C.: National Academy of Sciences, National Academy Press, 1997.
- OKADA, S.; SUSUKI, M.; OHBA, H. J. Enhancement of ribonucleic acid synthesis by chromium (III) in mouse liver. **J. Inorg. Biochem.** v. 19, p. 95-103, 1983.
- OKADA, S.; TANIYAMA, M.; OHBA, H. J. Mode of enhancement in ribonucleic acid synthesis directed by chromium (III)-bound deoxyribonucleic acid. **J. Inorg. Biochem.** v. 17, p. 41-49, 1982.
- OLSEN, Q. R.; RULE, D. C.; FIELD, R. A. Dietary chromium picolinate does not influence growth or carcass composition in feedlot lambs. **Sheep and Goat Research Journal.** v. 12, p. 22-24, 1996.
- OLSON, O. E.; CARY, E. E.; ALLAWAY, W. H. Control of Chromium Concentrations in Food Plants.1. Absorption and Translocation of Chromium by Plants. **J. Agric. Food Chem.** v. 25, p. 300-304, 1977a.

- OLSON, O. E.; CARY, E. E.; ALLAWAY, W. H. Control of Chromium Concentrations in Food Plants.2. Chemistry of Chromium in Soils and Its Availability to Plants. **J. Agric. Food Chem.** v. 25, p. 305-309, 1977b.
- ONDEI, V. Nova Cobertura para um Setor em Ascensão. **Revista DBO.** v. 282, p. 162, 2004.
- PAGE, T. G.; SOUTHERN, L. L.; WARD, T. L.; THOMPSON, D. L. Effect of Chromium Picolinate on Growth and Serum and Carcass Traits of Growing-Finishing Pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 71, p. 656-662, 1993.
- PECHOVA, A. & PAVLATA, L. Chromium as an Essential Nutrient: a Review. **Veterinarni Medicina.** v. 52, p. 1-18, 2007.
- PRASAD, A. S. Chromium. In: _____ **Trace Elements and Iron in Human Metabolism.** New York: Plenum Medical Book Company, 1978.
- PULS, R. **Mineral Levels in Animal Health.** 2nd edition. British Columbia: Sherpa International, 1994.
- RANTHOTRA, G. S. & GELROTH, J. A. Effects of high-chromium baker's yeast on glucose tolerance and blood lipids in rats. **Cereal Chemistry.** v. 63, p. 411-413, 1986.
- RIALES, R. & ALBRINK, M. J. Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high-density lipoprotein of adult men. **Am. J. Clin. Nutr.** v.34, p. 2670-2678, 1981.
- ROGINSKI, E. E. & MERTZ, W. Effects of chromium (III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet. **J. Nutr.** v. 97, p. 525 - - 530, 1969.
- ROSA, I. V. **Dietary Phosphorus and Trace Elements Interrelationships in Ruminants.** Dissertação, Univ. of Florida, Gainesville, 1980.
- SAMSELL, L. J. & SPEARS, J. W. Chromium Supplementation Effects on Blood Constituents in Lambs Fed High or Low Fiber Diets. **Nutr. Res.** v.9, p. 889-899, 1989.
- SANO, H.; KATO, Y.; TAKEBAYASHI, A.; SHIGA, A. Effects of Supplemental Chromium and Isolation Stress on Tissue Responsiveness and Sensitivity to Insulin in Sheep. **Small Ruminant Research.** v. 33, p. 239-246, 1999.
- SAS Institute. **SAS statistical package for Windows v. 8.0.** SAS Institute, Cary, NC, 1999.
- SCHWARZ, K & MERTZ, W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 85, p. 292-295, 1959.

