



**UDESC**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**

**CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO NUTRACÊUTICO DE MINERAIS  
E VITAMINAS SOBRE DESEMPENHO,  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
RESPOSTA IMUNE EM PERÍODO DE  
TRANSIÇÃO DE DIETA  
(DESALEITAMENTO) DE BEZERRAS**

**RAEL BORDIGNON**

CHAPECÓ, 2019.

**RAEL BORDIGNON**

**EFEITO NUTRACÊUTICO DE MINERAIS E VITAMINAS SOBRE  
DESEMPENHO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E RESPOSTA  
IMUNE EM PERÍODO DE TRANSIÇÃO DE DIETA  
(DESALEITAMENTO) DE BEZERRAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

**Orientador: Aleksandro Schafer Da Silva**  
Co-orientadora: Ana Luiza Bachmann Schogor

Chapecó, SC, Brasil

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Bordignon, Rael  
EFEITO NUTRACÊUTICO DE MINERAIS E VITAMINAS  
SOBRE DESEMPENHO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
RESPOSTA IMUNE EM PERÍODO DE TRANSIÇÃO DE DIETA  
(DESALEITAMENTO) DE BEZERRAS / Rael Bordignon. -- 2019.  
71 p.

Orientador: Aleksandro Schafer Da Silva  
Coorientador: Ana Luiza Bachmann Schogor  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2019.

1. Bezerras. 2. Desempenho. 3. Imunidade. 4. Sistema  
antioxidante. I. , Aleksandro Schafer Da Silva . II. Luiza Bachmann  
Schogor, Ana . III. Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina  
UDESC Oeste  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

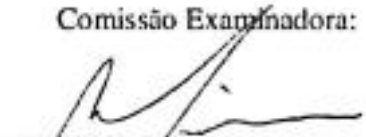
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO NUTRACÊUTICO DE MINERAIS E VITAMINAS SOBRE  
DESEMPENHO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E RESPOSTA IMUNE  
EM PERÍODO DE TRANSIÇÃO DE DIETA (DESALEITAMENTO) DE  
BEZERRAS**

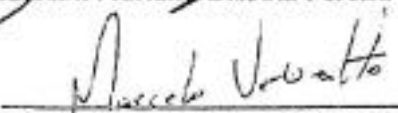
Elaborada por  
**Rael Bordignon**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

Comissão Examinadora:

  
Dr. Aleksandro Schafer da Silva – UDESC/Chapecó (Presidente)

  
Dr. Wanderson Adriano Biscola Pereira (IFC-Concórdia)

  
Dr. Marcelo Vedovatto (University of Florida)

Chapecó, 25 de fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela materialização deste sonho em minha vida.

Agradeço a minha esposa Mailyn por me auxiliar, me apoiar e me suportar.

Agradeço a meus pais Mauri e Meraci por me ensinarem o valor do conhecimento, também a minha irmã Sinara pelo apoio.

Agradeço a UDESC pela oportunidade.

Agradeço a meu orientador Dr. Aleksandro Schafer da Silva pela oportunidade, ensinamentos, conselhos, paciência e sabedoria com que conduziu este processo.

Agradeço ao professor Dr. Leandro Sâmia Lopes pela oportunidade.

Agradeço a Patricia Glombowsky, Andreia Volpato e à Agropecuária Monte Alegre pelo apoio na pesquisa.

Agradeço aos docentes da UDESC, aos colegas e a todos os que de uma ou outra forma contribuíram nesta caminhada.

Agradecimento especial a UNIEDU pela concessão de bolsa.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### **EFEITO NUTRACÊUTICO DE MINERAIS E VITAMINAS SOBRE DESEMPENHO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E RESPOSTA IMUNE EM PERÍODO DE TRANSIÇÃO DE DIETA (DESALEITAMENTO) DE BEZERRAS**

AUTOR: Rael Bordignon

ORIENTADOR: Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, 25 de fevereiro de 2019

A fase inicial da vida dos bezerros é onde ocorrem os maiores índices de mortalidade, devido a maior susceptibilidade dos animais aos agentes infecciosos presentes no ambiente. Isso é consequência do sistema imune imaturo ou em desenvolvimento, e pela alta possibilidade de infecção no ambiente que são criados. O estresse oxidativo geralmente está associado a processos inflamatórios, e quando exacerbado torna os animais mais susceptíveis às doenças, devido aos danos nas células e tecidos. Na fase inicial da vida dos animais, as defesas antioxidantes também são menores, o que aumenta a possibilidade de danos causados por espécies reativas de oxigênio às células. A suplementação de minerais como zinco, cobre, selênio e manganês bem como das vitaminas A e E são importantes para estimular o sistema antioxidante e mediadores imunológicos, no entanto, informações sobre o efeito nutracêutico/metafilático da aplicação injetável desses minerais e vitaminas em bezerras na fase de transição são raras. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a administração injetável de vitaminas e minerais melhora os índices zootécnicos de bezerras leiteiras no período pré e pós-desaleitamento, assim como estimula a resposta imune e antioxidante. O estudo foi desenvolvido em uma fazenda da região Oeste de Santa Catarina com bezerras leiteiras (aproximadamente 45 dias de idade) distribuídas em dois tratamentos de 10 animais cada: grupo controle (CONT) e grupo tratado (TRAT). Esse último recebeu duas injeções subcutâneas na dose 1 mL/50 kg de peso de uma solução contendo vitaminas A e E (Adaptador® Vit) e outra contendo cobre, zinco, selênio e manganês (Adaptador® Min). Os animais TRAT receberam a primeira dose 15 dias antes do desaleitamento e a segunda dose 15 dias após o desaleitamento. Pesagem e coletas de sangue foram feitas nos dias 1 (15 dias pré-desaleitamento), 15 (dia do desaleitamento), 30 e 45 de experimento para análises de parâmetros antioxidantes, bem como de proteinograma sérico. Não houve diferença significativa ( $P=0,08$ ) entre grupos no peso das bezerras, no entanto os animais TRAT tiveram peso numericamente superior aos 45 dias de experimento. Os níveis séricos de espécies reativas oxigênio (EROs) e lipoperoxidação (LPO) foram menores ( $P\leq 0,05$ ) em bezerras TRAT comparadas com às do CONT. As bezerras TRAT apresentaram maior ( $P\leq 0,05$ ) capacidade antioxidante total e concentrações séricas das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) comparado às bezerras CONT. Houve um aumento ( $P\leq 0,05$ ) nos níveis de proteína total em consequência do aumento de globulinas no grupo TRAT. As bezerras do grupo TRAT apresentaram maior ( $P\leq 0,05$ ) concentração séricas de de IgG de cadeia pesada, IgA e ceruplasmina comparado às bezerras do grupo CONT. Portanto concluímos que existe um efeito metafilático da aplicação de minerais e vitaminas para bezerras na fase de lactante

para não lactante, isto é, houve uma estimulação do sistema imune e antioxidante dos bezerros, o que é benéfico à saúde dos mesmos e pode refletir no desempenho futuro.

**Palavras-chave:** Bezerras, desempenho, imunidade, sistema antioxidante.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

# **NUTRACEUTICAL EFFECT OF MINERALS AND VITAMINS IN PERFORMANCE, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN THE PERIOD OF DIETARY TRANSITION (WEANING) OF CALVES**

AUTHOR: Rael Bordignon  
ADVISER: Aleksandro Schafer da Silva  
Chapecó, 25 de fevereiro de 2019

The initial phase of life of calves is where the highest mortality rates occur, due to the greater susceptibility of the animals to the infectious agents present in the environment. This is a consequence of the immature immune system or in development, and by the high possibility of infection in the environment that are created. Oxidative stress is usually associated with inflammatory processes, and when exacerbated it makes the animals more susceptible to diseases due to damage to cells and tissues. In the early stages of animal life, the antioxidant defenses are also smaller, which increases the possibility of damage caused by reactive oxygen species to the cells. Supplementation of minerals such as zinc, copper, selenium and manganese as well as vitamins A and E are important to stimulate the antioxidant system and immunological mediators, however, information on the nutraceutical / metaphylactic effect of the injectable application of these minerals and vitamins in heifers in the phase transition are rare. In this way, the present study aims to evaluate whether the injectable administration of vitamins and minerals improves the zootechnical indexes of dairy heifers in the pre- and post-weaning period, as well as stimulates the immune and antioxidant response. The study was carried out in a farm in the western region of Santa Catarina with dairy heifers (approximately 45 days old) distributed in two treatments of 10 animals each: control group (TRAT) and treated group (TRAT). The latter received two subcutaneous injections at a dose of 1 mL / 50 kg of a solution containing vitamins A and E (Adaptador® Vit) and another containing copper, zinc, selenium and manganese (Adaptador® Min). TRAT animals received the first dose 15 days prior to weaning and the second dose 15 days after the weaning. Weighing and blood samples were taken on days 1 (15 days pre-weaning), 15 (day of weaning), 30 and 45 of the experiment for analyzes of antioxidant parameters, as well as serum proteinogram. There was no significant difference ( $P = 0.08$ ) between groups in heifer weight, however the TRAT animals had numerically greater weight than the 45 days of experiment. Serum levels of reactive oxygen species (ROS) and lipoperoxidation (LPO) were lower ( $P \leq 0.05$ ) in TRAT heifers compared to those in CONT. TRAT heifers presented higher ( $P \leq 0.05$ ) total antioxidant capacity and serum concentrations of the enzymes glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) compared to CONT calves. There was an increase ( $P \leq 0.05$ ) in total protein levels as a consequence of the increase of globulins in the TRAT group. TRAT heifers presented higher ( $P \leq 0.05$ ) serum concentrations of heavy chain IgG, IgA and ceruplasmin compared to CONT calves. Therefore, we conclude that there is a metaphylactic effect of the application of minerals and vitamins to calves in the lactating to no lactating phase, that is, there was a stimulation of the immune and antioxidant system of the calves, which is beneficial to

their health and may reflect on the performance future.

**Keywords:** Calves, performance, immunity, antioxidant system.

## SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I.....	11
1.1 PANORAMA DA BOVINOCULTURA DE LEITE.....	11
1.2 FASE INICIAL DE CRIAÇÃO DE BEZERRAS LEITEIRAS.....	13
1.2.1 DESAFIOS NO PERÍODO DO DESALEITAMENTO .....	14
1.3 GANHO DE PESO .....	15
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO .....	17
1.5 SISTEMA IMUNE .....	20
1.6 MICROMINERAIS E VITAMINAS .....	22
1.6.1 MICROMINERAIS E VITAMINAS INJETÁVEIS .....	24
1.6.2 COBRE .....	24
1.6.3 MANGANÊS .....	25
1.6.4 SELÊNIO .....	26
1.6.5 ZINCO .....	27
1.6.7 VITAMINA A .....	28
1.6.8 VITAMINA E.....	28
1.7. OBJETIVOS .....	30
1.7.1 OBJETIVO GERAL.....	30
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
2. CAPÍTULO II.....	31
2.1 MANUSCRITO I.....	32
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS .....	71

# 1. CAPÍTULO I

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 PANORAMA DA BOVINOCULTURA DE LEITE

De acordo com projeções da ONU (2017) a população mundial em 2030 chegará a 8,6 bilhões de habitantes. Esta projeção estendida para o ano de 2050 atinge o número de 9,8 bilhões de pessoas. O consumo de alimentos de alta qualidade como os derivados lácteos, tem se tornado cada vez mais comum em todo o mundo. Atualmente o consumo é de 45 kg/pessoa/ano, podendo chegar a 66 kg em 2030. O leite é considerado o principal alimento a suprir as nossas necessidades de cálcio, fornece proteínas de alto valor biológico além de lipídeos, dentre eles o ácido linoleico conjugado (CLA), que é importante para a promoção da saúde humana (FAO, 2013).

O desenvolvimento populacional e econômico tem gerado expectativas quanto ao desenvolvimento do setor lácteo, a fim de atender as demandas globais. Em 2017, as exportações de leite do Brasil somaram mais de 112 milhões de dólares, porém a balança comercial do setor lácteo foi negativa em mais de US\$ 449 (EMBRAPA, 2018), sendo necessário o desenvolvimento do mercado externo para o leite produzido no Brasil, evitando desta maneira a queda de preços no mercado interno (VILELA et al., 2016).

A bovinocultura de leite é uma atividade difundida em todo o Brasil, a produção aumentou significativamente no país, sendo que de 2002 a 2014, houve um incremento de 62,5% (VILELA et al., 2016). Em 2016 o rebanho nacional foi composto por mais de 19 milhões de vacas ordenhadas, responsáveis pela produção de 33,6 milhões de toneladas de leite, isto é, a quarta maior do mundo, onde os EUA é o primeiro do ranking com mais de 96 milhões de toneladas produzidas. A média de produção de leite por vaca por ano foi de 1709 litros no Brasil em 2016, Santa Catarina apresentou uma média de 2788 litros por vaca por ano (EMBRAPA, 2018). Além do volume, a produtividade também tem aumentado em âmbito nacional, conforme demonstrado na Figura 1, porém os índices são muito menores se comparados com outros países, como por exemplo, os EUA onde a produtividade média por ano foi de 10330 litros por vaca em 2016 (EMBRAPA, 2018), demonstrando que precisamos melhorar nos índices produtivos.

A região sul do Brasil é a maior em termos de volume de leite produzido, com mais de 12 bilhões de litros produzidos em 2016, sendo o estado de Santa Catarina importante para a obtenção deste resultado (EMBRAPA, 2018). Santa Catarina é um dos principais estados brasileiros de produção agropecuária, mesmo com 1,2% do território nacional. Dados da Epagri, (2017) apontam que da produção agrícola e pecuária, a pecuária representa mais de 60% do total produzido no estado.

Dentro da bovinocultura de leite, o estado Catarinense também é destaque no âmbito nacional ocupando em 2016 o quarto lugar no ranking dos maiores estados produtores de leite, sendo que foram industrializados 2,44 bilhões de litros nesse ano, o que representa um aumento de 3,8% no volume industrializado frente ao ano de 2015 (IBGE, 2016). A região Oeste com 75,1% do total de leite produzido em Santa Catarina em 2015, apresenta-se em destaque, sedimentando o caráter mercadológico desta bacia leiteira (EPAGRI, 2017). No entanto, a atividade leiteira, com a já destacada importância no cenário social e econômico do país, precisa desenvolver-se no âmbito qualitativo. Este desenvolvimento abrange além de políticas públicas, a profissionalização da produção através de novas tecnologias que resultem em melhores índices produtivos (VILELA et al., 2016).

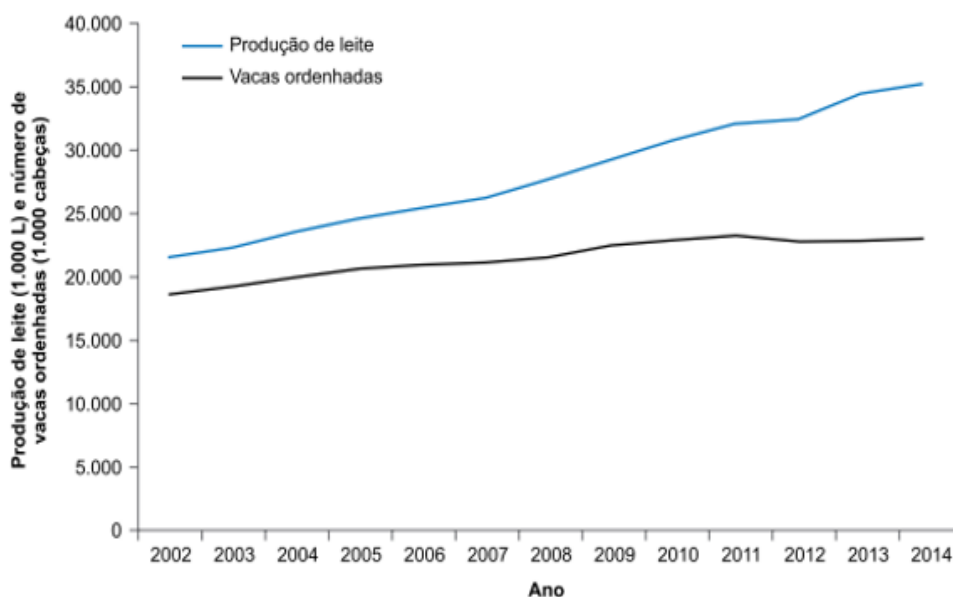


Figura 1: Produção de leite e vacas ordenhadas no Brasil – 2002 a 2014 (VILELA et al., 2014).

## 1.2 FASE INICIAL DE CRIAÇÃO DE BEZERRAS LEITEIRAS

A bovinocultura de leite tem passado por evoluções no Brasil, com melhores práticas de nutrição, reprodução, manejo, melhoramento genético e instalações, gerando melhores índices produtivos. Porém, especificamente na criação de bezerros leiteiros, estes avanços são menores e são observadas altas taxas de morbidade e mortalidade (COELHO, 2009). Algumas fazendas leiteiras veem o setor de cria como uma necessidade de segundo plano, vendo esta categoria como animais de baixo valor e que não geram lucro imediato para a propriedade (BOND et al., 2012). Em consequência desta visão, pesquisadores destacam alguns erros no manejo nutricional e ambientes de criação impróprios, interferindo diretamente nos animais. No entanto, uma propriedade leiteira interessada em chegar a animais de alta performance, econômica e produtiva, necessita dar atenção primeiramente ao setor de criação dos animais jovens (SOUZA, 2011). Esta categoria deve ser vista como uma das principais atividades da propriedade leiteira, em virtude destes animais serem os responsáveis pela reposição de vacas descartes e terem melhor genética e capacidade produtiva a oferecer (SANTOS; DAMASCENO, 1999).

A fase inicial da criação de bezerros leiteiros, compreende um período de especial atenção, visto que a maior taxa de mortalidade ocorre nesse momento. Isso acontece porque estes estão altamente susceptíveis aos agentes patogênicos, em consequência de não apresentarem imunidade completa e madura, pois ainda dependem da transferência passiva de imunoglobulinas através do colostro, que fornecem os anticorpos que atuarão na resposta às infecções nos seus primeiros meses de vida (BESSER; GAY, 1994).

Desde a década de 90, é aceito como normal, um índice de mortalidade de 5% até os primeiros 90 dias de vida (Roy 1990). No Brasil não existem muitos estudos que levantem estes números, nem que estabeleçam as principais causas de mortalidade (MACHADO et al., 2004), porém Souza (2011) cita que a mortalidade de bezerros em nosso país pode chegar a 34% em algumas fazendas. Alguns aspectos contribuem para esses resultados, tanto de alta taxa de mortalidade quanto de prevalência de doenças, entre eles às condições de higiene e a taxa de lotação do bezerreiro são tidos como determinantes (SOUZA, 2011) além do alto índice de diarreia na fase do aleitamento (NAHMS, 2007).

Por outro lado, a adoção de adequadas práticas de manejo, higiene e alimentação resultam em melhores índices produtivos e melhores resultados zootécnicos inclusive nas fases subsequentes (SOUZA, 2011). Apesar da nutrição e mão-de-obra representarem os principais custos de produção, a correta utilização destas é essencial para a saúde dos animais e para a rentabilidade do sistema (DRACKLEY, 2008). Para manter a sustentabilidade de sistemas produtivos de leite, a produção de bezerras saudáveis, é um aspecto importante, para tal, reduzir a mortalidade é fundamental (VINHOLIS et al., 2006), sendo a taxa zero de mortalidade considerada ideal sob os pontos de vista produtivo, econômico e ético (PARANHOS; CROMBERG, 1998).

O bem-estar animal deve ser uma preocupação na fase inicial da vida dos bezerros, pois nesse período, os animais são dependentes dos manejos e condições oferecidas pelos seres humanos. A falta de cuidado e falhas de manejo são comuns e comprometem o bem-estar destes animais. Estes fatores quando ignorados contribuem com as maiores taxas de morbidade e mortalidade (SILVA, 2015), a compreensão destes índices, são uma parte essencial para melhorar a saúde e o desempenho dos bezerros. Além disso, a falta de cuidado e falhas de manejo podem prejudicar o sistema imunológico dos animais e conseqüentemente aumentar a incidência de doenças e reduzir o crescimento (WINDEYER et al., 2014). Outro fator que pode afetar a saúde e desempenho dos bezerros são as instalações. Essas devem proporcionar um ambiente arejado e seco, pois são estas as características desejáveis para redução de pneumonias e de diarreias, comumente observadas em animais abrigados em ambientes mal ventilados e úmidos (VINHOLIS et al., 2006). Desta forma, cuidados de manejo nas atividades desenvolvidas durante a criação de bezerros leiteiros são de suma importância visto que o manejo inadequado reflete negativamente sobre a saúde, desenvolvimento e bem-estar dos animais (SILVA, 2015).

### 1.2.1 DESAFIOS NO PERÍODO DO DESALEITAMENTO

Em bovinos, a transição de não ruminante para ruminante ocorrem em três fases, sendo a primeira fase até a terceira semana de vida, onde a dieta é majoritariamente líquida para obtenção dos nutrientes. Quando o bezerro começa a ingerir quantidades significativas de concentrado passa-se para a segunda fase, ou fase de transição que vai até o desaleitamento (normalmente com 2 meses de idade). A retirada do leite da dieta

dos bezerros marca o início da terceira fase, que perdurará por toda a vida do animal, sendo a fermentação de carboidratos a principal fonte de energia e a biomassa microbiana a principal fonte de aminoácidos (DRACKLEY, 2008).

Um dos principais desafios a serem superados pelos bezerros é o momento do desaleitamento, esta prática ocorre precocemente e é comum nos sistemas de produção de leite. O desmame precoce é feito com o principal objetivo de reduzir os custos de criação, em função do menor custo dos alimentos que substituem o leite ou o sucedâneo lácteo, como por exemplo concentrado e feno, além disso, os gastos com mão-de-obra também são reduzidos (COELHO, 2009).

Na fase de desaleitamento ocorrem mudanças anatômicas, fisiológicas e metabólicas no animal, onde ele passa de pré-ruminante para ruminante e sua dieta passa gradativamente de líquida para uma dieta exclusivamente sólida (SANTOS et al., 2002). Também vale ressaltar que o desaleitamento reduz a ingestão de matéria seca da dieta (COELHO, 2009), o que pode comprometer o desenvolvimento desses animais. Este processo gera inevitavelmente estresse, não apenas pela mudança da dieta (ENCARNAÇÃO, 1986), mas também pela provável troca do ambiente de criação. Esse estresse pode ainda ser intensificado se estes forem descornados nessa fase, ou alocados em um ambiente inadequado, ou junto com um novo lote de animais, onde podem ocorrer interações sociais agonísticas (GREGORY; GRANDIN, 1998). O desaleitamento é um momento do ciclo de criação com maior necessidade de controle do estresse oxidativo e de aumento do status imunológico (VEDOVATTO; FRANCO, 2018), e todos os fatores supracitados pode reduzir o ganho de peso dos bezerros (ENCARNAÇÃO, 1986).

### **1.3 GANHO DE PESO**

Baixo ganho de peso na fase inicial da vida das bezerras, pode acarretar em maior idade para o primeiro parto. Este índice é de grande importância, visto que, idade elevada ao primeiro parto acarreta em maior tempo de vida improdutiva do animal, aumentando os custos de produção, e sendo necessário maior número de animais de reposição (SANTOS et al., 2002; LOPES et al., 2009). Programas de criação que visem proporcionar maiores ganhos, podem resultar em maiores taxas de crescimento do esqueleto e estatura. Este melhor desempenho pode manter-se até a puberdade,

acarretando em peso adequado para a reprodução em menor tempo (DRACKLEY, 2004). Novilhas com idade de parto entre 24 e 30 meses tendem a apresentarem maior produção de leite por dia de vida no rebanho, comparado com primeiro parto em idade mais avançada ( $\geq 30$  meses), além de menor período improdutivo, contribuindo com um retorno financeiro mais cedo (SANTOS et al., 2002).

Para tanto, acompanhar o desenvolvimento ósseo e muscular se faz necessário através de pesagens mensais e da avaliação do escore de condição corporal que deve ser de 3,0 em uma escala de 1 a 5 (EDMONSON et. al., 1989; SANTOS et al., 2002). O objetivo final são animais aptos à cobertura aos 14 a 16 meses de idade e com peso médio de 340 a 380 kg para a raça holandês (SANTOS et al., 2002). Programas de criação voltados para maiores taxas de crescimento de bezerras propiciam um melhor aproveitamento da proteína da dieta para conversão de ganho de peso, visto que animais jovens são mais eficientes (DRACKLEY, 2004).

As dietas devem ser formuladas para permitir que as novilhas atinjam a idade reprodutiva o mais rápido possível, sem sobrepeso. Existe, uma preocupação com altas taxas de ganho de peso em bezerras e novilhas, pois acredita-se que isso propiciaria deposição de gordura na glândula mamária competindo com o estabelecimento de células produtivas e causando conseqüentemente redução na produção de leite (SEJRSEN, 2005). No entanto, o excesso de gordura na glândula mamária é uma conseqüência do excesso de gordura corporal, ou seja, de um elevado escore de condição corporal, sendo o acúmulo de gordura no tecido mamário ligado a idade cronológica (DRACKLEY, 2008).

Taxas de crescimento entre 800 a 900 gramas por dia até a puberdade são adequadas, desde que a dieta forneça proteína metabolizável suficiente para favorecer o ganho de tecido magro e evitando a energia excessiva para minimizar a deposição de tecido adiposo (DRACKLEY, 2008). Em resumo, o adequado desempenho de bezerras (MEE et al. 2008), contribuirá para que a novilha tenha seu parto na idade ideal, com peso e escore de condição corporal adequado, sendo estes fatores contribuintes para menores taxas de mortalidade dos filhotes destas novilhas.

## 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes (SIES, 1991) denominados radicais livres, que podem ser as espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas ao hidrogênio (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007). Esse desbalanço pode ser gerado por inúmeros fatores, tanto relacionados com o aumento da produção de ERO quanto com a redução da disponibilidade de antioxidantes. Entre os fatores causadores podem ser citados nutrição inadequada e a exposição dos animais a condições de estresse (ANDRADE et al., 2010) que favorecem a quadros com reações inflamatórias e de doenças (BEZERRA et al., 2015), que afetam negativamente o desempenho.

O oxigênio, ainda que sendo essencial para a vida, possui também efeito tóxico por ser uma substância oxidante, que pode aceitar elétrons desestabilizando a molécula que os perde, (DOWLING; SIMMONS, 2009). As ERO são eletronicamente instáveis, sendo altamente reativas com moléculas que estejam próximas, tanto para doar quanto para receber elétrons (ANDRADE et al., 2010). A formação ERO, ocorre em seres aeróbicos pelos processos normais do metabolismo (SIES, 1991) e a mitocôndria é o principal local de formação devido ao processo de obtenção de energia por meio da fosforilação oxidativa (ANDRADE et al., 2010), onde o oxigênio molecular sofre uma série de reações que levam à geração de radicais livres (WISEMAN; HALLIWELL, 1996). Esse processo resulta em um nível substancial de oxidantes (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007), assim como outros processos envolvidos na defesa contra patógenos podem aumentar a produção de radicais livres (DOWLING; SIMMONS 2009).

Em processos contínuos no organismo, as moléculas de ERO são formadas e necessitam ser neutralizadas pelos antioxidantes para que não causem danos às células, mantendo a homeostase destas (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Caso a capacidade antioxidante não for mantida, o dano oxidativo é acumulado resultando em eventos patofisiológicos (SIES, 1991; figura 2). Estes eventos são prejudiciais aos tecidos, causando efeitos como a lipoperoxidação, danos a proteínas e ao DNA, provocando assim diversas alterações na função celular (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Também ocorre modificação oxidativa de macromoléculas celulares, morte celular por apoptose ou necrose e danos estruturais nos tecidos (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007). Porém os efeitos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA (BARREIROS; DAVID, 2006)

porque podem ocorrer danos nas bases destas moléculas gerando mutações e alterações na expressão gênica, associadas a carcinogênese. Na mitocôndria, onde grande quantidade de ERO é produzida, o DNA mitocondrial pode sofrer acúmulo de danos, causando a morte da célula devido a inativação da mitocôndria (VALKO et al., 2004).

Quando a produção de ERO não excede a capacidade das barreiras antioxidantes endógenas no organismo, estes possuem finalidades benéficas, que incluem controle da expressão gênica, modulação do músculo esquelético, defesa contra patógenos (FALOWO et al., 2014) e ativação do sistema imunológico (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Os oxidantes também são moléculas de sinalização endógenas que estão envolvidas no controle de grandes cascatas, como apoptose e inflamação. Dessa forma, o aumento da produção de oxidantes, não está necessariamente associado a danos oxidativos (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007), e estes só ocorrem quando a quantidade de ERO ficam exacerbadas (BEZERRA et al., 2015).

As ERO são controladas pelos corpo através de dois sistemas: enzimático e não enzimático (SCANDALIOS, 2005). O sistema enzimático também conhecido por antioxidantes naturais, é composto por enzimas endógenas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) entre outras, que neutralizam as moléculas oxidativas (ANDRADE et al., 2010). Os minerais cobre, zinco, manganês, ferro, selênio entre outros são conhecidos e estudados pelo envolvimento neste sistema de defesa antioxidante (BICALHO et al., 2014; SIES, 1991). As enzimas SOD catalisam a neutralização do radical superóxido, que é convertido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (BARREIROS; DAVID, 2006). Essa é uma metaloenzima dividida em classes que contém sítios ativos com microminerais como por exemplo o Cu e o Zn (Cu/ZnSOD) e Mn (MnSOD). Estas enzimas são encontradas normalmente no citosol das células (SCANDALIOS, 2005). A CAT desempenha importante papel na eliminação do peróxido de hidrogênio, promovendo sua neutralização através da catálise até água (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Sua ação rápida e eficaz faz com que se torne uma importante enzima para sistemas aeróbicos (SCANDALIOS, 2005). A GPx atua convertendo a glutathione reduzida à glutathione oxidada, nesse processo ocorre a remoção do peróxido de hidrogênio e a também formação de água, evitando a formação do radical superóxido, para o qual o sistema enzimático não é eficiente (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). A GPx é uma selenoenzima antioxidante com efeitos positivos relatados em bovinos, protegendo as células dos efeitos oxidantes (SORDILLO; AITKEN, 2009; MAGGINI et

al., 2008). Já o sistema não enzimático, conhecido também como antioxidantes sintéticos ou adicionados na dieta, possuem vasto número de moléculas como por exemplo vitaminas E e o caroteno, que é precursor da vitamina A, alguns minerais como zinco e selênio (ANDRADE et al., 2010), além de compostos sintetizados pelo organismo como bilirrubina e ceruloplasmina (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Este sistema normalmente previne a ocorrência de lesão nas células pela ação das ERO (ANDRADE et al., 2010).