- SELL, J. L. Preface In: NRC. **The role of chromium in animal nutrition**. 1st edition. Whashington, DC: Academic Press, p. v-vi, 1997.
- SILVA, C. S.; PEDROZO, M. F. M. Ecotoxicologia do Cromo e seus Compostos. Salvador: Centro de Recursos Ambientais- CRA. 100f. (Caderno de Referência ambiental, v.5). 2001.
- SILVA, D. J. & QUEIROZ, A. C. Determinação da Cinza ou Matéria Mineral. In: _____ **Análise de Alimentos – Métodos Químicos e Biológicos**. p. 77-86, 2006.
- SIQUEIRA, E. R.; PEIXOTO, A. M.; MOURA, J.C. Pastagens para Ovinos. In: 8^o Simpósio sobre Manejo de Pastagem. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, p. 351-360, 1986.
- SOLAIMAN, S. G.; SHOEMAKER, C. E.; D'ANDREA, G. H. The Effect of High Dietary Cu on Health, Growth Performance, and Cu Status in Young Goats. **Small Ruminant Research**. v. 66, p. 85-91, 2006.
- SOUZA, A. D. Mercado interno e perspectivas para carne ovina. [online], 2006. Disponível em: < <http://www.farmpoint.com.br> >. Acesso em: 18 set.2006.
- SPEARS, J. W. Micronutrients and immune function in cattle. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 59, p. 587-594, 2000.
- STARICH, G. H. & BLINCOE, C. Dietary Chromium – forms and availabilities. **The science of the Total Environment**. v. 28, p. 443-454, 1983.
- STEARNS, D. M. Evaluation of Chromium(III) Genotoxicity with Cell Culture and in Vitro Assays. In: VINCENT, J. B. **The Nutritional Biochemistry of Chromium(III)**. Amsterdam: Elsevier, pp. 209-224, 2007.
- STEARNS, D. M.; SILVEIRA, S. M.; WOLF, K. K.; LUKE, A. M. Chromium(III) tris(picolate) is Mutagenic at the Hypoxanthine (guanine) Phosphoribosyltransferase locus in Chinese Hamster Ovary Cells. **Mut. Res.** v. 513, p. 135-142, 2002.
- STEARNS, D. M.; WISE, J. P., PATIERNO, S. R.; WETTERHAHN, K. E. Chromium(III) Picolate Produces Chromosome Damage in Chinese Hamster Ovary Cells. **FASEB J.** v. 9, p. 1643-1648, 1995.
- STOECKER, B. J. Chromium. In: SHILS, M. E.; SHIKE, M.; ROSS, A. C.; CABALLERO, B.; COUSINS, R. L. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 332-337, 2006.
- STRIFFLER, J. S.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A. Dietary chromium enhances insulin secretion in perfused rat pancreas. **J. Trace Elem. Exp. Med.** v. 6, p. 75-81, 1993.
- SUBIYATNO, A.; MOWAT, D. N.; YANG, W. Z. Metabolite and Hormonal Responses to Glucose or Propionate Infusions in Periparturient Dairy Cows Supplemented With Chromium. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p. 1436-1445, 1996.

- SUBRAMANIAN, S.; RAJENDIRAN, G.; SEKHAR, P.; GOWRI, C.; GOVINDARAJULU, P.; ARULDHAS, M. M. Reproductive Toxicity of Chromium in Adult Bonnet Monkeys (*Macaca radiata* Geoffrey). Reversible Oxidative Stress in the Semen. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.215, p. 237-249, 2006.
- SUMRALL, K. H. & VINCENT, J. B. Is Glucose Tolerance Factor an Artefact Produced by Acid Hydrolysis of Low-molecular-weight Chromium-binding Substance? **Polyhedron**. v.16, p. 4171-4177, 1997.
- SWANSON, K. C.; HARMON, D. L.; JACQUES, K. A.; LARSON, B. T.; RICHARD, C. J.; BOHNERT, D. W.; PATON, S. J. Efficacy of Chromium-yeast Supplementation for Growing Beef Steers. **Animal Feed and Science Technology**. v. 86, p. 95-105, 2000.
- TAKENAKA, A. & ITABASHI, H. Changes in the Population of Some Functional Groups of Rumen Bacteria Including Methanogenic Bacteria By Changing the Rumen Ciliates in Calves. **Journal of General Applied Microbiology**. v. 41, p. 377-387, 1995.
- TEZUKA, M.; MOMIYAMA, K.; EDANO, T. Protective effect of Chromium (III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. **J. Inorg. Biochem.** v.42, p. 1-8, 1991.
- TOEPFER, E. W.; MERTZ, W.; POLANSKY, M. M. Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from brewer's yeast extracts and synthesis. **J. Agric. Food Chem.** v.25, p. 162-166, 1977.
- TOEPFER, E. W.; MERTZ, W.; ROGINSKI, E. E. Chromium in foods in relation to biological activity. **J. Agr. Food. Chem.** v. 21, p. 69-73, 1973.
- UNDERWOOD, E. J. & SUTTLE, N. F. Occasionally Beneficial Elements (Boron, Chromium, Lithium, Molybdenum, Nickel, Silicon, Tin, Vanadium) In: UNDERWOOD, E. J. & SUTTLE, N. F. **The Mineral Nutrition of Livestock**. 3rd edition. New York: CABI Publishing, 1999.
- UNDERWOOD, E. J. Chromium. In: UNDERWOOD, E. J. **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**. 4th edition. New York: Academic Press, 1977.
- URBERG, M. & GEMEL, M. B. Evidence for synergism between chromium and nicotinic acid in the control of glucose tolerance in elderly humans. **Metabolism**. v. 36, p. 896-899, 1987.
- VAN de LIGT, C. P. A.; LINDEMANN, M. D.; CROMWELL, G. L. Assessment of Chromium Tripicolinate Supplementation and Dietary Protein Level on Growth, Carcass, and Blood Criteria in Growing Pigs. **J. Anim. Sci.** v. 80, p. 2412-2419, 2002.
- VERNON, R. G. & SASAKI, Y. Control of Responsiveness of Tissues to Hormones. In: TSUDA, Y ; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. **Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants** p. 1989. San Diego: Academic Press. 1991.