Os três principais tipos de radicais livres são: superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^\bullet$ ; ANDRADE et al., 2010). De acordo com Nordberg e Arnér (2001) o radical superóxido é formado a partir do oxigênio molecular quando ganha um elétron, e esse processo ocorre naturalmente nas células, principalmente na mitocôndria durante a cadeia respiratória de elétrons. Além disso, esses autores dizem que este radical possui efeito de menor reatividade quando comparado ao EROs. Já, o radical hidroxila é formado a partir do peróxido de hidrogênio através da chamada reação de Fenton e possui alta reatividade e consequentemente nocividade à moléculas, sendo um dos responsáveis pelos danos ao DNA (DUARTE; JONES, 2007). O peróxido de hidrogênio não é de fato um radical livre e sim um metabólito do oxigênio, porém é extremamente deletério, pois é um intermediário na reação produtora de hidroxila (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

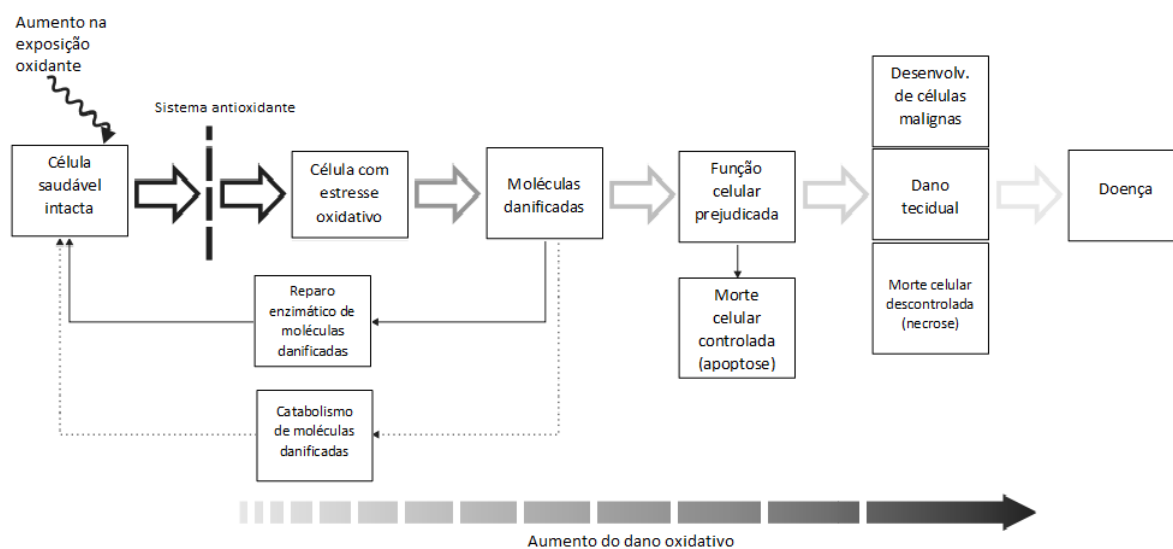


Figura 2: Representação das defesas celulares contra danos celulares mediados pelo estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo é inicialmente neutralizado pela rede antioxidante. Moléculas danificadas são reparadas ou catabolizadas. A morte celular controlada pode ser iniciada se mais danos oxidativos prejudicarem a função celular. Quando essas cascatas de sinalização são danificadas ou o dano oxidativo excede a capacidade dos mecanismos de defesa, a morte celular descontrolada, o dano tecidual e o desenvolvimento de células malignas podem progredir para a doença (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

## 1.5 SISTEMA IMUNE

O sistema imunológico é composto pela imunidade inata e a adquirida, mas ambas funcionam em conjunto (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa, e é ativada imediatamente após a infecção e inclui barreiras físicas como a pele, secreções, além de microrganismos benéficos como os do intestino e do trato respiratório que competem contra patógenos invasores. Embora sempre presente em maior ou menor grau, a imunidade inata é influenciada por fatores como estresse e nutrição (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; CARROLL; FORSBERG, 2007). A segunda linha de defesa envolve a imunidade adquirida, que constrói a resposta imune específica. Neste caso ocorre a produção de anticorpos que possuem memória imunológica, o que permite exposições subsequentes aos mesmos patógenos com respostas imunológicas mais rápidas e mais fortes do que a resposta inicial (CARROLL; FORSBERG, 2007; JANEWAY et al., 2005).

A imunidade adaptativa pode ser classificada como mediada por células, ou humoral, sendo que a primeira representa a resposta imunológica associada a células imunes que atuam contra células infectadas por patógenos e a segunda envolve a geração de anticorpos específicos que são direcionados contra os patógenos invasores (CARROLL; FORSBERG, 2007; JANEWAY et al., 2005).

A placenta dos bovinos é classificada como sindesmocorial, que possui membranas teciduais que impedem a passagem de macromoléculas, entre elas os anticorpos. Conseqüentemente não há transferência da imunidade durante a gestação, desta maneira o colostro é a forma de ingestão de imunoglobulinas nos bezerros recém-nascidos (CHUCRI et. al., 2010). A ingestão de colostro de qualidade deve ser feita imediatamente após o nascimento em função do sistema imune destes animais ser ainda imaturo e não poder reagir satisfatoriamente aos desafios impostos pelo ambiente ao qual os bezerros estão expostos (BESSER; GAY, 1994). A absorção de imunoglobulinas no intestino delgado nas primeiras 24 horas de vida, denominada transferência passiva, ajuda a proteger o bezerro de enfermidades até o pleno desenvolvimento do sistema imune. As primeiras horas são fundamentais, pois a medida que o tempo passa, os enterócitos perdem a capacidade de absorver macromoléculas por pinocitose não seletiva, ou seja, a absorção das imunoglobulinas diminui (GODDEN, 2008).

O termo qualidade do colostro refere-se aos fatores de concentração de imunoglobulinas, que deve ser superior a 50g/L e à qualidade microbiológica, ligada a higiene durante o processo de ordenha, visto que bactérias no colostro podem interferir na absorção das imunoglobulinas (GODDEN, 2008). Falhas no processo de colostragem causam prejuízos ao setor produtivo, pois a menor imunidade passiva acarreta em maiores taxas de morbidade e mortalidade (POULSEN et al., 2010).

De acordo com COELHO (2009), bezerros holandeses devem consumir 4 litros de colostro nas primeiras seis horas de vida, sendo que concentrações de proteínas totais no soro desses animais deve ser maior que 5,5g/dL para indicar uma boa colostragem. Porém, mesmo quando a imunidade passiva é adequada os bezerros podem desenvolver doenças, devido ao estado fisiológico do animal ou caso o colostro não possua imunoglobulinas contra um patógeno específico, isso porque a vaca (mãe) ainda não tenha sido exposta ao determinado patógeno. Como descrito por COELHO (2009), as imunoglobulinas são específicas para antígenos específicos, logo se as imunoglobulinas do colostro não forem específicas para os antígenos presentes na fazenda, a concentração de imunoglobulinas no sangue, mesmo sendo alta, pode não conferir imunidade. Isso acontece normalmente quando bezerros e vacas são criados em locais distantes uns dos outros e os patógenos presentes no local de criação dos bezerros são diferentes daqueles aos quais as mães são submetidas. O colostro também fornece leucócitos, incluindo macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Os benefícios destes no colostro, sugerem o aumento da fagocitose, o combate a bactérias e estímulo nas respostas imunes humorais devido a formação de IgG (LARSON et al., 1980; GODDEN, 2008).

A nutrição na fase inicial da vida dos bezerros pode trazer efeitos a longo prazo, entre eles o melhor desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico (COELHO, 2009). Alternativas como o fornecimento de minerais como zinco, cobre, ferro, magnésio, selênio e manganês e vitaminas A, C, D e E pela via injetáveis podem melhorar a saúde e as respostas imunomoduladoras (TEIXEIRA et al., 2014; CARROLL; FORSBERG, 2007; CAZAROTTO et al., 2018; TOMASI et al., 2018; VOLPATO et al., 2018), porém mesmo com uma boa nutrição, animais criados em instalações inadequadas, sem ventilação e submetidos a estresse térmico apresentam maior risco de desenvolver doenças (COELHO, 2009).

## 1.6 MICROMINERAIS E VITAMINAS

Os minerais são fundamentais para os bovinos em diversos processos fisiológicos, como o de crescimento, reprodução, antioxidante e imunológico, sendo que carências no fornecimento podem afetar negativamente a produção animal (SPEARS, 2000; UNDERWOOD, 1999). Os microminerais ou minerais traço são necessários em menores quantidades pelos animais, ou seja, menos que 100 ppm (PEDREIRA; BERCHIELLI, 2011). O leite integral, principal fonte de nutrientes dos bezerros é carente em minerais como manganês e selênio (DRACKLEY, 2008), porém os níveis destes microminerais, bem como os de vitaminas, são variáveis de acordo com o fornecimento via dieta (HURLEY, 1997).

As vitaminas do complexo B por serem fornecidas pela população microbiana, e vitamina C sintetizada endogenamente normalmente não são suplementadas para bovinos (CARROLL; FORSBERG, 2007). Porém, vitaminas como A e E, são listadas como antioxidantes (OMUR et al., 2016), e contribuem para a saúde animal, pois o fornecimento em quantidades inadequadas propicia menores índices produtivos e reprodutivos, bem como maior susceptibilidade a doenças (WEISS, 2005).

Em muitos casos a dieta oferecida, não supre todas as exigências de minerais (ARTHINGTON et al., 2014) e vitaminas em bovinos e assim se faz necessário suplementar estes. A suplementação de minerais e vitaminas pode ocorrer por vários meios, como misturados a concentrados, mistura em pó de minerais e vitaminas, blocos, bolus intraruminal de liberação lenta ou mesmo via injetável (ARTHINGTON et al., 2014). Apesar da prática de aplicar microminerais injetáveis ser antiga, recentemente muitos pesquisadores conduziram estudos com esse tipo de suplementação nas mais diversas espécies (CAZAROTTO et al., 2018; TOMASI et al., 2018; VEDOVATTO; FRANCO, 2018) e observamos aumento na oferta de produtos comerciais no mercado.

A aplicação injetável dos microminerais Zn, Cu, Se e Mn, tem se demonstrado benéfica por estimular a resposta antioxidante dos bovinos, pois ocorre um aumento da expressão e atividade de algumas metalo-enzimas como SOD, CAT e GPx (BICALHO et al., 2014; MACHADO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014; TOMASI et al., 2018;). Além disso, podem estimular o sistema imune e assim ter maiores níveis séricos de neutrófilos (TEIXEIRA et al., 2014; VEDOVATTO; FRANCO, 2018), proteínas totais e

ceruplasmina (VOLPATO et al., 2018; TOMASI et al., 2018), variáveis importantíssimas na proteção contra agentes causais.

O melhor status antioxidante e imunológico dos bovinos, pode proporcionar maior ganho de peso, principalmente em locais de criação com alto desafio sanitário (VEDOVATTO; FRANCO 2018). No entanto algumas pesquisas mostram resultados de ganho de peso semelhantes entre grupo tratado com microminerais e grupo controle (TEIXEIRA et al., 2014; ARTHINGTON et al., 2014; NIEDERMAYER et al., 2017). Já em pesquisa realizada por Volpato et al. (2018), o fornecimento de selênio e vitaminas A e E, resultou em maior ganho de peso e melhor saúde dos bezerros com maiores níveis de antioxidante e marcadores imune. A aplicação injetável das vitaminas A, D e E e dos minerais Cu, Zn, Se e Mn em vacas em período de transição resultou em maior capacidade antioxidante total e menor capacidade oxidante total (OMUR et al., 2016). Portanto, minerais e vitaminas tem efeito positivo aos animais, pois aumentam barreiras de proteção celular natural, ou seja, respostas antioxidantes.

O adequado desenvolvimento e função do sistema imunológico é dependente de níveis adequados de vitaminas, visto que estas exercem papéis essenciais na hematopoiese, manutenção e função de linfócitos e neutrófilos e na produção de anticorpos (CARROLL; FORSBERG, 2007). No sistema antioxidante, vitaminas e minerais são importantes na inativação de ERO, sendo esta inativação fundamental, pois as células do sistema imune são susceptíveis aos radicais livres (SPEARS, 2000).

Um dos mecanismos bactericidas, denominado "explosão respiratória" pelo qual as células do sistema imunológico fagocitam e matam patógenos, gera grandes quantidades de ERO, que podem vir a causar a lipoperoxidação na membrana plasmática das células do sistema imune. Desta forma altos níveis antioxidantes são importantes para a proteção das células imunes (MEYDANI et al., 1995; CARROLL; FORSBERG, 2007). Devido a capacidade de oxidação, as ERO, além de lesões, causam também respostas inflamatórias. Estudos recentes, sugerem também, um papel benéfico do peróxido de hidrogênio na sinalização de danos às células (VAN DER; JANSSEN-HEININGER, 2014).

### 1.6.1 MICROMINERAIS E VITAMINAS INJETÁVEIS

Usualmente o fornecimento de minerais e vitaminas aos bovinos leiteiros se dá através de misturas (conhecidos como premix ou núcleo) que são acrescentadas na dieta e fornecida para estes (ABUELO et al., 2014; PASCHOAL et al., 2006). No entanto, a aplicação injetável de microminerais e vitaminas, mesmo sendo menos difundida, apresenta-se como opção, podendo contribuir para melhorar o desempenho animal (ABUELO et al., 2014; COLLET et al., 2017). Esta aplicação se dá normalmente via subcutânea e pode ser uma mistura de microminerais e vitaminas (OMUR et al., 2016).

Uma das principais vantagens da aplicação de microminerais e vitamínicos injetáveis, em comparação com os métodos convencionais de fornecimento, é poder assegurar uma dose conhecida com aplicação individual, evitando oscilações de ingestão normalmente observadas em modelos de consumo voluntário (ARTHINGTON et al., 2014). Além disso, não ocorrem interações entre os ingredientes ou problemas relacionados ao antagonismo entre os minerais fornecidos, pois quando se aplica na forma injetável, estes são disponibilizados na corrente sanguínea (ABUELO et al., 2014; ARTHINGTON et al., 2014).

Para animais onde o consumo de matéria seca é reduzido, como o que ocorre com bezerras em processo de desama ou desaleitamento devido ao estresse, o fornecimento de minerais e vitaminas injetáveis mostra-se como uma boa opção para atender as exigências dos animais (ARTHINGTON et al., 2014; SANTOS et al., 2018). Outra contribuição é poder fornecer o tratamento apenas a animais que estejam em estado crítico, sem ser necessário o tratamento em todo o rebanho via dieta (ABUELO et al., 2014). Em contrapartida, o fornecimento injetável aumenta as práticas de manejo com os animais, sendo necessário para tal, a disponibilidade de infraestrutura adequada (COOKE et al., 2017).

### 1.6.2 COBRE

O micromineral cobre (Cu) exerce função no sistema imune por estimular as respostas de neutrófilos, monócitos e células T (MAGGINI et al., 2008), e sua deficiência está associada com redução da resposta imune celular e humoral (DORTON et al., 2003).

O Cu também está ligado à maturação de hemácias, além de ter efeito sinérgico com o ferro na formação de hemoglobina (FOX, 2003). Além disso, o Cu participa da formação do tecido ósseo, do tecido conjuntivo e é importante na integridade do sistema nervoso central (SPEARS, 2000).

Já o sistema antioxidante, pode ser estimulado pelo maior aporte de Cu, pois este é um cofator da enzima CAT, que tem a função de catalisar a redução do peróxido de hidrogênio para água e oxigênio (UNDERWOOD, 1999). Também é componente da enzima SOD, sob as formas de Cu-ZnSOD (MARKLUND, 1980), enzima que converte os radicais superóxido em peróxido de hidrogênio no citosol (UNDERWOOD, 1999), um intermediário com capacidade oxidante fraca, porém que pode formar o radical hidroxila com a presença de metais como o ferro (VASCONCELOS et al., 20017). Tomasi et al., (2018) verificaram aumento da enzima CAT e SOD, 10 dias após a aplicação injetável de Cu e Zn em bezerros.

A aplicação de cobre em novilhas de búfalas aumentou a concentração de ceruloplasmina, atividade fagocítica dos neutrófilos e das enzimas SOD (SHARMA et al., 2007). Grande parte do Cu do plasma sanguíneo está na forma de ceruloplasmina, que é sua carreadora específica, ou seja, responsável pelo transporte do fígado para os demais órgãos (MCDOWELL, 1992). A ceruloplasmina é uma proteína responsável pela homeostase do ferro, pois converte a forma ferrosa em ferro férrico (BRODERIUS et al., 2010). A ceruloplasmina também impede o cobre e o ferro de participar das reações oxidativas, agindo dessa forma no sistema de defesa antioxidante extracelular (SCHENEIDER; OLIVEIRA, 2004; WEISS, 2002). Dessa forma, a deficiência de Cu pode causar anemia, visto a participação no metabolismo do ferro (SHARMA et al., 2007). Deficiências de Cu em ruminantes são causadas normalmente pela ingestão via dieta de altas quantidades de minerais antagonistas, como o molibdênio, o enxofre e o ferro. Esta deficiência está relacionada com a depressão da capacidade dos neutrófilos de combater as infecções (SPEARS, 2000).

### 1.6.3 MANGANÊS

O Mn desempenha um papel ativo no processo de formação óssea pois é um ativador de glicosiltransferases que atuam na síntese da matriz óssea e cartilagens, também atua na reprodução por participar da síntese de hormônios nos ovários, além estar

envolvido no metabolismo de carboidrato através da metaloenzima piruvato carboxilase (CORAH; IVES 1991). O Mn também é importante para o crescimento e formação de tecidos (HURLEY; DOANE, 1989), assim como é um importante co-fator de reações enzimáticas que estão envolvidas na regulação metabólica de animais (OMUR et al., 2016). É encontrado em concentrações mais altas dentro das mitocôndrias das células e também se acumula na matriz óssea. A enzima antioxidante Mn-SOD é importante no sistema antioxidante e trabalha em conjunto com outras enzimas (NRC, 2001), logo o aumento da concentração de SOD pode acontecer pelo maior aporte de Mn (MARKCLUND, 1980).

Manifestações da deficiência de Mn apesar de raras em ruminantes, podem prejudicar a reprodução, através de estros irregulares, baixas taxas de concepção e abortos (GRAHAN, 1991). Também prejudicará as várias metaloenzimas que possuem Mn na sua estrutura, além de provocar alterações no crescimento, normalmente causado pelo encurtamento ou deformação dos ossos de animais jovens (NRC, 2001).

#### 1.6.4 SELÊNIO

O Se é componente essencial da família das enzimas antioxidantes glutationala peroxidase (GPx), responsáveis pela remoção dos radicais livres através da destruição de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos (OMUR et al., 2016; ROTRUCK et al., 1973; OVERTON; YASUI, 2014). Combatendo o estresse oxidativo, o Se contribui para manter a integridade da membrana celular, proteger de danos à molécula de DNA e outras macromoléculas presentes na célula (MAGGINI et al., 2008).

A presença de Se na estrutura da enzima GPx permite uma correlação entre a atividade desta enzima e concentração sanguínea do mineral (WITTWER, 1998), sendo que animais deficientes em Se apresentam menor atividade da enzima GPx quando comparados com animais não deficientes (WU et al., 2016).

As alterações relatadas pela deficiência de Se também estão associadas ao sistema reprodutivo, pela maior incidência de retenção de placenta, metrites, maior período de involução uterina, menor vitalidade da cria (HURLEY; DOANE, 1989; VAN SAUN, 1990), além da doença do músculo branco (que gera distrofia muscular e afeta principalmente bezerras; VAN SAUN, 1990), saúde da glândula mamária (devido à

maior incidência de mastites e contagem de células somáticas; SMITH et al., 1984; HOGAN et al., 1993; VAN SAUN, 1990), menor resistência a infecções (devido a menor produção de anticorpos; SHEFFY; SCHULTZ, 1979) e a redução da atividade dos neutrófilos (HOGAN et al., 1993).

### 1.6.5 ZINCO

O Zn é cofator em mais de 300 enzimas que influenciam vários processos fisiológicos do organismo (RINK, 2000), incluindo enzimas envolvidas na síntese de DNA e RNA que conseqüentemente atuam na replicação e proliferação de células imunes (ANDRIGUETTO et al., 1999). O Zn possui funções na produção de proteínas e formação de ligações dissulfeto, que estão presentes na estrutura dos anticorpos, logo o maior aporte de Zn pode auxiliar no aumento de anticorpos (CHARLTON; EWING, 2007). No sistema antioxidante o Zn atua principalmente como cofator da enzima Cu-Zn SOD. Também induz a síntese de metalotioneína, uma proteína ligante de metal que pode eliminar os radicais de hidróxido (OMUR et al., 2016). De acordo com Marklund (1980), o aumento da concentração de SOD pode acontecer pelo maior aporte de Zn, componente essencial da Zn-SOD. O Zn participa também da pigmentação dos tecidos, manutenção da integridade das gônadas masculinas, pele, ossos e olhos. Influencia a imunidade inata e adquirida (ANDRIGUETTO et al., 1999; MAGGINI et al., 2008), sendo necessário para a adequação, formação e funcionamento do sistema imunológico na primeira fase da vida do animal (NRC, 2001). O Zn também é componente da timosina, um hormônio produzido pelas células do timo que regula a imunidade mediada por células (NRC, 2001). Na reprodução, o Zn é essencial para a espermatogênese e motilidade dos espermatozoides, além de ser um componente essencial ou ativador de enzimas envolvidas na esteroidogênese (HURLEY; DOANE, 1989). Logo, deficiências de Zn podem apresentar efeitos significativos em múltiplos sistemas dentro do corpo, incluindo o crescimento, sistemas nervoso, reprodutivo e imunológico (CARROLL; FORSBERG, 2007).

A deficiência de Zn em bovinos se manifesta pela diminuição da taxa de crescimento e da eficiência alimentar, redução do consumo de alimentos, queda de pelos, diminuição de fertilidade e da produção de leite (ANDRIGUETTO et al., 1999). Em casos de deficiência prolongada, os animais exibem menor crescimento dos testículos,

cascos fracos, além de lesões na pele, especialmente na região das pernas, cabeça e pescoço e alopecia (NRC, 2001). A deficiência de Zn tem sido associada também com diminuição da função das células T e respostas de anticorpos (KRUSE-JARRES, 1989) em ruminantes, porém alguns estudos sugerem que a deficiência marginal de Zn não prejudicaria as respostas imunes mediadas por células ou anticorpos (SPEARS, 2000).

#### 1.6.7 VITAMINA A

A vitamina A normalmente sob a forma de retinol ou  $\beta$ -caroteno, tem importante função no sistema imunológico e antioxidante (SPEARS, 2000; CARROLL; FORSBERG, 2007). Essa vitamina é necessária em diversos processos do organismo, como crescimento, visão e proteção contra infecções (KRISHNAMOORTHY, 2012), tendo papel importante tanto na resposta humoral (anticorpos) como na imunidade mediada por células (MAGGINI et al., 2008). Já no sistema antioxidante atua na neutralização do oxigênio atômico e outros elétrons excitados, além de reagir com radicais peroxil e alcoxi (SIES, 1991).

A deficiência da vitamina A prejudica a imunidade, reduzindo capacidade de defesa contra patógenos parasitários, bacterianos e virais, além de induzir a respostas inflamatórias (MAGGINI et al., 2008; CHEW, 1987). Causa cegueira ou cegueira noturna, retardo e cessação do crescimento em fetos e bezerros, além de alterações degenerativas na mucosa protetora do trato respiratório e digestivo. (KRISHNAMOORTHY, 2012; HURLEY; DOANE, 1989). O papel da vitamina A na modulação do sistema imune durante uma infecção pode variar de acordo com os patógenos envolvidos e do status da vitamina no animal. Porém acredita-se que os danos causados nas membranas do trato respiratório e digestivo, favorecem a invasão de bactérias e vírus (CHANDRA, 1997).

#### 1.6.8 VITAMINA E

Vitamina E é o nome genérico de todos os derivados de tocol e tocotrienol (HURLEY; DOANE, 1989) e atuam como antioxidantes lipossolúveis, protegendo as células da peroxidação lipídica causada por radicais livres (SIES, 1991; OMUR et al., 2016). A vitamina E é um constituinte importante de todas as membranas encontradas nas

células: plasmática, mitocondrial e nuclear, sendo assim o principal antioxidante do corpo, presente em todas as células. Porém, a maior concentração se dá nas células do sistema imunológico, onde pode fornecer proteção contra os radicais livres utilizados pelas células brancas do sangue para destruir organismos patogênicos (HURLEY; DOANE, 1989).

A vitamina E age como um antioxidante lipossolúvel dentro das membranas, atua como doador de H para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia (HURLEY; DOANE, 1989). A neutralização da peroxidação lipídica das membranas celulares forma um derivado de baixa reatividade, o que minimiza os danos para as membranas (PISOSCHI; POP, 2015; BARREIROS; DAVID, 2006). A doença do músculo branco é considerada um sinal clássico de deficiência de vitamina E (NRC, 2001), causando alterações degenerativas nos músculos esqueléticos e cardíaco, sendo sinais clínicos característicos, que bezerros apresentem rigidez e fraqueza generalizada, além de ter a musculatura da língua afetada, podendo interferir no processo de aleitamento (MCDOWELL et al., 1996). Em casos críticos, no entanto, o animal pode ser incapaz de levantar a cabeça e ficar de pé (KRISHNAMOORTHY, 2012), podendo ocorrer inclusive a morte por insuficiência cardíaca, devido aos danos causados a esta musculatura (MCDOWELL et al., 1996).

Na literatura, muitas vezes a vitaminas E é discutida juntamente com o mineral Se, pois estes nutrientes apresentam sinergia no sistema de defesa antioxidante, agindo contra os peróxidos presentes no organismo e podendo resultar na melhora do sistema imune, com respostas mais consistentes de anticorpos (SPEARS, 2000; VOLPATO et al., 2018) e leucócitos (MOEINI et al., 2011). Embora a vitamina E e o Se tenham funções específicas, cada um pode exercer o efeito de reduzir a necessidade do outro nutriente, sendo os dois, componentes importantes do sistema antioxidante celular (HURLEY; DOANE, 1989).

A suplementação com vitamina E em bezerros alimentados com um sucedâneo lácteo aumentou a atividade bactericida do neutrófilo no sangue (EICHER et al., 1994), já em vacas lactantes, altas doses de vitamina E resultaram em menores índices de mastite clínica (WEISS et al., 1997). A suplementação conjunta de vitamina E e Se em vacas em lactação melhorou a saúde da glândula mamária, reduzindo o tempo de duração dos sinais clínicos e também o número de casos de mastite clínica quando comparadas com vacas suplementadas com apenas um dos nutrientes (WEISS et al., 1990). A vitamina E em

bezerras resultou em melhor status imunológico, contribuindo para maior ganho de peso e saúde dos animais (VOLPATO et al., 2018).

## **1.7. OBJETIVOS**

### **1.7.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar se a aplicação injetável das vitaminas A e E e dos microminerais zinco, cobre, selênio e manganês, melhoram o desempenho de bezerras leiteiras no período de pré e pós-desaleitamento.

### **1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se a administração de vitaminas e minerais melhora o ganho de peso das bezerras, e minimiza ou evita a diarreia no período de transição;
- Avaliar se o tratamento melhora o sistema imune, e consequentemente aumenta o número de células inflamatórias, proteínas de fase aguda e anticorpos;
- Avaliar se a administração de vitaminas e minerais melhora o status oxidante e antioxidante, reduzindo as reações oxidativas e estimulando as respostas antioxidantes enzimáticas.

## **2. CAPÍTULO II MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista ao qual foi submetido.

## 2.1 MANUSCRITO I

### **Metaphylactic effect of minerals and vitamins on performance and health in dairy calves during the nutritional transition period**

Autores: Rael Bordignon<sup>a</sup>, Andreia Volpato<sup>a</sup>, Patrícia Glombowsky<sup>a</sup>, Carine F. Souza<sup>b</sup>,  
Matheus D. Baldissera<sup>c</sup>, Rodrigo Secco<sup>d</sup>, Wanderson A.B. Pereira<sup>d</sup>, Marta L.R. Leal<sup>e</sup>,  
Aleksandro S. da Silva<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, Brazil.

<sup>b</sup> Graduate Program of Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

<sup>c</sup> Graduate Program of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

<sup>d</sup> Veterinary Medicine, Instituto Federal Catarinense, Concordia, Brazil.

<sup>e</sup> Department of Large Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

De acordo com normas para publicação em:

Biological Trace Element Research

**Metaphylactic effect of minerals and vitamins on performance and health in dairy calves during the nutritional transition period**

Rael Bordignon<sup>a</sup>, Andreia Volpato<sup>a</sup>, Patrícia Glombowsky<sup>a</sup>, Carine F. Souza<sup>b</sup>, Matheus D. Baldissera<sup>c</sup>, Rodrigo Secco<sup>d</sup>, Wanderson A.B. Pereira<sup>d</sup>, Marta L.R. Leal<sup>e</sup>, Aleksandro S. da Silva<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, Brazil.

<sup>b</sup> Graduate Program of Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

<sup>c</sup> Graduate Program of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

<sup>d</sup> Veterinary Medicine, Instituto Federal Catarinense, Concordia, Brazil.

<sup>e</sup> Department of Large Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

**Corresponding author:** Aleksandro Schafer Da Silva

Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil. E-mail: [aleksandro.silva@udesc.br](mailto:aleksandro.silva@udesc.br)

**Abstract**

In the early stages of a calf's life, immunity is not fully established; this is the period in which the highest death rates occur. Another critical moment is the weaning period, when calves undergo high levels physiological stress due to lack of milk in the diet. Recently, evidence has suggested that mineral supplementation would a suitable approach to stimulate the immune and antioxidant system of dairy cows during the transitional period. Therefore, the present study aims to determine whether the use of injectable vitamins and minerals improves the growth performance, and the immune and antioxidant responses in dairy calves in the pre- and post-weaning period. Twenty dairy calves (45 days of age) were randomized to two groups (10 each): control group (CON) and treated group (TREAT) with trace minerals (zinc, copper, selenium and manganese) and vitamins (A and E) at two periods (15 days pre-weaning and 15 days post-weaning). The animals were weighed and blood samples were collected on days 1, 15, 30 and 45 of the study. Levels of seric copper, selenium, zinc and manganese were measured on day 1; and the results showed that calves were not deficient in these minerals. We obtained greater body weight gain in TRAT group calves in the final third of the experiment. There was an increase in total leukocyte numbers as a result of elevation in neutrophil counts (day 45) and monocytes (days 30 and 45) in the TREAT group. In this group, we also observed a reduction in reactive oxygen species (ROS) content (days 15, 30 and 45), in lipid peroxidation (LPO; days 15 and 45), greater antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP; days 15 and 30) and greater enzyme activity of glutathione peroxidase (GPx; days 15, 30 and 45) and superoxide dismutase (SOD; day 15). The TREAT group had greater concentration of total serum proteins (day 30), serum globulin (days 15 and 30), ceruloplasmin (day 15), tumor necrosis factor – Alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1, (IL-1; days 30 and 45) besides interferon gamma (IFN $\gamma$ ; day 45) compared to CON group. Thus, the mineral and vitamins injections, even had no effect on growth performance, booster the antioxidant and immunological system of dairy calves during the diet transition period.

**Keywords:** Antioxidant system, calves, performance, immunity, preventive medicine.

## 1. Introduction

The initial phase of cattle life is critical because their immune system is immature shortly after birth; nevertheless, the animal requires rapid development of the immune system in order to respond to the infections and to optimize growth [7,8]. Therefore, these animals are dependent on the immunity acquired from colostrum to generate immune responses, despite the fact that they are capable of mounting some immune responses in utero.

Another challenge for calves is weaning. In this critical period, there are drastic changes related primarily to the transition from liquid to solid diet, reduction in the levels of supplied dry matter and greater ruminal activity can affect animal development [10]. According to the literature, this phase generates stress, a negative factor often associated with reduced resistance to diseases [20]. In addition, possible changes at facilities and management (e.g., dehorning) commonly practiced at this time, can make the animal more vulnerable [10].