- VIEIRA, D. M. The Role of Ciliate Protozoa in Nutrition of the Ruminant. **J. Anim. Sci.** v. 63, p. 1547-1560, 1986.
- VINCENT, J. B. & BENNET, R. Potential and Purported Roles for Chromium in Insulin Signaling: The Search For the Holy Grail. In: VINCENT, J. B. **The Nutritional Biochemistry of Chromium(III)**. Tuscalosa, EUA: Elsevier, p. 139-146, 2007.
- VINCENT, J. B. & DAVIS, C. M. Use of Triqua- μ^3 -oxohexakis- μ -propionatotrichromium(1+), $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, as a Nutritional Supplement or in Treatment of Medical Conditions. United States Patent 6197816. **Chem. Abstr.** v. 134, 2001.
- VINCENT, J. B. & STALLINGS, D. Introduction: A History of Chromium Studies (1955-1995). In: VINCENT, J. B. **The Nutritional Biochemistry of Chromium(III)**. Amsterdam: Elsevier, pp. 1-42, 2007.
- VINCENT, J. B. Recent Advances in the Biochemistry of Chromium(III). **J. Trace Elem. Exp. Med.** v.16, p.227, 2003a.
- VINCENT, J. B. Recent Advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. **Proceedings of the Nutritional Society**, v. 63, p. 41, 2004.
- VINCENT, J. B. Relationship Between Glucose Tolerance Factor and Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance. **J. Nutr.** v.124, p. 117-118, 1994.
- VINCENT, J. B. The Potential Value and Toxicity of Chromium Picolinate as a Nutritional Supplement, Weight Loss Agent and muscle Development Agent. **Sports Medicine.** v. 33, p. 213-230, 2003b.
- VINCENT, J. B.; DAVIS, C. M.; SUMRALL, K. H. A Biologically Active Form of Chromium May Activate a Membrane Phosphotyrosine Phosphatase (PTP). **Biochemistry.** v. 35, p. 12963-12969, 1996.
- WEBELEMENTS™. (1993-2007). **WebElements™, the periodic table** . Disponível em: < <http://www.webelements.com/>>. Acesso em 14 de Março de 2008.
- [WHO]-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chromium in Drinking-water**. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2003.
- WOLF, B. W.; BERGER, L. L.; FAHEY, G. C.; JOHNSON, A. B. Influence of Roughage Level and Chromium Polynicotinate on Performance, Carcass Characteristics, and Serum Metabolite Levels of Finishing Beef Feedlot Heifers. **J. Anim. Sci.**, Suppl. 1, v. 71, p. 132, 1993.
- WOSKI, S. A.; SPEETJENS, J. K.; VINCENT, J. B. The Nutritional Supplement Chromium (III) Tris(picolinate) Cleaves DNA. **Chem. Res. Toxicol.** v. 12, p. 483-487, 1999.

- WRIGHT, A. J.; MOWAT, D. N.; MALLARD, B. A. Supplemental Chromium and Bovine Respiratory Disease Vaccines for Stressed Feeder Calves. **Can. J. Anim. Sci.** v. 74, p. 287-295, 1994.
- YAMAMOTO, A.; WADA, O., ONO, T. Isolation of a Biologically-active low-molecular-mass Chromium Compound from Rabbit Liver. **Eur. J. Biochem.** v. 165, p. 627-631, 1987.
- YANG, W. Z.; MOWAT, D. N.; SUBIYATNO, A.; LIPTRAP, R. M. Effects of Chromium Supplementation on Early Lactation Performance of Holstein Cows. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 221-230, 1996.
- ZAYED, A.; LYTLE, C. M.; QIAN, J.H.; TERRY, N. Chromium Accumulation, Translocation and Chemical Speciation in Vegetable Crops. **Planta.** v. 206, p. 293-299, 1998.