The metabolic stresses associated with weaning can be severe, compromising the antioxidant system [48] and generating oxidative stress. This biochemical event is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the exhaustion or activation of the animal's antioxidant system [35, 53] possibly favoring deleterious effects on cells, tissues and consequently the onset of diseases [9]. Intake of a diet rich in antioxidants showed beneficial effect on animal health [27].

According to researchers, supplementation of minerals plays an important role in cattle by stimulating the immune system [38], for being enzymatic cofactors [17]. Recently, studies showed that the use of injectable minerals would be a suitable method to improve mineral utilization in the animal's body; and it may be a promising alternative for improving animal performance [13]. In addition, vitamins A and E were identified as antioxidants [45]. These are important for promoting adequate levels of good health, a key point for calf-rearing and future performance [57].

Studies from our research group showed that supplementation with minerals and/or vitamins in calves [21, 51, 55] and lambs [11] are beneficial to the health and growth performance of the animals in the nursing phase. We also observed similar results when minerals (zinc and selenium) were given during the transition period from liquid to solid diet (weaning) in calves [55]. Our hypothesis is that the combination of minerals and vitamins

injectable can enhance the positive effects of dairy animal health and growth performance. Therefore, the objective of this study was to determine whether the subcutaneous application of minerals and vitamins have nutraceutical effects on the antioxidants and consequently growth performance of dairy calves during the diet transition period (weaning).

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Products**

We used the commercial product based on vitamins A and E (Adaptador<sup>®</sup> Vit; Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina), and minerals zinc, copper, selenium and manganese (Adaptador<sup>®</sup> Min; Biogénesis Bagó). The dose used was 1 mL/50 kg of body weight, according to manufacturer's recommendations. The dose of Adaptador<sup>®</sup> Min provided 0.20 mg/kg of copper, 0.80 mg/kg of zinc, 0.20 mg/kg of manganese and 0.10 mg/kg of selenium. The dose of Adaptador<sup>®</sup> Vit provided 35 mg/kg of vitamin A and 1 mg/kg of vitamin E. On experimental days 1 (15 days pre-weaning = 45 days of age) and 30 (15 days post-weaning = 75 days of age), we applied the supplement subcutaneously, with the two products being applied alone and in different places. In the control group, the same management and application procedure was performed; however, the same volumes of the treated group were applied with only saline solution (0.9% NaCl) and mineral oil for purposes of the placebo effect.

### **2.2 Animals and experimental design**

The study was carried out in a commercial farm in the western region of Santa Catarina, using 20 Holstein heifer calves (45±2 days of age) divided into two groups (10 animals each): control group (CON) and treated group (TREAT). The groups were randomized, depending on the arrangement of the pens, i.e., cohabiting one animal from the control group or from the treated group, in order to randomize the effect of the environment inside the shed. The animals were housed in individual pens at the beginning of the experiment because they were nursing (between 45 and 60 days of age); however, at weaning (60 days of age), they were allocated to collective pens, separated by groups.

The diet provided during the 45-day experimental period is presented in Table 1. The calves were fed with milk in the first 15 days of experiment only. Concentrate (day 1 to 15: 400

grams/animal/day; day 15 to 30 of 600 grams/animal/day; day 30 to 45: 800 grams/animal/day), water and hay (*Cynodon spp.*) were offered to the animals throughout the experiment *ad libitum*.

### 2.3 Sample collection

The animals were weighted and feces and blood samples were collected on days 1 (15 days pre-weaning), 15 (weaning day: calves at 60 days of age), 30 (15 days post-weaning) and 45 (30 days after weaning). Blood samples were collected from jugular veins into two vacuum tubes, with and without anticoagulant (EDTA 10%). The samples were kept in an isothermal box at temperature of 10°C until the time of the laboratory analysis. Samples collected in tubes without anticoagulant (clotted blood) were centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes to harvest serum. In addition, the animals were weighed using a tape measure, a method of weighing the animals indirectly using thoracic perimeter [37]. We also performed fecal score analyses [25] on feces collected from the rectal bulb. Feces samples were kept in isothermal boxes at 10 °C for further parasitological analysis. Concentrate and hay samples were collected from the total diet provided (concentrate and hay) for all calves in the three experiments (Table 1). We measured dry matter, ashes, ether extract and crude protein, following a method described by Silva and Queiroz [49]. In addition, neutral detergent fiber and acid detergent fiber were analyzed following the methodology described by Van Soest [52]. Minerals (copper, zinc, selenium and manganese) were determined in hay and concentrate by a near-infrared spectroscopy method in a commercial laboratory [42; Table 1).

### 2.4. Serum concentrations of minerals

Serum concentrations of selenium, copper, manganese and zinc were determined on day 1 the of experiment. In the analyzes, specific tests were used, as described below. Selenium was measured using the hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) (PerkinElmer Model 3030) technique and chemicals of analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany) [11, 19]. Thus, 1 ml of HNO<sub>3</sub> and 250 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added to 500 µL of serum into 15 mL vials. The vials were warmed in a domestic microwave. Milli-Q water was added until 10 mL final volume and the solution analyzed. Copper, manganese,

and zinc concentrations in digested samples were determined by ICP-OES. Operational conditions used for this minerals determinations were those recommended by the instrument manufacturer. Aqueous calibration standards were prepared by sequential dilution of a stock solution of copper, manganese, and zinc (10  $\mu\text{mol/L}$ , Spex CertiPrep, Metuchen, NJ, USA). Standards were prepared daily at concentration of 5, 10, 15, 20, 40, 60, and 80  $\mu\text{mol/L}$  Cu, Mn, and Zn. Sample digests were diluted in order to present suitable concentration for measurements. Recovery tests were also performed for sample digests. After each ten measurements, two standard Cu, Mn, and Zn solutions were analyzed to check the slope of calibration curve. In case of a slope difference of higher than 10% the calibration curve was prepared again using all standards. All the samples were prepared in triplicate.

## 2.5 Hematological analysis

Blood stored in EDTA tubes was used to perform the complete blood counts. The erythrocyte count, total leukocytes and hemoglobin concentration were measured in semi-automatic equipment (CELM model CC530). For the determination of hematocrit values, we used capillary tubes, centrifuged for 1 minute at 1400 rpm. At sampling, blood smears were performed and stained with commercial dye (*Panótipo Rápido*) to perform leukocyte differential counts using a light microscope at 1000 x magnification [15], with 100 cells randomly identified per slide. Knowing the number of total leukocytes ( $\mu\text{L}$ ), differential leukocyte (%) was calculated using absolute numbers of neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils. Counts were expressed per microliter ( $\mu\text{L}$ ) of blood.

## 2.6 Analysis of oxidant/antioxidant status

Serum ROS levels were determined by the DCFH oxidation method described by LeBel et al. [26]. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 485 and 538 nm, respectively. A calibration curve was established with standards of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF; 0.1 nM to 1  $\mu\text{M}$ ), and results were expressed as U DCF/mg of protein.

The methodology of lipid peroxidation (LPO) was based on Hermes-Lima et al. [22] with some modifications by the authors, called FOX based on the oxidation of Fe(II) under acidic conditions. The Fox method measures lipid peroxides, one of the principal products of

lipid peroxidation. For LPO measurements,  $\text{FeSO}_4$  (1 mM),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.25 M), xylene orange (1 mM, Sigma) and MilliQ water were sequentially added. Samples or methanol (blanks) were added and incubated for 30 min. Thereafter, absorbance (550 nm) was determined and cumene hydroperoxide (CHP; Sigma) was employed as a standard. LPO was expressed as  $\mu\text{mol CHP/mg protein}$ .

Total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) was determined according to the method described by Amado et al. [2]. This method consists of determining the antioxidant capacity of tissues using a fluorescent substrate (2',7' dichlorofluorescein diacetate - H<sub>2</sub>DCF-DA) and the production of peroxy radicals by thermal decomposition of ABAP (2,2'-azobis 2-methylpropanamide dihydrochloride). The fluorescence was determined using a microplate reader (Spectramax I3), at 37 °C (excitation: 485 nm; emission: 530 nm) with readings at every 5 min over 30 min. The results were expressed as relative area (the difference between the area with and without ABAP divided by the area without ABAP), and levels were expressed as U.F./mg protein.

The activity of superoxide dismutase (SOD) was determined according to the auto-oxidation principle of pyrogallol, inhibited in the presence of SOD. The optical density change was determined kinetically for two minutes at 420 nm, at ten second intervals according to methodology described by Beutler [6]. Activity was expressed as U SOD/mg of protein.

The activity of glutathione peroxidase (GPx) was measured indirectly by monitoring the oxidation rate of NADPH at 340 nm using cumene hydroperoxide ( $\text{CuOOH}$ ), according to Wendel [58]. The enzymatic activity was expressed as U GPx/mg protein.

The protein concentrations in serum were determined by the Coomassie blue method following the methodology described by Read and Northcote [36], using bovine serum albumin as a standard.

## 2.7 Proteinogram

For protein fractionation, polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed, according to a technique described by Fagliari et al. [14] using a mini-gel (10 x 10 cm). The gels were stained with Coomassie blue and photographed to identify and quantify protein fractions using Labimage1D software

(Loccus Biotechnology). Standards containing fractions with molecular weights between 10 and 250 kDa (Kaleidoscope - BIORAD) were used as reference for the identification of protein fractions.

## 2.8. Cytokines

Cytokine quantification (tumor necrosis factor – Alpha - TNF- $\alpha$ , interleukin-1, IL-1 and interferon gamma – IFN $\gamma$ ) was assessed by ELISA using commercial Quantikine immunoassay kits according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96-well microplates were sensitized with primary antibody at room temperature for 30 min; samples were added and incubated for 30 min at 37°C. After washing, secondary antibodies conjugated with peroxidase were added to each well and incubated. The concentration of the cytokines was determined by the intensity of the color measured spectrophotometrically using a microplate reader.

## 2.9 Fecal score and parasitological examination

The occurrence of diarrhea was observed daily following the methodology described by Larson et al. [25], which is based on fecal score and fluidity: (1) normal and solid; (2) pasty but with health aspect; (3) aqueous consistency and (4) fluid consistency. For the determination of parasitological infection, the technique described by Faust et al. [32] was used with subsequent reading by light microscopy. Fecal consistency and parasitic infection were evaluated only to monitor the health of calves, because our goal was to use only healthy calves to evaluate the effect of minerals and vitamins.

## 2.10 Statistical analysis

Data were analyzed using descriptive statistics for contingency of information and for further assumptions that were presented as descriptive (mean and standard deviation) for blood cell parameters: hematocrit, erythrocyte count, hemoglobin, leukocytes, lymphocytes, monocytes and eosinophils. The second set of data were for GPx and SOD activities, followed by biochemical components: ROS, LPO, and ACAP. The third group of parameters measured were proteinogram (total protein, globulin, albumin, ceruloplasmin, and immunoglobulins) and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, and IFN $\gamma$ ). Finally, we took measurements

associated with animal weight: body weight and weight gain. The Chi-square test was used to evaluate fecal score. For each group (CON and TREAT) and day of observation (days 1, 15, 30, and 45), all parameters were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Skewness, kurtosis and homogeneity were evaluated by the Levene test, or log transformation when needed. A t-test was used to analyse all parameters, i.e. between groups (controlling data dependency due to dependence in time). One-way ANOVA was performed using repeated measurements to test for differences in the parameters over time (considering blocks of groups control and treated). Significant difference was set at  $P < 0.05$ . Statistical manipulations were performed using R-language, v 3.1 (R Development Core Team 2012).

### **3. Results**

#### **3.1. Serum mineral concentrations**

On day 1 of the experiment, we did not verify statistical difference between groups; as well as the values of copper, zinc, manganese and selenium were within the reference values (Table 2). Therefore, the calves used in this experiment did not present deficiency of these minerals.

#### **3.2 Growth performance and clinical signs**

There were no significant differences in fecal parameters (color, fluidity, odor or consistency) between groups ( $P = 0.854$ ; data not shown). However, it should be noted that the vast majority (more than 95%) of the animals had feces with scores within the normal range. Feces with aqueous and fluid consistency was not observed. But feces with pasty consistency, but with health aspect, was observed rarely in both groups at approximately 48 h after the withdrawal of milk as feed, lasting 2–3 days. On the day of blood collection, all calves had normal feces. All animals were negative for parasites during the experimental period.

In terms of weight gain no difference was observed between groups; and as expected, over time, the body weight of animals from both groups increased (Table 3). We observed greater body weight gain in TRAT group calves in the final third of the experiment (day 15 - 45; and day 30-45 of experiment) (Table 3).

### 3.2 Hemogram

The results of hematological analyses are showed in Table 4. No difference was observed between groups and over time for erythrocyte numbers, hematocrit and hemoglobin concentrations. A greater number of total leukocytes ( $P = 0.050$ ) was observed in the animals in the treatment group at day 45, as a consequence of the increased neutrophil counts ( $P = 0.023$ ). The number of monocytes was greater in the treated group on days 30 and 45 ( $P = 0.045$  and  $0.037$ , respectively). The number of lymphocytes and eosinophils did not differ between groups (Table 4).

Over time, the number of leukocytes and neutrophils increased only in the treated group ( $P = 0.044$  and  $0.001$ , respectively). The other hemogram variables did not differ over time in either group.

### 3.3 Oxidant and antioxidant status

Oxidative and antioxidant status results are showed in Table 5. The treated group showed lower levels of ROS on days 15, 30 and 45 ( $P = 0.041$ ,  $0.001$  and  $0.001$ , respectively), as well as lower levels of LPO on days 15 and 45 ( $P = 0.050$  and  $0.040$ , respectively). ACAP levels in the treated group had greater values on days 15 and 30 ( $P = 0.001$  and  $0.001$ , respectively). GPx activity was greater on days 15, 30 and 45 in treated group ( $P = 0.001$ ,  $0.001$  and  $0.050$ , respectively), while SOD activity was greater only on day 15 of the experiment ( $P = 0.036$ ). Over time, there was a reduction in ROS levels in the treated group (Table 5). LPO levels were lower in both groups (Table 5). The application of minerals and vitamins generated an increase of ACAP, SOD and GPx over time (Table 5) that did not occur in the control group.

### 3.4 Proteinogram

Total protein levels were greater ( $P = 0.001$ ) in the treated group on day 30, as a consequence of the increase in globulin levels on days 15 and 30 ( $P = 0.020$  and  $0.035$ , respectively; Table 6). Levels of albumin did not differ between groups and over time (Table 6). The proteinogram revealed that globulins were elevated due to increased levels of IgA

(days 15 and 30;  $P = 0.050$  and  $0.044$ , respectively), IgG heavy chain (days 15, 30 and 45; ( $P = 0.031$ ,  $0.001$  and  $0.013$ , respectively) and ceruloplasmin (day 15;  $P = 0.001$ ) (Table 6).

Over time, only animals in the treated group showed an increase in total protein, globulin, IgG heavy chains, IgA and ceruloplasmin levels (Table 6). In control animals, there were no differences over time (Table 6).

### 3.5. Cytokines

Results of cytokine levels are shown in Table 7. In the calves of the treated group, we observed that there were increases in serum TNF- $\alpha$  and IL-1 levels on days 30 ( $P = 0.001$  and  $0.001$ , respectively) and 45 ( $P = 0.001$  and  $0.001$ , respectively) of the experiment, as well as IFN $\gamma$  on day 45 ( $P = 0.027$ ). Over time, only animals in the treated group showed increases in TNF- $\alpha$ , IL-1 and IFN $\gamma$  levels (Table 7)

## 4. Discussion

The application of injectable minerals and vitamins ensures a single dose of known treatment without oscillations, as in voluntary intake models [5]. The components injected are available directly into the bloodstream without encountering antagonism or other interactions [1, 5]. The application of injectable minerals showed beneficial health results for calves in the weaning process [5, 44], as we observed in the present study. Importantly, the calves used in this study were healthy, free of endoparasites, and not trace mineral deficient (blood mineral levels within reference values [24, 34, 54]); therefore, the results discussed below regarding the immune and antioxidant system are due to the nutraceutical effects of minerals and vitamins.

Minerals are fundamental in processes such as growth [46], and vitamin deficiencies are associated with lower growth rates [56]. In the present study, weight gain did not differ between groups at days 1-45 of experiment, possibly as a consequence of the low health challenges faced by calves, as previously described in other studies [39]. However, in the final third of the experiment there was greater body weight gain in the animals of the TRAT group (days 15-30 and days 30-45), when the most critical period in the food transition had passed. Teixeira et al. [50] observed no effect on growth performance in nursing dairy calves, and these authors cited a number of factors may play a role in calf performance attributable

to the major health challenges faced by animals at this stage of life. In a study carried out by our research group, there was a tendency toward greater weight gain in calves during the weaning period (60 days of age) in animals receiving injectable sodium selenite and vitamin A and E during the nursing phase [55]. However, when the authors measured body weight of 210-day-old calves, they found greater weights in the supplemented group [56].

The increase in total leukocytes can be explained by the action of Cu, which stimulates neutrophil and monocyte responses [29] and Zn, a cofactor in more than 300 enzymes including those involved in the synthesis of DNA and RNA, responsible for replication and proliferation of immune cells [4, 39, 46]. The lower lipid peroxidation may also have contributed to increased leukocyte levels [53], because immune cells contain membranes with polyunsaturated fatty acids, and these polyunsaturated fatty acids are sensitive to lipid peroxidation by ROS and other free radicals; reduction in lipid damage may indicate minor damage and relative protection of the cells [47]. Vitamin E protects cell membranes from lipoperoxidation [3], acting in synergy with selenium [31].

Vitamin A acts by neutralizing ROS molecules [45]. The enzymatic antioxidant system is stimulated by the minerals Zn, Cu and Mn, components of SOD enzymes [30] and by selenium, an essential component of the GPx enzyme [55]. This explains the activation of SOD and GPx activity over time, reflecting an increase in total antioxidant capacity (ACAP), as well as lower levels of ROS. Other studies have shown that the application of minerals cause decreases in ROS levels [41], as well as increases in antioxidant enzyme activity in calves [21, 51], cows [28] and lambs [11], corroborating our results.

We observed that the greater serum concentration of total proteins were due to increased globulin levels, the basis of the humoral immune response that guarantees specificity in the action of antibodies [16]. Similar results were observed by Tomasi et al. [51] and Volpato et al. [55] who used minerals or the combination of minerals and vitamins in nursing calves. The increase in globulin levels was caused by elevated levels of IgA and IgG heavy chain, both of which are important to the immune system [33], as well as ceruloplasmin, the main copper-chelating protein in the circulation [40, 44] that prevents copper from participating in ROS-producing reactions [43, 57]. Zinc acts on protein production and formation of disulfide bonds, present in the structure of antibodies [12]. Deficiencies in selenium and copper levels are associated with reduced antibody production

and responses to infections [44, 46] therefore, this additional injectable dose in calves is important because it may have two important roles as an additional or primary supply to overcome basic deficiencies. Increased ceruloplasmin and IgG heavy chains were also observed by Volpato et al. [55], when using a protocol of association of sodium selenite and vitamins A and E. In this study, we observed a significant increase in serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 on days 30 and 45 of experiment, as well as in IFN $\gamma$  on day 45 in animals supplemented with mineral, in disagreement with results reported by Jiao et al. [23]. According to these authors, copper and zinc reduced intestinal levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and TNF- $\alpha$ ) that could be considered an improvement in immune system because of a reduction in pro-inflammatory mediators during the weaning period. Nevertheless, it is important highlight that slow augmentation of IL-1 and TNF- $\alpha$  may be positive responses because these cytokines are involved on control of infectious diseases [18]. As observed in this study, serum levels of IL-1, levels of TNF- $\alpha$  and IFN $\gamma$  showed small increases, possibly indicating control of infectious diseases.

In summary, the dairy calves used in this study had no mineral deficiencies (zinc, copper, selenium and manganese) and remained apparently healthy during the experiment, except for one episode of diarrhea in less than 5% of the calves (both groups), after withdrawal of the milk from the diet. Based on our data, we conclude that complex mineral, as well as vitamins A and E, have nutraceutical effects on nursing dairy calves in the transition period from infancy to weaning, demonstrated by the fact that these supplements increased variables related to immunity and antioxidant status, and possible to beneficial effects to animals as favoring greater post-weaning weight gain.

**Conflict of Interest:**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethics committee**

All procedures this project were approved by the *Comitê de Ética do Uso de Animais na Pesquisa* (CEUA) of the *Universidade do Estado de Santa Catarina*, under the protocol number 6965281117, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA).

### Statement

The authors declare that they have obtained permission (written) from the farmer to use the animals and to carry out the experiment.

### Acknowledgements

We thank CAPES and CNPq for their financial support. Thanks also to the State of Santa Catarina for the UNIEDU grant made available to the lead author. Thanks finally to the Monte Alegre farm for making the animals and facilities available for the study.

### References

1. Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J. L., Castillo, C. (2014). The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 99, 1003-1016.
2. Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407, 2115-2123.
3. Andrieu, S. 2008. Is there a role for organic trace element supplements in transition cow health?. *The Veterinary Journal*. 176, 77-83.
4. Andriquetto, J. M. Perly, L., Minardi, I., Gemael, A., Flemming, J. S., Souza, G. A., Bona Filho, A. (1999). *Nutrição animal*. 3ed. Sao Paulo: Nobel.
5. Arthington, J. D., Moriel, P., Martins, P. G. M. A., Lamb, G. C., Havenga, L. J. (2014). Effects of trace mineral injections on measures of performance and trace mineral status of pre-and postweaned beef calves. *Journal of animal Science*. 92, 2630-2640.
6. Beutler, E. (1984). Superoxide dismutase. In: Beutler E (Editor), *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*.
7. Besser, T. E., Gay, C. C. 1994. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 10, 107-117.
8. Botteon, R. D. C. C. M., Botteon, P. D. T. L., Júnior, J. D. C. B. S., Pinna, M. H., Lóss, Z. G. (2008). Frequência de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo

na região do médio Paraíba Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 45, 153-160.

9. Burke, N. C., Scaglia, G., Boland, H. T., Swecker Jr, W. S. 2009. Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidation, plasma selenium, and on leukocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves. *Veterinary immunology and immunopathology*. 127, 365-370.

10. Campos, O. F., Lizieire, R. S. (2000). Desaleitamento precoce e alimentação de bezerras. *Simpósio sobre manejo e nutrição de gado de leite*. 1-20.

11. Cazarotto, C. J., Boito, J. P., Gebert, R. R., Reis, J. H., Machado, G., Bottari, N. B., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C., Doleski, P. H., Leal, M. L. R., Baldissera, M. D. Da Silva, A. S. (2018). Metaphylactic effect of minerals on immunological and antioxidant responses, weight gain and minimization of coccidiosis of newborn lambs. *Research in Veterinary Science*. 121, 46-52.

12. Charlton, S. J., Ewing, W. N. (2007). *The Minerals Directory*. Context Products Ltd, 5a-5f.

13. Collet, S. G., Demeda, M. A., Taffarel, G. V., Taffarel, L., Girardini, L. K., Nesi, C. N., do Rego Leal, M. L. (2017). Effect of injectable trace mineral supplement and vitamins A and E on production and milk composition of Holstein cows. *Revista de Ciências Agroveterinárias (Journal of Agroveterinary Sciences)*. 16, 463-472.

14. Fagliari, J. J., Santana, A. E., Lucas, F. A., Campos, E., Curi, P. R. 1998. Constituintes sangüíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 50, 253-262.

15. Feldman B.F. (2000) *Schalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams and Wilkins. 5.ed. 1221p.

16. Fernández-Cruz, E., Alecsandru, D., Ramon, S. S. 2009. Mechanisms of action of immune globulin. *Clinical & Experimental Immunology*. 157, 1-2.

17. Filappi, A., Prestes, D., Cecim, M. 2005. Suplementação mineral para bovinos de corte sob pastejo. *Revisão. Veterinária Notícias Veterinary News*, 11, 91-98.

18. Fishman R.H.B. (1996) Slow-release TNF receptor controls inflammatory disease. *The Lancet* 348, 166-167.

19. Flores E.M.M., Saidelles A.P.F., Barin J.S., Mortari S.R., Martins A.F. (2001). Hair sample decomposition using polypropylene vials for determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16, 1419–1423.
20. Grandin, T.; Gallo, C. (2007). Cattle transport. *Livestock handling and transport*. 3: 134-154.
21. Glombowsky, P., da Silva, A. S., Soldá, N. M., Galli, G. M., Biazus, A. H., Campigotto, G., Bottari, N. B., Sousa, R. S., Brisola, M. C., Stefani, L. M., Baldissera, M. D., Leal, M. L. R., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C., Machado. G. (2018). Mineralization in newborn calves contributes to health, improve the antioxidant system and reduces bacterial infections. *Microbial pathogenesis*. 114, 344-349.
22. Hermes-Lima, M., Willmore, W. G., Storey, K. B. (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*. 19, 271-280.
23. Jiao L.F., Zhang Q.H., Wu H., Wang C.C., Cao S.T., Feng G., Hu C.H. (2018). Influences of copper/zinc-loaded montmorillonite on growth performance, mineral retention, intestinal morphology, mucosa antioxidant capacity, and cytokine contents in weaned piglets. *Biological Trace Element Research* 185, 356-363.
24. Jokubauskienė V., Špakauskas V., Matusevičius A., Klimienė I., Ružauskas M., Žilinskaitė M. (2010). Manganese, molybdenum and iron concentration in sera in-calf and milk cows under the influence of different factors. *Veterinarija ir Zootechnika* 50, 71-72.
25. Larson, L. L., Owen, F. G., Albright, J. L., Appleman, R. D., Lamb, R. C., Muller, L. D. (1977). Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *Journal of Dairy Science*: 60, 989-991.
26. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*. 5, 227-231.
27. López-Alarcón, C., Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*. 763, 1-10.
28. Machado, V. S., Oikonomou, G., Lima, S. F., Bicalho, M. L. S., Kacar, C., Foditsch, C., Felipe, M. J., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C. (2014). The effect of injectable trace minerals

(selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. *The Veterinary Journal*. 200, 299-304.

29. Maggini, S., Wintergerst, E. S., Beveridge, S., Hornig, D. 2008. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*. 67 (OCE1).

30. Marklund, S. (1980). Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta physiologica scandinavica. Supplementum*. 492, 19-23.

31. Mehdi, Y., Dufrasne, I. 2016. Selenium in cattle: a review. *Molecules*. 21, 545.

32. Monteiro, S.C. 2010. *Parasitologia na medicina veterinária*. São Paulo: Rocca, 356.

33. Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168, 28– 40.

34. Pavlata L., Podhorsky A., Pechova, A. Chomat P. (2005). Differences in the occurrence of selenium, copper and zinc deficiencies in dairy cows, calves, heifers and bulls. *Veterinarni Medicina – Czech*, 50, 390–400.

35. Persson, T., Popescu, B. O., Cedazo-Minguez, A. 2014. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014.

36. Read, S. M., Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Analytical Biochemistry*. 116, 53-64.

37. Reis, L. G., Melo Andrade Rodrigues Albuquerque, F. H., Dourado Valente, B., Araújo Martins, G., Teodoro, R. L., Dias Ferreira, M. B., Madalena, F. E. (2008). Predição do peso vivo a partir de medidas corporais em animais mestiços Holandês/Gir. *Ciência Rural*. 38, 778-783.

38. Rink L. (2000). Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*. 59, 541-552.

39. Roberts, S. L., May, N. D., Brauer, C. L., Gentry, W. W., Weiss, C. P., Jennings, J. S., Richeson, J. T. 2016. Effect of injectable trace mineral administration on health, performance, and vaccine response of newly received feedlot cattle. *The Professional Animal Scientist*. 32, 842-848.

40. Roeser, H. P., Lee, G. R., Nacht, S., Cartwright, G. E. (1970). The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 49: 2408-2417.
41. Santos, D., Boito J.P., Reis, J. H., Gebert, R.R., da Silva, A.S. (2018-in press). Health benefits of subcutaneous zinc edetate and diphenyl diselenide in calves during the weaning period. *Anais da Academia Brasileira de ciências*.
42. Shankar V (2015) Field characterization by Near Infrared (NIR) mineral identifiers- A New Prospecting Approach. *Procedia Earth and Planetary Science* 11: 198-203.
43. Schneider, C. D., Oliveira, Á. R. D. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 10, 308-313.
44. Sheffy, B. E., Schultz, R. D. (1979). Influence of vitamin E and selenium on immune response mechanisms. In *Federation proceedings*. 38, 2139-2143.
45. Sies H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*. 91, S31-S38.
46. Spears, J. W. (2000). Micronutrients and immune function in cattle. *Proceedings of the nutrition society*. 59, 587-594.
47. Spears, J. W., Weiss, W. P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal*. 176, 70-76.
48. Sundrum, A. (2015). Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. *Animals*. 5, 978-1020.
49. Silva DJ, Queiroz AC (2006). *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Editora UFV. Viçosa. 3.ed. 235p.
50. Teixeira, A. G. V., Lima, F. S., Bicalho, M. L. S., Kussler, A., Lima, S. F., Felipe, M. J., Bicalho, R. C. (2014). Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on immunity, health, and growth of dairy calves. *Journal of dairy Science*. 97, 4216-4226.
51. Tomasi, T., Volpato, A., Pereira, W. A. B., Debastiani, L. H., Bottari, N. B., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C., Leal, M. L. R., Machado, G., Da Silva, A. S. (2018). Metaphylactic effect of minerals on the immune response, biochemical variables and antioxidant status of newborn calves. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 102, 819-824.

52. Van Soest PJ. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. New York: Cornell University Press.
53. Vedovatto, M. (2018). Microminerais injetáveis pós-natal sobre a atividade antioxidante, sistema imunológico, saúde e desempenho de cabritos Boer no período pré-desmame. 143f. (Tese de doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, Brazil.
54. Villard D., Arthur J.R., Gonzalez J.M., Pallares F.J. (2002) Selenium status in cattle: Interpretation of laboratory results. *Bovine Pract.* 36, 73–80.
55. Volpato, A., Da Silva, A. S., Crecencio, R. B., Tomasi, T., Fortuoso, B. F., Ribeiro, M. P., Morsch, V. M. M. (2018). A prophylactic protocol to stimulate the immune response also control infectious disease and, consequently, minimizes diarrhea in newborn heifers. *Microbial pathogenesis.* 121, 262-268.
56. Weiss W. P. (2005). Antioxidants nutrients, cow health and milk quality. In: Dairy Cattle Nutrition Workshop, Department of Dairy and Animal Sciences, Pennsylvania State University. 11-18.
57. Weiss, W. P. (2002). Antioxidant nutrients and milk quality. Department of Animal Sciences. The Ohio State University, Wooster 44691.
58. Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. In *Methods in enzymology.* 77, 325-333.

Table 1: Calf diet during the experimental period, as chemical composition of hay and commercial concentrate used in animal feeding.

<b>Ingredients</b>	Day 1 to 15 of experiment (preweaning)	Day 15 to 30 of experiment (post- weaning)	Day 30 to 45 of experiment (post-weaning)
Milk cow (liter/animal/day)	4.0	0	0
Commercial concentrate* (grams/animal/day)	400	600	800
Hay <sup>#</sup> (grams/animal/day)	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>
<i>Chemical composition, *, #</i>		Hay <sup>#</sup>	Concentrate*
<b>Dry matter (%) in dry matter</b>		95.5	89.0
<b>Mineral (%) in dry matter</b>		7.5	7.3
<b>Crude protein (%) in dry matter</b>		12	16
<b>Ethereal extract (%) in dry matter</b>		1.4	2.8
<b>Neutral detergent fiber (%) in dry matter</b>		61	49.4
<b>Acid detergent fiber (%) in dry matter</b>		36.2	10.8
<i>Mineral composition, *, #</i>			
<b>Cooper (mg/kg)</b>		nd	37.6
<b>Zinc (mg/kg)</b>		nd	136.2
<b>Selenium (mg/kg)</b>		nd	0.85
<b>Manganese (mg/kg)</b>		nd	41.8

Note: not-detected (nd).

\* Commercial concentrated guaranteed levels: calcium (Min/Max) 10–15 g/kg; phosphorus (Min) 5000 mg/kg; zinc (Min) 140 mg/kg; cobalt (Min) 2 mg/kg; copper (Min) 40 mg/kg; sulfur (Min) 2000 mg/kg; iodine (Min) 2 mg/kg; magnesium (Min) 1500 mg/kg; manganese (Min) 40 mg/kg; selenium (Min) 1 mg/kg; sodium (Min) 2000 mg/kg; Fluorine (Min) 100 mg/kg; virginiamycin (Min) 50 mg/kg; Vitamin A (Min) 10,000 IU/kg; Vitamin D3 (Min) 2,000 IU/kg; and Vitamin E (Min) 50 IU/kg.

Table 2. Serum levels of minerals copper, zinc, selenium and manganese in calves of the control and treated groups on days 1 of the experiment (45-day-old animals = 15 days pre-weaning).

Mineral	Control (n =10)	Treated (n =10)	#P-value	*values (min. – max.)
Cooper ( $\mu\text{mol/L}$ )	14.8 $\pm$ 3.9	15.1 $\pm$ 2.8	0.841	2.91 to 19.65
Zinc ( $\mu\text{mol/L}$ )	25.1 $\pm$ 5.4	23.8 $\pm$ 4.7	0.802	5.46 to 36.70
Manganese ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.85 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.07	0.910	0.40 to 1.00
Selenium ( $\mu\text{g/L}$ )	80.4 $\pm$ 7.0	76.0 $\pm$ 10.3	0.751	51.0 to 85.0

# No statistical difference between groups ( $P > 0.05$ )

\*Studies have reported minimum and maximum levels for cattle for minerals: copper and zinc [34], selenium [54], and manganese [24]. Note: Pavlata et al. [34] defined as copper and zinc deficiency in blood serum concentrations of the respective element below 12  $\mu\text{mol/L}$ .

Table 3. Body weight and weight gain of dairy calves that received mineral and vitamin applications (treated group) by the subcutaneous route on days 1 (15 days pre-weaning) and 30 days (15 days post-weaning) of the experiment.

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Control (n =10)</b>	<b>Treated (n =10)</b>	<b>P-value</b>
Body weight (kg)	1	58.6 (8.9) <sup>c</sup>	61.3 (9.4) <sup>c</sup>	<b>0.847</b>
	15	72.3 (15.5) <sup>bc</sup>	72 (13.2) <sup>bc</sup>	<b>0.923</b>
	30	90.4 (17.4) <sup>ab</sup>	91.2 (15) <sup>b</sup>	<b>0.904</b>
	45	108.7 (14) <sup>a</sup>	120.7 (16.7) <sup>a</sup>	<b>0.187</b>
<b>P-value</b>		<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	
Weight gain (kg)	1-15	13.7 (4.6)	10.7 (4.2)	<b>0.845</b>
	1-30	31.8 (8.7)	29.9 (8.1)	<b>0.695</b>
	1-45	50.1 (8.2)	59.4 (7.3)	<b>0.085</b>
	15-30	18.1 (5.3)	19.2 (4.1)	<b>0.745</b>
	15-45	36.4 (8.9)	48.7 (7.0)	<b>0.050*</b>
	30-45	18.5 (4.6)	29.5 (7.6)	<b>0.024*</b>

Note: results presented in mean and standard deviation.  $P \leq 0.05$  (\*) on the same line shows the differences between groups.  $P \leq 0.05$  in the same column shows the differences over time in each group, the differences being represented by different letters.

Table 4. Body weight, weight gain and hemogram of dairy calves that received mineral and vitamin applications (treated group) by the subcutaneous route on days 1 (15 days pre-weaning) and 30 days (15 days post-weaning) of the experiment.

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Control (n =10)</b>	<b>Treated (n =10)</b>	<b>P-value</b>
<b>Erythrocytes (x10<sup>6</sup> µL)</b>	1	4.2 (1.08)	4.6 (0.78)	<b>0.598</b>
	15	4.25 (0.92)	4.12 (0.56)	<b>0.746</b>
	30	5.24 (0.75)	4.52 (0.64)	<b>0.114</b>
	45	4.59 (0.85)	5.34 (0.80)	<b>0.775</b>
<b>P-value</b>		<b>0.285</b>	<b>0.062</b>	
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	1	7.94 (1.27)	9.08 (0.57)	<b>0.201</b>
	15	8.68 (0.72)	9.27 (1.02)	<b>0.463</b>
	30	9.34 (0.83)	8.60 (0.97)	<b>0.495</b>
	45	9.63 (1.17)	9.47 (0.57)	<b>0.802</b>
<b>P-value</b>		<b>0.294</b>	<b>0.376</b>	
<b>Hematocrit (%)</b>	1	32.1 (5.1)	36.4 (3.8)	<b>0.408</b>
	15	32.7 (4.0)	32.9 (5.6)	<b>0.864</b>
	30	37.9 (4.5)	34.3 (4.5)	<b>0.653</b>
	45	36.4 (4.0)	35.8 (3.5)	<b>0.906</b>
<b>P-value</b>		<b>0.571</b>	<b>0.789</b>	
<b>Leukocytes (x10<sup>3</sup> µL)</b>	1	8.35 (1.9)	9.68 (2.2) <sup>ab</sup>	<b>0.569</b>
	15	9.63 (2.0)	8.41 (1.9) <sup>b</sup>	<b>0.528</b>
	30	10.0 (3.1)	9.12 (3.8) <sup>ab</sup>	<b>0.635</b>
	45	9.18 (1.2)	11.6 (1.8) <sup>a</sup>	<b>0.050*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.208</b>	<b>0.044*</b>	
<b>Neutrophils (x10<sup>3</sup> µL)</b>	1	3.95 (1.22)	4.35 (1.4) <sup>a</sup>	<b>0.756</b>
	15	4.81 (1.42)	3.89 (1.50) <sup>b</sup>	<b>0.305</b>
	30	4.42 (1.83)	5.29 (2.51) <sup>ab</sup>	<b>0.652</b>
	45	3.97 (1.30)	6.13 (2.17) <sup>a</sup>	<b>0.023*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.598</b>	<b>0.001*</b>	
<b>Lymphocytes (x10<sup>3</sup> µL)</b>	1	4.03 (0.98)	5.02 (1.73)	<b>0.422</b>

	15	4.48 (1.46)	4.31 (1.43)	<b>0.654</b>
	30	5.41 (1.60)	3.43 (1.30)	<b>0.235</b>
	45	4.79 (1.40)	4.62 (1.12)	<b>0.854</b>
<b>P-value</b>		<b>0.198</b>	<b>0.365</b>	
<b>Monocytes (x10<sup>3</sup> µL)</b>	1	0.25 (0.20)	0.21 (0.24)	<b>0.758</b>
	15	0.14 (0.21)	0.18 (0.19)	<b>0.651</b>
	30	0.08 (0.13)	0.35 (0.12)	<b>0.045*</b>
	45	0.17 (0.11)	0.41 (0.14)	<b>0.037*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.625</b>	<b>0.064</b>	
<b>Eosinophils (x10<sup>3</sup> µL)</b>	1	0.08 (0.11)	0.08 (0.21)	<b>0.901</b>
	15	0.14 (0.14)	0.01 (0.05)	<b>0.352</b>
	30	0.16 (0.08)	0.07 (0.08)	<b>0.436</b>
	45	0.25 (0.23)	0.15 (0.25)	<b>0.621</b>
<b>P-value</b>		<b>0.456</b>	<b>0.652</b>	

Note: results presented in mean and standard deviation.  $P \leq 0.05$  on the same line shows the differences between groups.  $P \leq 0.05$  in the same column shows the differences over time in each group, the differences being represented by different letters.

Table 5. Reactive oxygen species (ROS), lipoperoxidation (LPO), total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) in the serum of dairy calves receiving subcutaneous vitamins and mineral on days 1 (15 days pre-weaning) and 30 (15 days post-weaning) of experiment.

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Control (n = 10)</b>	<b>Treated (n = 10)</b>	<b>P-value</b>
<b>ROS</b> (U DCF/mg of protein)	1	245.0 (163.2)	251.5 (100.0) <sup>a</sup>	<b>0.625</b>
	15	346.1 (201)	163.9 (130.5) <sup>ab</sup>	<b>0.041*</b>
	30	333.9 (115.8)	206.8 (81.3) <sup>ab</sup>	<b>0.001*</b>
	45	293.4 (132.0)	143.1 (67.4) <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.587</b>	<b>0.050*</b>	
<b>LPO</b> ( $\mu$ mol CHP/mg protein)	1	15776.8 (4659) <sup>b</sup>	13422.9 (2680) <sup>b</sup>	<b>0.457</b>
	15	26856.5 (6851) <sup>a</sup>	18356.8 (5461) <sup>ab</sup>	<b>0.050*</b>
	30	24430.0 (2358) <sup>a</sup>	20547.4 (2745) <sup>a</sup>	<b>0.124</b>
	45	3174.5 (458.0) <sup>c</sup>	2406.2 (644.1) <sup>c</sup>	<b>0.040*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>	
<b>ACAP</b> (U.F./mg of protein)	1	1.68 (0.78)	1.11 (0.82) <sup>b</sup>	<b>0.365</b>
	15	2.07 (0.94)	4.13 (1.10) <sup>a</sup>	<b>0.001*</b>
	30	2.23 (0.65)	5.28 (1.19) <sup>a</sup>	<b>0.001*</b>
	45	1.28 (0.8)	2.04 (0.5) <sup>b</sup>	<b>0.072</b>
<b>P-value</b>		<b>0.095</b>	<b>0.001*</b>	
<b>GPx</b> (U GPx/mg of protein)	1	6.9 (1.5)	6.9 (2.3) <sup>c</sup>	<b>0.895</b>
	15	8.15 (1.3)	21.7 (9.4) <sup>a</sup>	<b>0.001*</b>
	30	7.59 (2.0)	12.3 (2.9) <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
	45	6.8 (1.0)	8.6 (0.6) <sup>c</sup>	<b>0.050*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.568</b>	<b>0.001*</b>	
<b>SOD</b>	1	4.2 (0.8)	4.1 (0.3) <sup>b</sup>	<b>0.965</b>

(U SOD/mg of protein)	15	4.1 (0.4)	5.1 (0.5) <sup>a</sup>	<b>0.036*</b>
	30	4.2 (0.4)	4.1 (0.6) <sup>ab</sup>	<b>0.903</b>
	45	4.2 (0.6)	3.7 (0.2) <sup>b</sup>	<b>0.245</b>
<b>P-value</b>		<b>0.812</b>	<b>0.012*</b>	

Note: results presented as mean and standard deviation.  $P \leq 0.05$  on the same line shows the difference between groups.  $P \leq 0.05$  in the same column shows the differences over time in each group, the differences being represented by different letters.

Table 6. Serum proteinogram of dairy calves that received mineral and vitamin applications (treated group) by subcutaneous route on days 1 (15 days pre-weaning) and 30 days (15 days post-weaning) of experiment.

<b>Variable</b>	<b>Day</b>	<b>Control</b> (n = 10)	<b>Treated</b> (n = 10)	<b>P-value</b>
<b>Total protein</b> (g/dL)	1	7.71 (0.92)	7.00 (0.43) <sup>b</sup>	<b>0.365</b>
	15	7.02 (0.52)	7.64 (0.36) <sup>ab</sup>	<b>0.174</b>
	30	6.35 (0.36)	8.00 (0.53) <sup>a</sup>	<b>0.001*</b>
	45	7.09 (1.00)	7.11 (0.45) <sup>b</sup>	<b>0.856</b>
<b>P-value</b>		<b>0.095</b>	<b>0.050*</b>	
<b>Albumin</b> (g/dL)	1	2.83 (1.27)	2.57 (1.04)	<b>0.473</b>
	15	2.77 (0.49)	2.31 (0.37)	<b>0.287</b>
	30	1.97 (0.40)	1.79 (0.65)	<b>0.412</b>
	45	2.38 (0.66)	2.85 (0.87)	<b>0.324</b>
<b>P-value</b>		<b>0.236</b>	<b>0.065</b>	
<b>Globulin</b> (g/dL)	1	4.88 (1.29)	4.43 (0.70) <sup>bc</sup>	<b>0.746</b>
	15	4.25 (0.70)	5.33 (0.65) <sup>ab</sup>	<b>0.020*</b>
	30	4.37 (0.52)	5.99 (0.49) <sup>a</sup>	<b>0.035*</b>
	45	4.77 (0.75)	4.26 (0.61) <sup>c</sup>	<b>0.592</b>
<b>Valor P</b>		<b>0.658</b>	<b>0.003*</b>	
<b>IgG heavy chain</b> (g/dL)	1	1.31 (0.42)	1.10 (0.32) <sup>b</sup>	<b>0.498</b>
	15	1.29 (0.21)	1.86 (0.34) <sup>ab</sup>	<b>0.031*</b>
	30	0.93 (0.09)	1.33 (0.17) <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
	45	1.34 (0.36)	2.10 (0.51) <sup>a</sup>	<b>0.013*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.071</b>	<b>0.001*</b>	
<b>IgA</b> (g/dL)	1	0.48 (0.34)	0.30 (0.05) <sup>b</sup>	<b>0.257</b>
	15	0.43 (0.11)	0.60 (0.12) <sup>a</sup>	<b>0.050*</b>
	30	0.45 (0.10)	0.59 (0.12) <sup>a</sup>	<b>0.044*</b>
	45	0.36 (0.28)	0.36 (0.21) <sup>ab</sup>	<b>0.965</b>
<b>P-value</b>		<b>0.532</b>	<b>0.001*</b>	
<b>Ceruloplasmin</b>	1	0.39 (0.24)	0.41 (0.19) <sup>ab</sup>	<b>0.897</b>

(g/dL)	15	0.20 (0.03)	0.37 (0.11) <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
	30	0.38 (0.15)	0.47 (0.15) <sup>ab</sup>	<b>0.369</b>
	45	0.37 (0.16)	0.70 (0.30) <sup>a</sup>	<b>0.061</b>
<b>P-value</b>		<b>0.374</b>	<b>0.046*</b>	

Note: Results presented as mean and standard deviation.  $P \leq 0.05$  on the same line represents differences between groups.  $P \leq 0.05$  in the same column represents differences over time in each group, the differences being represented by different letters.

**Table 7.** Cytokine (tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 (IL-1)) interferon gamma (IFN $\gamma$ ) levels in serum samples of calves.

<b>Variables</b>	<b>Days</b>	<b>Control (n = 10)</b>	<b>Treated (n = 10)</b>	<b>P-value</b>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	1	124.5 (3.8)	127.1 (3.9) <sup>b</sup>	<b>0.841</b>
	15	129.3 (5.8)	135.9 (7.7) <sup>ab</sup>	<b>0.412</b>
	30	131.9 (4.7)	142.9 (5.3) <sup>a</sup>	<b>0.001*</b>
	45	128.2 (4.9)	149.1 (7.1) <sup>a</sup>	<b>0.001*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.871</b>	<b>0.001</b>	
IL-1 (pg/mL)	1	94.7 (3.9)	99.1 (4.7) <sup>c</sup>	<b>0.695</b>
	15	101.5 (6.6)	108.9 (7.9) <sup>bc</sup>	<b>0.456</b>
	30	98.3 (4.9)	114.4 (6.0) <sup>b</sup>	<b>0.001*</b>
	45	99.1 (9.8)	131.6 (6.7) <sup>a</sup>	<b>0.001*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.841</b>	<b>0.001</b>	
IFN $\gamma$ (pg/mL)	1	74.1 (3.1)	79.1 (3.7) <sup>b</sup>	<b>0.547</b>
	15	80.5 (7.6)	78.7 (4.4) <sup>b</sup>	<b>0.804</b>
	30	81.3 (6.9)	86.4 (5.6) <sup>ab</sup>	<b>0.428</b>
	45	79.1 (4.8)	91.6 (5.2) <sup>a</sup>	<b>0.027*</b>
<b>P-value</b>		<b>0.214</b>	<b>0.001</b>	

Note: Results presented as mean and standard deviation.  $P \leq 0.05$  on the same line represents differences between groups.  $P \leq 0.05$  in the same column represents differences over time in each group, the differences being represented by different letters.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criação de bezerros leiteiros apresenta ainda vários obstáculos a serem superados no dia a dia das fazendas, pois esta categoria por vezes é menosprezada por se tratar de animais improdutivos e em desenvolvimento. Porém sabe-se que este é o início de um processo que resultará nos futuros animais produtivos, os quais são responsáveis pelo retorno financeiro do sistema produtivo, onde sempre se buscam animais com ótimos índices produtivos. Nesse estudo constatamos que o fornecimento de minerais e vitaminas injetáveis mostra-se como uma alternativa que contribui para os bezerros apresentarem melhor status imune e antioxidante na fase do desaleitamento. Portanto, os minerais e vitaminas tiveram um efeito nutracêutico para as bezerras nessa fase de transição, o que favoreceu o ganho de peso no terço final do experimento.

## REFERÊNCIAS

- ABUELO, A et al. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1003-1016, 2014.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- ARTHINGTON, J. D. et al. Effects of trace mineral injections on measures of performance and trace mineral status of pre-and postweaned beef calves. **Journal of animal science**, v. 92, n. 6, p. 2630-2640, 2014.
- ANDRIGUETTO, J. M. et al. Nutrição animal. **São Paulo**, v.1.395. 1999.
- BARREIROS, A. L. B. S et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p 113-123, 2006.
- BESSER, T. E; GAY, C.C. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n. 1, p. 107-117, 1994.
- BEZERRA, B. M. O et al. Impactos do estresse oxidativo na produção intensiva de suínos: desafios e perspectivas. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 4, p. 699-715, 2015.
- BICALHO, M. L. S. et al. Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 7, p. 4281-4295, 2014.
- BOND, G. B. et al. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem-estar de bovinos leiteiros. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, 2012.
- BRODERIUS, M et al. Levels of plasma ceruloplasmin protein are markedly lower following dietary copper deficiency in rodents. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 473-479, 2010.
- CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel CFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CARROLL, J. A; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 105-149, 2007.
- CAZAROTTO, C. J. et al. Metaphylactic effect of minerals on immunological and antioxidant responses, weight gain and minimization of coccidiosis of newborn lambs. **Research in Veterinary Science**, 2018.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **The American journal of clinical nutrition**, v. 66, n. 2, p. 460S-463S, 1997.

CHARLTON, S.; EWING, W. The Minerals Directory. **Context Products Ltd**, Leicestershire, UK, p.150, 2007.

CHEW, B. P. Vitamin A and  $\beta$ -Carotene on Host Defense1. **Journal of dairy science**, v. 70, n. 12, p. 2732-2743, 1987.

CHUCRI, T. M. et al. A review of immune transfer by the placenta. **Journal of reproductive immunology**, v. 87, n. 1-2, p. 14-20, 2010.

COELHO, S. G. Desafios na criação e saúde de bezerros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, 2009.

COLLET, S. G et al. Effect of injectable trace mineral supplement and vitamins A and E on production and milk composition of Holstein cows. **Journal of Agroveterinary Sciences**, v. 16, n. 4, p. 463-472, 2017.

COOKE, R. F. et al. Effects of temperament on physiological, productive, and reproductive responses in *Bos indicus* beef cows. **Journal of animal science**, v. 95, n. 1, p. 1-8, 2017.

CORAH, L. R.; IVES, S. The effects of essential trace minerals on reproduction in beef cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 7, n. 1, p. 41-57, 1991.

DRACKLEY, J. K. Feeding for Accelerated Growth in Dairy Calves. In: **Proceedings of Minnesota Dairy Health Conference, USA**. p. 59-73, 2004.

DRACKLEY, J. K. Calf nutrition from birth to breeding. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 55-86, 2008.

DORTON, K. L. et al. Effects of copper source and concentration on copper status and immune function in growing and finishing steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 110, n. 1-4, p. 31-44, 2003.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, p. 1791-2008, 2009.

DUARTE, T, L.; JONES, G. Vitamin C modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage and iron homeostasis in human cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 8, p. 1165-1175, 2007.

EICHER, S. D. et al. Leukocyte Functions of Young Dairy Calves Fed Milk Replacers Supplemented with Vitamins A and E1. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 5, p. 1399-1407, 1994.

EMBRAPA. INDICADORES: LEITE E DERIVADOS, v. 9, n. 79, 2018.

ENCARNAÇÃO, R. de O. Estresse e produção animal. **Embrapa Gado de Corte-Documentos**, 1986.

EDMONSON, A. J. et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 72, n. 1, p. 68-78, 1989.

EPAGRI. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2016-2017. **Epagri-cepa**, v. 1, 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome, 2013.

FALOWO, A. B et al. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171-181, 2014.

FOX, P. L. The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. **Biometals**, v. 16, n. 1, p. 9-40, 2003.

GRAHAM, Thomas W. Trace element deficiencies in cattle. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v. 7, n. 1, p. 153-215, 1991.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19-39, 2008.

GREGORY, N. G; GRANDIN, T. **Animal welfare and meat science**. CABI, 1998.

HOGAN, J. S. et al. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2795-2803, 1993.

HURLEY, W. L. Lactation Biology. Minerals and Vitamins. **Urbana, Illinois USA**, 1997.

HURLEY, W. L; DOANE R. M. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 72 p. 784-804, 1989.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Indicadores da Pecuária. 2016.

JANEWAY, C. A. et al. Immunobiology: the immune system in health and disease. 2005.

KRISHNAMOORTHY, U. et al. Rearing young ruminants on milk replacers and starter feeds. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2012.

KRUSE-JARRES, J. D. The significance of zinc for humoral and cellular immunity. **Journal of trace elements and electrolytes in health and disease**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 1989.

LARSON, B. L. et al. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 4, p. 665-671, 1980.

LYKKESFELDT, J; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 3, p. 502-511, 2007.

LOPES, M. A. et al. Influência de diferentes índices zootécnicos na composição e evolução de rebanhos bovinos leiteiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 446-453, 2009.

MACHADO, V. S. et al. The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 299-304, 2014.

MACHADO, R. N. et al. Levantamento do manejo de bovinos leiteiros recém-nascidos: desempenho e aquisição de proteção passiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2323-2329, 2004.

MAGGINI, S. et al. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 1, p. 3-5, 2008.

MARKLUND, St. Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, v. 492, p. 19-23, 1980.

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

MCDOWELL, L. R. et al. Vitamin E supplementation for the ruminant. **Animal Feed Science and Technology**, v. 60, n. 3-4, p. 273-296, 1996.

MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY JR, Charles. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MEE, J. F et al. Prevalence of, and risk factors associated with, perinatal calf mortality in pasture-based Holstein-Friesian cows. **Animal**, v. 2, n. 4, p. 613-620, 2008.

MEYDANI, S. N. et al. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1462-1476, 1995.

MOEINI, M. M. et al. Effect of prepartum supplementation of selenium and vitamin E on serum Se, IgG concentrations and colostrum of heifers and on hematology, passive immunity and Se status of their offspring. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1-3, p. 529-537, 2011.

NAHMS. National Animal Health Monitoring System Dairy 2007. Part 1:Reference of Dairy Health and Management in the United States. **USDA-APHIS Veterinary Services**, 2007.

NORDBERG, J; ARNER, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

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

NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Nutrient requirements of dairy cattle. **National Academies Press**, n. 3, 2001.

NIEDERMAYER, E. K. et al. The effects of injectable trace minerals on growth performance and mineral status of Angus beef steers raised in a natural feedlot program. **The Professional Animal Scientist**, v. 33, n. 2, p. 186-193, 2017.

OMUR, A. et al. Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during transition period. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 4, p. 697-706, 2016.

ONU - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Apesar de baixa fertilidade, mundo terá 9,8 bilhões de pessoas em 2050. 2017. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/apesar-de-baixa-fertilidade-mundo-tera-98-bilhoes-de-pessoas-em-2050/>>. Acesso em: 10 mar. de 2018.

OVERTON, T. R; YASUI, T. Practical applications of trace minerals for dairy cattle. **Journal Animal Science**, v. 92, p. 416-426. 2014.

PARANHOS, M. J. R. C; CROMBERG. V. U. Comportamento Materno em Mamíferos, **Sociedade Brasileira de Etlogia**, v.1, 272p: 215-236, 1998.

PASCHOAL, J. J. et al. Contagem de células somáticas no leite de vacas suplementadas no pré-parto com selênio e vitamina E. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, 2006.

PEDREIRA, M. S; BERCHIELLI, T. T. Minerais. In: Berchielli, Telma Teresinha; Pires, Alexandre Vaz; Oliveira, Simone Gisele de. **Nutrição de ruminantes**, 2. ed. Cap 12 Piracicaba: Funep, 2011.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POULSEN, Keith P. et al. Comparison of passive transfer of immunity in neonatal dairy calves fed colostrum or bovine serum-based colostrum replacement and colostrum supplement products. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 237, n. 8, p. 949-954, 2010.

RINK, L. Zinc and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 4, p. 541-552, 2000.

ROTRUCK, J. T et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, n. 4073, p. 588-590, 1973.

ROY, J.H.B. The calf. 5.ed. **Butterworths**, v.1, 258p, 1990.

SANTOS, D. S. et al. Health benefits of subcutaneous zinc edetate and diphenyl diselenide in calves during the weaning period. ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS, 2018. (Aceito para publicação).

SANTOS, G. T. et al. Importância do manejo e considerações econômicas na criação de bezerras e novilhas. **NUPEL**, p. 239-267, 2002.

SANTOS, G. T; DAMASCENO, J. C. Nutrição e alimentação de bezerras e novilhas. In: Iran Borges de Oliveira; Lúcio Gonçalves. Nutrição de Gado de Leite. **Escola de Veterinária da UFMG**, v. 1, p. 39-64, 1999.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHNEIDER, C. D., OLIVEIRA, A. R de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

SHARMA M C. et al. Therapeutic management of copper deficiency in buffalo heifers: Impact on immune function. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p. 49-63, 2007.

SHEFFY, B. E; SCHULTZ, R. D. Influence of vitamin E and selenium on immune response mechanisms. **Federation Proceedings**, v. 38. n. 7, p. 2139-2143, 1979.

SEJRSEN, K. Mammary development and milk yield potential. In: Mammary development and milk yield potential. **Garnsworthy**, p. 237-251, 2005.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 31-38, 1991.

SILVA, L. C. M. Avaliação dos benefícios da adoção de boas práticas de manejo no bem-estar de bezerros leiteiros. 2015. Tese (Doutorado em zootecnia) - **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo**, 2015.

SMITH, K. L. et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of symptoms. **Journal of Dairy Science**. v. 67, n. 6. p.1293–1300. 1984.

SPEARS, J. W. Micronutrients and immune function in cattle. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 04, p. 587-594, 2000.

SORDILLO, Lorraine M.; AITKEN, Stacey L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 104-109, 2009.

SOUZA, F. M. Manejo alimentar do nascimento ao desaleitamento de fêmeas bovinas leiteiras. **Escola de Veterinária e Zootecnia -Universidade Federal de Goiás**, 2011.

TEIXEIRA, A. G. V. et al. Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on immunity, health, and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4216-4226, 2014.

TOMASI, T. et al. Metaphylactic effect of minerals on the immune response, biochemical variables and antioxidant status of newborn calves. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. V 102, n. 4, p. 819-824. 2018.

UNDERWOOD, E. J. The mineral nutrition of livestock. **Cabi**, 1999.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VAN DER VLIET, A; JANSSEN-HEININGER, Y. M. W. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger?. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 3, p. 427-435, 2014.

VAN SAUN, R. J. et al. Rational approach to selenium supplementation essential. **Feedstuffs**, v. 62, n. 3, p. 15-17, 1990.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEDOVATTO, M; FRANCO, G. L. F. Microminerais Injetáveis para Caprinos e Bovinos de Corte. 2018. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, 2018.

VILELA, R. et al. Pecuária de leite no Brasil: Cenários e avanços tecnológicos. **Embrapa**, 435p, 2016.

VINHOLIS, M. de et al. Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais de tecnologias da Embrapa Pecuária Sudeste. Casinha tropical: abrigo móvel individual para bezerras. **Embrapa**, 27p, 2006.

VOLPATO, Andreia et al. A prophylactic protocol to stimulate the immune response also control infectious disease and, consequently, minimizes diarrhea in newborn heifers. **Microbial pathogenesis**, v. 121, p. 262-268. 2018.

WEISS, W. P. Antioxidant nutrients, cow health, and milk quality. **Dairy Cattle Nutrition Workshop, Department of Dairy and Animal Sciences, Penn State**. p. 11-18, 2005.

WEISS, W. P. Antioxidant nutrients and milk quality. **Ohio Agricultural Research and Development Center The Ohio State University**. 2002.

WEISS, W. P. et al. Effect of Vitamin E Supplementation in Diets with a Low Concentration of Selenium on Mammary Gland Health of Dairy Cows<sup>1</sup>. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1728-1737, 1997.

WEISS, W. P. et al. Relationships Among Selenium, Vitamin E, and Mammary Gland Health in Commercial Dairy Herds<sup>1</sup>. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 2, p. 381-390, 1990.

WINDEYER, M. C. et al. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive veterinary medicine**, v. 113, n. 2, p. 231-240, 2014.

WISEMAN, H; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v. 313, n.1, p. 17-29, 1996.

WITWER, F. ESTRESSE OXIDATIVO E SELÊNIO EM BOVINOS. **Instituto de Ciencias Veterinarias Universidad Austral de Chile**. 1998.

WU, L et al. Critical thresholds of antioxidant and immune function parameters for Se deficiency prediction in dairy cows. **Biological Trace Element Research**, v. 172, n. 2, p. 320-325, 2016.

## ANEXOS



**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Suplementação vitamínica e mineral no período de transição de lactante para não lactante de bezerras leiteiras sobre o desempenho, resposta imune e antioxidante", protocolada sob o CEUA nº 6965281117 (00 000505), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 13/12/2017.

We certify that the proposal "Vitamin and mineral supplementation in the transition period from infant to non-lactating dairy heifers on performance, immune response and antioxidant", utilizing 50 Bovines (50 females), protocol number CEUA 6965281117 (00 000505), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6.899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 12/13/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [01/2018](#) a [12/2018](#) Área: [Zootecnia](#)

Origem:	<a href="#">Animais de proprietários</a>		
Espécie:	<a href="#">Bovinos</a>	sexo:	<a href="#">Fêmeas</a>
Linhagem:	<a href="#">Holandês</a>	idade:	<a href="#">45 a 315 dias</a>
		N:	<a href="#">50</a>
		Peso:	<a href="#">50 a 240 kg</a>

Local do experimento: O estudo será desenvolvido em uma fazenda localizada na região Oeste de Santa Catarina onde serão utilizadas 50 bezerras da raça holandesa, com aproximadamente 45

Lages, 11 de novembro de 2018

Marcia Regina Pfuetszenreiter  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina