

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA– PPGZOO**

MATHEUS HILLIARD FARRET

CROMO NA ALIMENTAÇÃO DE CÃES

CHAPECÓ

2022

MATHEUS HILLIARD FARRET

CROMO NA ALIMENTAÇÃO DE CÃES

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

CHAPECÓ

2022

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

Farret, Matheus

Cromo na alimentação de cães / Matheus Farret. -- 2022.
64 p.

Orientador: Aleksandro da Silva

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2022.

1. Animais de companhia. 2. Antioxidante sintético. 3.
Cromo orgânico. 4. Nutrição animal. 5. Saúde animal. I. Silva,
Aleksandro da. II. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

MATHEUS HILLIARD FARRET

CROMO NA ALIMENTAÇÃO DE CÃES

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

BANCA EXAMINADORA

Membros:



Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva
Universidade do Estado de Santa Catarina



Dr. Tiago Goulart Petrolli
UNOESC – Campus Xanxexê



Dr. Diovani Paiano
Universidade do Estado de Santa Catarina

Chapecó, 22 de abril de 2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Geraldine e Felix, que nunca mediram esforços para apoiar-me em meus caminhos. Sou grato à minha família pelo apoio que sempre deram durante toda a minha vida.

Sou grato à minha companheira de vida, Janaína. Com certeza, muitos dos resultados que alcancei, devo a ela. Agradeço também todo o apoio dado por ela e pelo Pedro nesses últimos anos.

Agradeço ao meu orientador Aleksandro, por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa, e que além de mentor é um grande amigo.

A todos os meus professores do curso de Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – Udesc.

E agradeço por ter saúde após este período tão turbulento em que vivemos com a pandemia de COVID-19.

“Cada sonho que você deixa para trás, é
um pedaço do futuro que deixa de existir”
– Steve Jobs.

RESUMO

Atualmente a preocupação com a alimentação de qualidade, que atenda às necessidades nutricionais dos animais de companhia, impulsiona o mercado de aditivos oriundos de fontes naturais. Estudos recentes nos levam a crer que o aumento nos quadros de processos alérgicos, nefropatias, baixa absorção de vitaminas e aumento de casos de doenças metabólicas em cães estejam relacionados ao baixo consumo de cromo nas formulações na indústria de rações. A utilização de antioxidantes naturais como o cromo é uma alternativa que além de manter as características organolépticas do produto na prateleira, traz benefícios ao metabolismo animal. Diversas fontes de cromo podem ser encontradas, inorgânica (acetato de cromo, cloreto de cromo, óxido de cromo e sulfato de cromo) e orgânica (complexo organometálico de glutathione, nicotínico e cromo), que juntos formam o composto que possui o fator de tolerância à glicose (GTF). O GTF serve como catalisador para a ação da insulina na célula, uma vez que facilita a interação desta com os receptores das células dos tecidos, melhorando o aproveitamento da glicose. Visto isso, podemos afirmar que o cromo é um elemento essencial no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Não há recomendações quanto ao limite de ingestão diário para cães. Sendo assim, o estudo tem por objetivo verificar se a ingestão do cromo vai estimular a resposta imune e antioxidante em cães, produzindo um efeito benéfico na saúde desses animais. Neste estudo foram utilizados 10 beagles divididos em 2 tratamentos: cromo (ingestão de 389 mg de cromo/cão/dia; TCHR) e outro grupo composto por cães consumindo uma dieta basal (TCON - sem cromo). O experimento teve dois períodos de 28 dias, com intervalo de 15 dias entre eles; ou seja, os cães que estavam no grupo TCON no primeiro período necessariamente estavam no grupo TCHR no segundo período (todos os cães foram submetidos a todos os tratamentos). No hemograma, verificou-se maior contagem de leucócitos totais devido ao aumento do número de linfócitos quando os cães consumiram cromo. Da mesma forma, uma maior concentração de proteína total ocorreu devido ao aumento das globulinas quando os cães consumiram cromo. A concentração de ureia no soro dos cães que ingeriram cromo foi menor em relação ao controle. A atividade da catalase e a concentração de tióis proteico foram maiores no sangue de cães que consumiram cromo; animais que apresentaram menor peroxidação lipídica (TBARS) em relação ao controle. Uma menor concentração de

espécies reativas de oxigênio foi observada no dia 28 em cães do grupo TCHR. O consumo de cromo pelos cães aumentou os níveis de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) e de proteína C-reativa no soro. Assim, concluímos que a inclusão de cromo na ração canina tem efeitos benéficos na saúde animal, com foco na estimulação da resposta imune e antioxidante.

Palavras-chave: Animais de companhia; Antioxidante sintético; Cromo orgânico; Nutrição animal; Saúde animal.

ABSTRACT

Currently, the concern with quality feed, which meets the nutritional needs of companion animals, drives the market for additives from natural sources. Recent studies lead us to believe that the increase in cases of allergic processes, nephropathies, low absorption of vitamins and increase in cases of metabolic diseases in dogs are related to the low consumption of chromium in formulations in the feed industry. The use of natural antioxidants such as chromium is an alternative that, in addition to maintaining the organoleptic characteristics of the product on the shelf, brings benefits to animal metabolism. Several sources of chromium can be found, inorganic (chromium acetate, chromium chloride, chromium oxide and chromium sulfate) and organic (organometallic glutathione, nicotinic and chromium complex), which together form the compound that has the tolerance factor to glucose (GTF). GTF serves as a catalyst for the action of insulin in the cell, as it facilitates its interaction with tissue cell receptors, improving glucose utilization. However, in the absence of available chrome, the GTF cannot perform its functions. Given this, we can say that chromium is an essential element in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. There are no recommendations regarding the daily intake limit for dogs. Therefore, the study aims to verify if the ingestion of chromium will stimulate the immune and antioxidant response in dogs, producing a beneficial effect on the health of these animals. In this study, 10 beagles were divided into 2 treatments: chromium (intake of 389 mg of chromium/dog/day; TCHR) and another group composed of dogs consuming a basal diet (TCON - without chromium). The experiment had two periods of 28 days, with an interval of 15 days between them; that is, dogs that were in the TCON group in the first period were necessarily in the TCHR group in the second period (all dogs underwent all treatments). In the hemogram, there was a higher total leukocyte count due to the increase in the number of lymphocytes when the dogs consumed chromium. Likewise, a higher concentration of total protein was due to the increase in globulins when the dogs consumed chromium. The concentration of urea in the serum of the dogs that ingested chromium was lower in relation to the control. Catalase activity and protein thiol concentration were higher in the blood of dogs that consumed chromium; animals that showed lower lipid peroxidation (TBARS) in relation to the control. A lower concentration of reactive oxygen species was observed on day 28 in dogs in the TCHR group. The consumption of chromium by the dogs increased

the levels of cytokines (TNF- α , IFN- γ and IL-10) and of C-reactive protein in the serum. Thus, we conclude that the inclusion of chromium in dog feed has beneficial effects on animal health, focusing on stimulating the immune and antioxidant response.

Keywords: Animal health; Animal nutrition; Companion animals; Natural antioxidant; Organic chromium;

LISTA DE TABELAS

<i>Table 1 - Ingredient and nutritional composition of the diet used</i>	45
Tabela 2 - Body weight of beagle dogs receiving experimental diets.....	46
Tabela 3 - Complete blood counts of beagle dogs receiving experimental diets.....	47
Tabela 4 - Serum biochemistry of Beagle dogs receiving experimental diets	48
Tabela 5 - Antioxidant/oxidant responses of beagle dogs receiving experimental diets	49
Tabela 6 - Cytokines levels and C-reactive protein (CRP) of beagles dogs receiving experimental diets.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAFCO	Association of American Feed Control Officials
CrCl ₃	Cloreto de cromo
Cr	Cromo
Cr-III	Cromo trivalente
Cr ³⁺	Cromo trivalente
CrSP	Cromo quelado com pequenos peptídeos
Cr-VI	Cromo hexavalente
CrNic	Cromo nicotinato
CrPic	Cromo picolinato
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GTF	Fator de tolerância à glicose
Min.	Mínimo
NRC	National Research Council
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
Udesc	Universidade do Estado de Santa Catarina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - cromo picolinato III	24
Figura 2 - Exemplos de fontes de cromo utilizadas na nutrição animal.....	25
Figura 3 - Ação proposta do cromo na ação da insulina (adaptado de Gomes et al 2005)	26
Figura 4 - NUTRICOL® flowchart of feed production.	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	RELAÇÃO HOMEM E CÃO: REFLEXOS SOBRE À ALIMENTAÇÃO	18
2.2	INGREDIENTES E NUTRIENTES NA ALIMENTAÇÃO	19
2.3	RAÇÃO COMERCIAL PARA PETS	20
2.4	CROMO.....	22
2.4.1	Origem e fontes	22
2.4.2	Absorção e interação do cromo com o organismo	23
2.4.3	Atualidades sobre suplementação com cromo	27
3	ARTIGO: ADDITION OF ORGANIC CHROMIUM IN DOG'S FEED.....	29
3.1	INTRODUCTION	30
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	32
3.2.1	Feed production	32
3.2.2	Chemical composition of the feed	33
3.2.3	Animals and experimental design.....	33
3.2.4	Sampling	34
3.2.5	Hemogram.....	34
3.2.6	Serum biochemistry	35
3.2.7	Oxidant/antioxidant status	35
3.2.7.1	<i>Reactive oxygen species (ROS) in serum</i>	35
3.2.7.2	<i>Protein thiols (PSH) in serum</i>	35
3.2.7.3	<i>Glutathione S-transferase (GST) activity in serum</i>	35
3.2.7.4	<i>TBARS levels in serum.....</i>	36
3.2.7.5	<i>Catalase and superoxide dismutase activities in blood</i>	36
3.2.7.6	<i>C-reactive protein (CRP)</i>	36
3.2.7.7	<i>Cytokines levels.....</i>	36
3.2.8	Statistical analysis	37
3.3	RESULTS.....	37
3.3.1	Chemical composition of feed.....	37
3.3.2	Body weight	38
3.3.3	Hematological analysis	38
3.3.4	Serum biochemical analysis.....	38

3.3.5	Oxidant and antioxidant status	38
3.3.6	Cytokines and CRP	39
3.4	DISCUSSION	39
3.5	CONCLUSION.....	44
3.6	ETHICS COMMITTEE.....	44
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	61

1 INTRODUÇÃO

A produção de ração industrializada para animais de estimação aumentou significativamente nos últimos anos, impulsionada pelo crescimento da população desses animais e pelo consumo progressivo desse produto. O Brasil é o segundo país do mundo em receita no setor de ração pet e em número de cães e gatos, atrás apenas dos Estados Unidos (ABINPET, 2019). As rações comerciais para animais de estimação são formuladas com o objetivo de atender às demandas específicas de nutrientes para atender os diferentes estados fisiológicos de cães e gatos, como filhotes, crescimento e manutenção, segundo a *Association of American Feed Control Officials - AAFCO* (França et al., 2011). A ração seca é a mais econômica entre outros tipos de ração para cães (Case et al., 2000). A alimentação dos animais de estimação é um princípio básico de manejo na criação desses animais e tem grande influência na expansão da produção de alimentos industrializados (Carvalho et al., 2010).

De acordo com Carvalho et al. (2010), além das necessidades nutricionais inerentes a cada estado fisiológico, a pesquisa nutricional abrange áreas como longevidade, gerontologia, imunidade, beleza da pele e dos cabelos, função digestiva, saúde bucal e prevenção de doenças degenerativas, incluindo o manejo nutricional de diversas condições fisiopatológicas como urolitíase, nefropatias, artropatias, endocrinopatias, obesidade, distúrbios gastrointestinais, alergias, entre outras. Avanços nas pesquisas em nutrigenômica demonstram a ação da composição dos alimentos e aditivos em marcadores genéticos ligados a doenças, como o câncer, por exemplo. A indústria de rações para cães e gatos respondeu aos anseios dos tutores, oferecendo uma ampla gama de produtos que não só atendem às necessidades nutricionais, mas são projetados para atender um estilo de vida e/ou fase da vida do animal, bem como melhorar as condições associadas à doença e deficiência crônica (Rocha, 2008).

A maioria dos radicais livres é produzida como resultado dos diferentes processos metabólicos normais do corpo. O animal possui um elaborado e complexo sistema de defesa antioxidante para lidar com ataques tão violentos desses radicais livres. No entanto, são crescentes as evidências indicando os benefícios da adição de antioxidantes às dietas para sustentar o próprio sistema de produção do organismo, e sabemos que à adição de mais de um antioxidante

terá um efeito sinérgico no combate aos radicais livres produzidos no organismo (Rocha, 2008). De acordo com a Lei 6.198 (Brasil, 1974), aditivo é qualquer substância adicionada intencionalmente à ração, com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades químicas, desde que não altere seu valor nutricional. Antioxidantes são aditivos utilizados na alimentação animal com a função de garantir a conservação de gorduras animais e vegetais, vitaminas e outros ingredientes sujeitos à oxidação. Além disso, devem ser utilizados em baixas concentrações, ser seguros para o consumo humano e de animais domésticos e economicamente viáveis.

A utilização de aditivos naturais e minerais na indústria de rações para cães e gatos é uma alternativa que visa trazer benefícios à saúde desses animais, pois possui propriedades antioxidantes e estimulantes do sistema imunológico e metabólico nos ingredientes componentes da ração, o que pode melhorar a resposta imune dos animais e reduzir os impactos dos radicais livres no organismo do animal. O fator de tolerância à glicose (GTF) é um exemplo da importância do cromo na dieta dos animais, pois o cromo auxilia na formação desse fator que serve como catalisador da ação da insulina na célula, pois facilita sua interação com os receptores das células teciduais, melhorando a utilização da glicose.

Diante disso, podemos dizer que o cromo é reconhecido como um oligoelemento, essencial no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Não há recomendações quanto ao limite de ingestão para caninos e, ainda assim, há poucos estudos sobre o efeito da suplementação de cromo na dieta de cães. A indústria de rações para cães e gatos mostra interesse na busca de substâncias naturais com potencial antioxidante para substituir os produtos sintéticos; estes podem gerar efeitos colaterais, como alergia e possíveis ações que promovam doenças degenerativas, como tem sido observado em estudos com animais de laboratório.

O cromo utilizado no experimento foi o KEMTRACETM CHROME (KEMIN®), recomendado para várias espécies animais. Sua composição básica consiste em propionato de cromo, ácido propiônico, formato de cálcio, carbonato de cálcio, propilenoglicol, óleo mineral; com níveis de garantia por kg de produto: cromo (min.) 4.000 mg/kg. O cromo orgânico foi utilizado com a intenção de que

a adição de antioxidantes na ração para cães demonstrasse efeitos positivos, tanto na melhora da resposta imune dos animais, como nas propriedades medicinais e seus efeitos na saúde dos cães (Pereira, 2021). Os efeitos regeneradores das células, com o uso do cromo, proporcionam aos animais uma melhor qualidade de vida, maior longevidade e um melhor resultado na resposta imune frente aos desafios diários.

Em virtude disso, o objetivo foi verificar se a adição de cromo na dieta de cães terá efeitos positivos na resposta imunológica e antioxidante, assim como na regulação do metabolismo e produção de células sanguíneas. Com isso um dos objetivos foi produzir um lote de ração comercial para cães, utilizando cromo como aditivo, bem como determinar se há o efeito positivo no consumo de ração com adição de cromo com relação ao metabolismo proteico, lipídico e de carboidrato sérico em cães. Em cima disso objetivamos analisar se o consumo de ração contendo cromo na dieta reduzirá as reações oxidativas, estimulando os níveis de antioxidantes de cães e se a adição de cromo na ração quando consumida pelos cães influenciará no hemograma e resposta imunológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RELAÇÃO HOMEM E CÃO: REFLEXOS SOBRE A ALIMENTAÇÃO

Com a domesticação, os cães foram afastados da alimentação estritamente carnívora que vinha de seus ancestrais selvagens e passaram a ter uma alimentação fornecida pelo homem. Até o século XIX, os cães de caça e de pastoreio (regiões pobres) eram alimentados com pão de diversos cereais, laticínios e miúdos de carne fornecidos apenas quando estavam muito fracos ou doentes, e possuíam expectativa de vida curta (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006). Conforme houve uma elevação do nível das sociedades, a carne passou a ser incorporada na alimentação dos cães substituindo os cereais. A partir do século XIX, a carne passou a ser considerada a panaceia nutricional do cão, passando a ser considerado pelo homem como um carnívoro exclusivo, mudando inclusive a condição dele nesse período e saindo do papel funcional para um mais social e sendo integrado como membro da família (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006). Desde então, as famílias começaram a alimentar os cães com fórmulas caseiras, até que em 1860 foi produzida a primeira ração comercial criada por James Spratt.

A ração formulada era uma ração granulada seca conhecida como “bolo para cães” (CASE et al., 2000; COWELL et al., 2000). No início do século XX, devido ao sucesso de Spratt, outras fórmulas surgiram e começaram a ser comercializadas como os biscoitos Milk-Bone de Bennett (COWELL et al., 2000). Com o tempo, surgiram as rações enlatadas que se tornaram mais populares que as secas. A comercialização na época se dava em lojas de alimentos humanos e mercearias, mesmo sendo discutida a questão higiênica, já que eram feitas de subprodutos. No entanto, a conveniência e praticidade superaram as preocupações e devido essa facilidade na comercialização houve um aumento na venda e na popularidade das rações para animais de estimação (CASE et al., 2000; WORTINGER, 2009). Naquela época, pouco se sabia sobre as exigências nutricionais de cães e gatos, e muitas rações eram feitas da mesma forma, só mudando o rótulo. Durante os anos 1990 a *Association of American Feed Control Officials* (AAFCO) foi criada e desenvolveu os perfis de nutrientes para serem utilizados na formulação de rações de cães e gatos (WORTINGER, 2009), sendo

que, anteriormente, eram utilizadas as recomendações do National Research Council (NRC, 2006) que se baseavam em alimentos purificados e consideraram 100% de disponibilidade de seus nutrientes, além de considerar apenas uma fase da vida (WORTINGER, 2009).

2.2 INGREDIENTES E NUTRIENTES NA ALIMENTAÇÃO

As exigências nutricionais de um cão não se resumem ao fornecimento de carne, ele precisa muito mais do que isso na sua alimentação. As principais necessidades são proteína usadas para a síntese dos ossos, músculos, formação do corpo, estruturas nervosas, entre outros. Destacamos a importância de outros nutrientes na obtenção de energia como carboidratos e gorduras, estas últimas são também necessárias para a saúde da pele e pelos. Ademais, as vitaminas e minerais são necessárias para reações químicas que ocorrem no organismo, e as fibras para manutenção das funções intestinais, assim como mais é essencial animal estar hidratado, uma vez que a água é essencial para a grande maioria das funções no corpo (TAYLOR, 2006).

Os alimentos possuem diversos grupos de moléculas: glicídios, protídeos, lipídeos, vitaminas lipossolúveis, vitaminas hidrossolúveis, macrominerais, microminerais e fatores antinutricionais (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006). Para ocorrer a digestão, o organismo usa diferentes mecanismos e processos enzimáticos no trato digestório (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006), pois seu estômago é grande quando comparado ao intestino, visto seu hábito alimentar carnívoro, e, portanto, ao alimentar-se, seu estômago pode aumentar de tamanho e ocupar até metade da cavidade abdominal, órgão onde ocorre a digestão mecânica e química ao mesmo tempo (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006). O intestino do cão é como em todas as espécies, rico em microbiota, composta por microrganismos que realizam a digestão, porém é uma biota extremamente sensível às variações de alimentos. Em consequência disso, os cães não devem mudar diariamente sua alimentação, pois pode ocorrer uma destruição da biota resultando em diarreia. Por isso, é necessária uma transição alimentar de oito dias quando se troca ou altera a alimentação (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006).

O intestino é o local onde ocorre a maior parte da digestão mecânica e da absorção de nutrientes, através da contração das camadas musculares que possuem diversas dobras e vão continuar misturando o alimento, aumentando a exposição das partículas à superfície do intestino (CASE et al., 2000; GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006). A absorção dos aminoácidos de forma complexa ocorre pelas células do intestino, outras formas podem ocorrer na “luz intestinal como os peptídeos (cadeias +/- longas de aminoácidos), já as mais curtas podem ser absorvidas por sistema ativo (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006). Os glicídios e os lipídeos são absorvidos pelas células intestinais; onde os glicídios na forma de oses que são encontradas nos vasos sanguíneos e maior número no intestino delgado. Já os lipídeos em diferentes constituintes das micelas, remanejados para produzir triglicerídeos que serão fixados por proteínas e outras moléculas nos vasos linfáticos do intestino delgado (GRANDJEAN & VAISSAIRE, 2006).

Os cães adultos possuem uma exigência relativamente pequena comparadas as fases reprodutivas (BUFFINGTON et al., 2004). A maioria dos cães não necessitam de uma variedade de alimentos, mas uma alimentação com ração balanceada e água a vontade (CASE et al., 2000). Uma recomendação importante é realizar a pesagem dos cães com certa regularidade, a fim de ajustar o consumo do animal de acordo com exigência, além de observar à aparência das fezes, que precisam ter formato regular e cor marrom (WORTINGER, 2009). Importante ressaltar que a cor das fezes pode alterar, se na ração for usado corantes como ingredientes.

2.3 RAÇÃO COMERCIAL PARA PETS

A produção de alimentos industrializados para animais de companhia aumentou consideravelmente nos últimos anos, impulsionada pelo crescimento da população destes animais e pelo consumo progressivo deste produto. O Brasil é o segundo país do mundo em faturamento no setor *pet food* e em número de cães e gatos, ficando atrás somente dos Estados Unidos (ABINPET, 2019). A formulação dos alimentos comerciais para animais de estimação busca atender às diferentes necessidades nutricionais, dos diferentes estados fisiológicos dos pets em diferentes estágios de desenvolvimento como filhotes,

crescimento e manutenção, segundo a *Association of American Feed Control Officials* - AAFCO (FRANÇA et al., 2011). O alimento seco é o mais econômico dentre os gêneros alimentícios para cães (CASE et al., 2000). A alimentação dos pets é um princípio básico do manejo na criação desses animais, que por sua vez, exerce grande influência na expansão da produção de ração industrializada (CARVALHO et al., 2010).

Segundo Carvalho et al. (2014), além das exigências nutricionais inerentes a cada estado fisiológico, a pesquisa nutricional abrange áreas como longevidade, gerontologia, imunidade, beleza de pele e pêlos, função digestiva, saúde oral e prevenção de doenças degenerativas, incluindo-se o manejo nutricional de diversas condições patofisiológicas como urolitíases, nefropatias, artropatias, endocrinopatias, obesidade, distúrbios gastrointestinais, alérgicos, entre outros. Os avanços nas pesquisas em nutrigenômica demonstram a importância dos alimentos e aditivos em marcadores genéticos ligados a diversas patologias. A indústria de alimentos para cães e gatos, tem respondido aos desejos dos proprietários por oferecerem um amplo grau de produtos que não somente suprem as necessidades nutricionais, mas são designadas para atender um estilo de vida e/ou um estágio da vida do animal, bem como aperfeiçoar as condições associadas com doenças e inabilidade crônica (ROCHA, 2008).

Grande parte dos radicais livres são produzidos como elemento dos processos metabólicos normais do organismo, com destaque para respiração celular. porém estudos mostram a os benefícios de adicionar antioxidantes em dietas com a finalidade de dar suporte ao sistema de produção própria do organismo. A associação de mais de um antioxidante tem efeitos sinérgicos no combate aos radicais livres produzidos no organismo (ROCHA, 2008).

De acordo com a lei 9782, de 26 de janeiro de 1999 (BRASIL, 1999), aditivo é toda substância intencionalmente adicionada aos alimentos, com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades químicas, desde que não altere seu valor nutritivo. Os antioxidantes são aditivos utilizados na alimentação animal com a função de garantir a conservação da gordura de origem animal e vegetal, vitaminas e outros ingredientes sujeitos a oxidação dos alimentos. Além disso, devem ser utilizados em baixas concentrações, ser

seguras ao consumo humano e de animais domésticos e economicamente viáveis. Porém, quando esses aditivos com propriedade antioxidantes refletem em saúde aos Pets, os benefícios de uso ampliam-se.

2.4 CROMO

2.4.1 Origem e fontes

O cromo (Cr) é um elemento, da família dos metais, muito comum na natureza (BARNHERT, 1997). É um elemento de transição que pode ocorrer nos seguintes estados de oxidação: 0, 2+, 3+ e 6+. O estado biologicamente importante é o íon trivalente - Cr³⁺ ou Cr-III (MCDOWELL, 1992). O Cr VI é mais solúvel que o Cr III, porém, este estado é ao menos cinco vezes mais tóxico (BARCELOUX, 1999). A levedura de cerveja é uma fonte importante de Cr, bem como as vísceras de animais, cogumelos, pimenta, grãos inteiros, farinha de aveia, nozes, passas, aspargo, pão e cereais (MUTUMA et al., 1999). Algumas bebidas alcoólicas como cerveja e vinho são fontes ricas em cromo, assim como uma variedade de doces, condimentos, chás e café, também são ricas fontes deste metal. Durante o processo de fabricação, o contato com o aço inoxidável dos equipamentos pode fazer com que o Cr seja lixiviado (MUTUMA et al., 1999), especialmente sob condições ácidas (STOECKER, 1990). O teor de Cr em alguns alimentos europeus como o trigo e farinha de trigo está por volta de 5-10 µg/g de matéria seca, enquanto a batata e o leite de vaca são de cerca de 5 µg/g matéria seca (KUMPULAINEN, 1992). Portanto não é esperado que alimentos industrializados para cães e gatos apresentem deficiência deste elemento. No entanto, o Cr obtido pela lixiviação durante o processamento do alimento não é biodisponível (OFFENBACHER et al., 1997). Além do Cr de lixiviação, o Cr inorgânico na alimentação animal pode ser provido do acetato de cromo, cloreto de cromo, óxido de cromo e sulfato de cromo (KUMPULAINEN, 1992; HEGÓCCKIET al., 1997). Já o cromo orgânico por ser um complexo de organometálicos de Cr III, glutatona e nicotínico (ácido dinicotínico glutatona) forma um composto conhecido como fator de tolerância à glicose – GTF e está presente na dieta provindo de várias fontes naturais (KUMPULAINEN, 1992; HEGÓCCKIET al., 1997). A forma orgânica do cromo (Cr III) pode ser encontrada

nas leveduras originárias de cervejarias. Outras formas orgânicas pode ser o cromo picolinato (CrPic), cromo aminoácido e cromo nicotinato (CrNic).

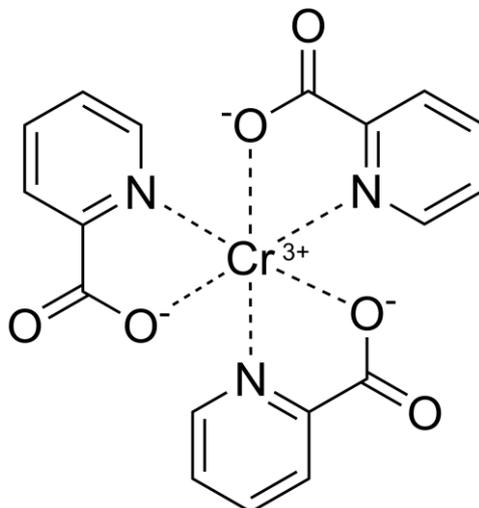
2.4.2 Absorção e interação do cromo com o organismo

A absorção de Cr ocorre através da mucosa intestinal (DUCROS, 1992). Em ratos, assim como em humanos, a secção média do intestino delgado é o principal sítio de absorção, seguido do íleo e duodeno (DUCROS, 1992; MILLER, 1996). O cromo é transportado ligado à proteínas plasmáticas logo após ser absorvido, por exemplo a transferrina (ZAFRA- STONE et al., 2007), a albumina, as globulinas, e possivelmente, às lipoproteínas (GOMES et al., 2005). A biodisponibilidade de minerais está diretamente relacionada à eficiência na absorção do intestino para o sangue (MILLER, 1996). Alguns fatores podem interferir na absorção de metais como o cromo, como a forma química do mineral, a sua interação com alimentos ligantes, a atividade redox dos componentes dos alimentos, a interação com outros minerais, o estado fisiológico do consumidor e a composição do alimento (MILLER, 1996).

A absorção do Cr pode ser afetada pela interação dele com outros elementos como por exemplo os fitatos, ou a associação de quelatos com aminoácidos que evitam a precipitação em pH alcalino (MUTUMA et al., 1999). A absorção do cromo é influenciada pela disponibilidade das proteínas plasmáticas que o transportam (OFFENBACHER & PI-SUNYER, 1988). Geralmente, a absorção do Cr III dietético é muito pequena, cerca de 0,5 a 2% em animais e humanos (VICENT & STALLINGS, 2007). Já é sabido desde a década de 90 que a absorção de cromo inorgânico em animais é inferior quando comparado com cromo orgânico (KORNEGAY 1996; MILLER, 1996; ANDERSON et al., 1997), pois cloreto de cromo (CrCl_3) tem sua absorção em torno de 0,4%, e o Cr a partir do CrPic pode chegar à 2,8% (ZAFRA-STONE et al., 2007). Já o cromo levedura pode atingir níveis de absorção de até 25% (ANDERSON & KOZLOVKY, 1985). em função dessa baixa capacidade de absorção, o Cr na forma de óxido crômico é rotineiramente utilizado como indicador inerte em ensaios de digestibilidade (LINDEMANN, 2007), assim como é um dos mais importantes indicadores de digestibilidade em estudos realizados em animais de companhia (CARCIOFI et al., 2007).

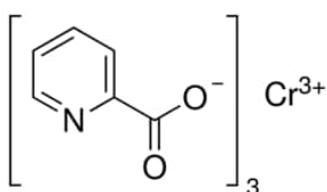
Recomenda-se utilizar o óxido de cromo 0,25% como indicador, sendo este, livre de cromo solúvel, no alimento que será testado (FEDIAF, 2013). Porém, as fontes inorgânicas deste metal, tem apresentado efeitos benéficos para algumas espécies, como por exemplo a suplementação com óxido de cromo na dieta de tilápias (BALDAN, 2004) e cloreto de cromo (SHIAU & LIN, 1993) favoreceu o crescimento, a ingestão do alimento e a retenção proteica e de energia quando a ração continha altos níveis de glicose. Estudos realizados em humanos, a suplementação com cromo na dieta com cloreto de cromo, sendo posteriormente substituído por complexos de Cr III com ácido nicotínico associado a aminoácidos simples, tiveram resultados promissores no controle da glicemia (BARAN, 2005). Nos dias de hoje, grande parte dos estudos de suplementação utiliza-se o complexo tris-picolinato Cr III (Figura 1), que é um dos mais importantes e mais populares suplementos nutricionais (Baran, 2005), inclusive para cães e gatos.

Figura 1 - cromo picolinato III

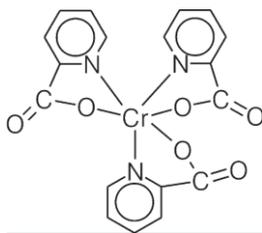


Quando foi usado fontes orgânicas de Cr para suínos (Lindemann et al. 2008), pesquisadores verificaram que o grau de biodisponibilidade está na ordem decrescente de CrPic, Cr metionina, Cr levedura e Cr propionato. Embora pesquisas sobre o Cr III como suplemento tenham iniciado 1970, a suplementação em animais de produção começou realmente em 1990 (LINDEMANN, 2007). A primeira fonte permitida a ser utilizada como suplemento de Cr nos EUA foi o CrPic ($C_{18}H_{12}CrN_3O$) para suínos em 1996 (Figura 2).

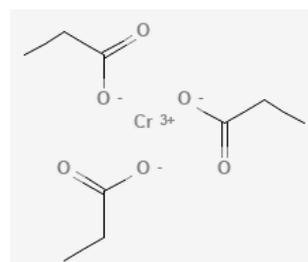
Figura 2 - Exemplos de fontes de cromo utilizadas na nutrição animal



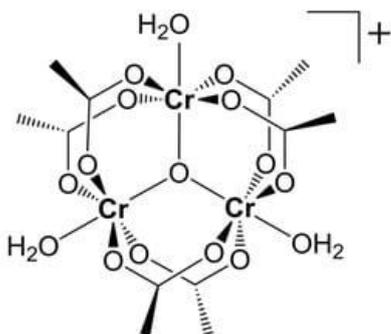
Cromo picolinato



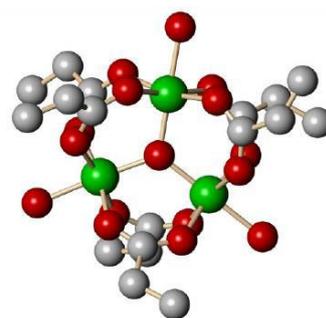
Cromo picolinato III



Cr propionato



Trinuclear Oxo-
Chromium(III)



Kemin chromium
propionate cátion

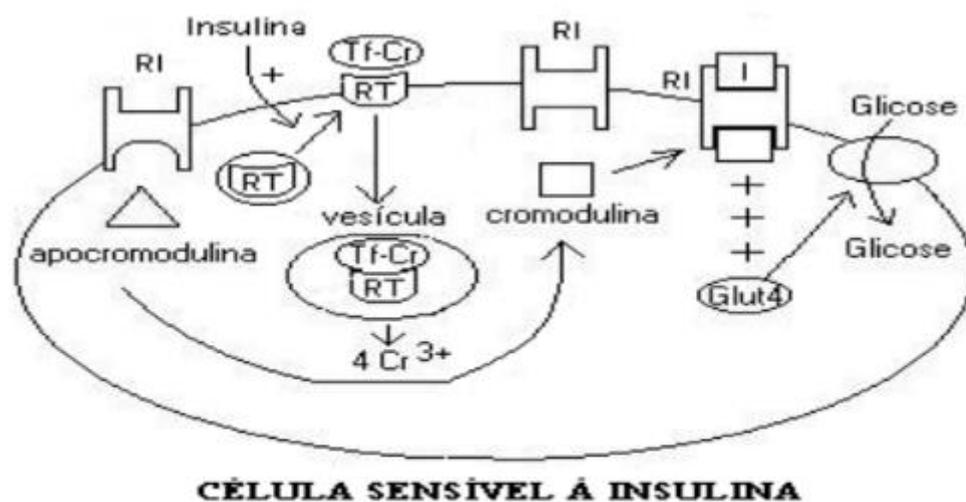
Porém, apenas em 2005 o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o CrPic como suplemento nutricional seguro e com alegação de saúde, uma vez que ele pode reduzir o risco de resistência à insulina e possivelmente o diabetes do tipo II. Entretanto, o FDA considerou que essa relação entre o CrPic e a resistência à insulina ou diabetes do tipo 2 ainda é altamente incerta (FDA, 2005). O cromo é um elemento considerado essencial para um organismo, quando a deficiência na ingestão deste elemento leva a alterações fisiológicas e quando a recuperação da ingestão dele é capaz de reverter essas desordens. Sem sua participação, o organismo não pode desenvolver-se normalmente e nem completar seu ciclo vital, pois sua função não pode ser realizada de forma completa por outro sistema ou elemento (BARAN, 2005).

O Cr é um elemento essencial no metabolismo de carboidratos e lipídeos, sendo que sua função está relacionada com o mecanismo de ação da insulina. Também tem propriedades antioxidantes, funciona como um ativador de enzimas e ajudante na manutenção da estabilidade das proteínas e ácidos nucléicos (VICENT & STALLINGS, 2007). O Cr também pode ser um agente potencializador da imunidade em animais submetidos ao estresse, devido a sua

capacidade em diminuir o nível de cortisol e aumenta a porcentagem de imunoglobulina do sangue (OTT & KIVIPELTO, 1999). A deficiência de Cr prejudica a tolerância à glicose e o crescimento, diminui a longevidade, eleva a concentração de colesterol, aumentando assim a deposição de colesterol nas paredes das artérias e diminui a fertilidade em bovinos (ONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993). Diversas espécies de mamíferos submetidos a situações estressantes como regimes de exercícios, traumas, ou até mesmo o parto e a lactação, apresentaram melhora do status imune e produção de leite quando suplementados com Cr (CHANG & MOWAT, 1992; ONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993).

As células sensíveis à insulina convertem glicose em energia, e esta energia é combustível para síntese proteica, suporte para crescimento tecidual, manutenção celular e melhora da fertilidade (ANDERSON, 1992) com determinante papel do cromo (Figura 3) nas referidas células (Gomes et al 2002)

Figura 3 - Ação proposta do cromo na ação da insulina (adaptado de Gomes et al 2005)



RI = receptor insulina
 RT = Receptor transferrina
 Tf-Cr = Transferrina ligada ao cromo
 I = Insulina

Além disso, outro papel da insulina é participar do metabolismo energético, permitir a deposição de aminoácidos nos músculos, contribuir no metabolismo das gorduras e auxiliar na regulação da utilização do colesterol

(Anderson, 1988). Nos estados onde a glicose não é utilizada pelo metabolismo celular, devido à baixa atividade da insulina, esta é convertida em gordura e além disso, caso os aminoácidos não consigam entrar no interior das células, a formação e manutenção de músculos será comprometida (ANDERSON, 1988). O uso do Cr é também pensado para maximizar o tônus muscular, o perfil atlético e a perda de peso (HEGÓCCKIET al., 1997). Uma ação sobre a conversão da tiroxina (T4) a triiodotironina (T3) também tem sido sugerida, levando a um papel indireto do Cr na modulação da taxa metabólica (MERTZ, 1974; HEGÓCCKIET al., 1997). Devido ao íntimo envolvimento do Cr em diversas reações metabólicas, como visto anteriormente, notamos a importância deste elemento em diversas etapas da vida do animal, porém, também sugere necessidade de suplementação em determinadas condições especiais.

2.4.3 Atualidades sobre suplementação com cromo

Atualmente o picolinato de cromo é a única fonte de suplementação permitida na dieta de ruminantes nos Estados Unidos (Bernhard et al., 2012). A suplementação com cromo é utilizada em diversas espécies e seus resultados indicam que a suplementação com CrPic aumenta significativamente o desenvolvimento corporal e ganho de peso em frangos. Em um estudo meta-analítico sobre a suplementação de cromo picolinato para frangos de corte no qual foram utilizados 15 estudos para a comparação, Feng et al. (2021) verificaram que o uso do referido suplemento melhorou o ganho de peso e os machos apresentaram respostas positivas mais intensas que as fêmeas, recomendando a prática de suplementação para a indústria avícola. Segundo Lindemann (2019), que a deposição de músculo é mais eficiente quando comparada à deposição de tecido adiposo, pois uma menor demanda de energia oriunda da dieta é necessária para realizar o depósito de tecido muscular quando comparado ao tecido adiposo; assim, a suplementação com Cr para suínos em terminação pode melhorar a eficiência alimentar e reduzir os custos com a alimentação (LINDEMANN & LU, 2019).

O uso de cromo na dieta de frangos de corte, associado a vitaminas e minerais, melhorou o desenvolvimento e ganho de peso, bem como reduziu fatores antioxidantes em frangos criados em estresse por calor (UNTEA et al.

2021).. Dentre os componentes com valor biológico e potencial antioxidante utilizados (vitamina E luteína e zeaxantina), o grupo que foi suplementado com cromo e zinco apresentou maiores concentrações de metionina e cisteína, o processo de peroxidação foi retardado no grupo que recebeu a suplementação com cromo (UNTEA et al. 2021).

A absorção do Cr III dietético é bastante reduzida, pode chegar a cerca de 0,5 a 2% em animais e humanos (VICENT & STALLINGS, 2007). Por este motivo, o Cr em sua forma de óxido crômico é usado com frequência como um indicador inerte em ensaios de digestibilidade (LINDEMANN, 2007). Este é um dos indicadores mais importantes para animais de companhia (CARCIOFI et al., 2007). Para a utilização como indicador, recomenda-se a mistura de 0,25% de óxido crômico, livre de cromo solúvel, no alimento a ser testado (FEDIAF, 2014).

Sousa et al. (2020) mostrou que bezerros que receberam a introdução da suplementação com cromo antes do fator estressante (60 dias antes) ocorrer, em contraste a outros estudos que iniciaram a suplementação de cromo para melhorar a performance após o início de algum evento agudo de estresse, apresentaram menores níveis de cortisol quando comparados ao grupo controle. Este resultado sugere que sob situações estressantes, o cromo diminui a secreção excessiva de cortisol, que causa as desordens metabólicas nos animais. Resultados similares foram descritos previamente em um estudo no qual o cromo foi adicionado em dietas para bovinos (YANCHEV et al. 2008, KUMAR et al. 2013).

Índices hematológicos são muito importantes para entender o status fisiológico da dieta de peixes suplementados com Cr. As mudanças hematológicas avaliam impactos importantes e quais as concentrações ideais destes suplementos na dieta (AZARIN et al., 2012). Além de alterações de concentração em células vermelhas, o aumento de leucócitos também foi reportado por Singh (1995) em peixes.

O uso de cromo na dieta de animais é mundialmente utilizado, porém é preciso cautela e melhor entendimento sobre os possíveis efeitos deletérios deste metal. Zafalon et al. (2021) realizaram um estudo a fim de identificar os níveis de elementos tóxicos presentes na dieta de pets, dentre eles o cromo. Não foi observado níveis excessivos de Cr na na ração seca de gatos. Em cães, o

número de estudos sobre a adição de cromo à dieta destes animais ainda é bastante escasso e o completo entendimento dos benefícios do cromo sobre os parâmetros fisiológicos dos pets é alvo de muita discussão, portanto, sabendo da falta de estudos acerca deste tema, esta dissertação foi proposta para aprofundar a discussão sobre a forma de ação do cromo no organismo de cães e seus benefícios para a saúde destes animais.

3. ARTIGO: Addition of organic chromium in dog's feed

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo submetido, com a seções de acordo com as orientações da *Revista Archives of Animal Nutrition*.

Matheus H. Farret & Aleksandro S. da Silva

ABSTRACT

Chromium is recognized as a trace element, essential in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. There are no recommendations regarding the intake limit for canine, and yet, there are few studies on the effect of chromium supplementation in the dogs 'diet. Therefore, the aim of this study was to evaluate dog health fed with diets with organic chromium supplement.

A commercial product with 0.4% chromium was used, (organic chromium in the form of chromium propionate) Kemtracetm Chrome, used at a dose of 500 g/ton of feed, which provided an additional calculated amount of 2,000 µg of chromium per kg of feed. On this study were used 10 beagles divided into 2 treatments: chromium (intake of 389 µg of chromium/dog/day; TCHR) and the control group was composed of dogs with a basal diet (T-00 – no chromium) and each dog received 190g/day of feed divided into two meals. The experiment had two time periods of 28 days, with an interval of 15 days between them; i.e., the dogs that were in the T-00 group at the first period necessarily were in the T-50 group at the second period (all dogs underwent all treatments) following a cross over design. The group in T-50 diets showed higher total leukocyte, higher lymphocytes, higher concentration of total protein, increase in globulins, higher Catalase activity and higher thio-protein concentration. The serum urea levels,

lipid peroxidation (TBARS) was lower in t-50 treatment. Lower concentration of reactive oxygen species was observed on day 28 in dogs in the T-50 group. The chromium in the dogs feed increased the levels of cytokines (TNF- α , IFN- γ and IL-10) and of C-reactive protein in the serum. The supplementation by organic chromium source (2 mg/kg) in the dog feed has beneficial effects on dog health.

KEYWORDS: companion animals, antioxidant, organic chrome, animal nutrition, animal health.

2.5 INTRODUCTION

Organic chromium was used with the intention that the addition of antioxidants in the dog feed would demonstrate positive effects, both in improving the immune response of the animals, as well as in the medicinal properties and their effects on the health of the dogs (Pereira, 2021). The regenerating effects of cells, with the use of chromium, provide animals with a better quality of life, increased longevity and a better result in the immune response in the face of daily challenges. Therefore, the aim of this study was to evaluate the addition of organic chromium supplement to dog food has beneficial effects on dog health.

Commercial pet feed is formulated with the aim of meeting the specific nutrient demands to meet the different physiological states of dogs and cats, such as puppies, growth and maintenance, according to the Association of American Feed Control Officials – AAFCO (France et al. al., 2011). Dry feed is the most economical among other types of dog feed (Case et al., 2000). Feeding pets is a basic management principle in the dog raising and has a great influence on the expansion pet industry (Carvalho et al., 2010).

According to Carvalho et al. (2010), in addition to the nutritional requirements inherent to each physiological state, nutritional research covers areas such as longevity, gerontology, immunity, skin and hair beauty, digestive function, oral health and prevention of degenerative diseases, including the nutritional management of several pathophysiological conditions such as urolithiasis, nephropathies, arthropathies, endocrinopathies, obesity, gastrointestinal disorders, allergies, among others.

Advances in nutrigenomics research demonstrate the action of feed composition and additives on genetic markers linked to diseases, such as cancer, for example (Rocha, 2008). The cat and dog feed industry has responded to the wishes of owners by offering a wide range of products that not only meet nutritional needs but are designed to meet a lifestyle and/or stage of the animal's life as well how to improve conditions associated with disease and chronic disability (Rocha, 2008).

Most free radicals are produced as part of the body's normal metabolic processes, the animal has an elaborate and complex antioxidant defense system to deal with such violent attacks by these free radicals, however evidences are increasing indicating the benefits of adding antioxidants to diets to support the body's own production system, and we know that the addition of more than one antioxidant will have a synergistic effect in combating the free radicals produced in the body (Rocha, 2008). Antioxidants are additives used in animal feed with the 'unction of guaranteeing the conservation of animal and vegetable fat, vitamins and other ingredients subject to oxidation (Brasil 1974). In addition, they must be used in low concentrations, be safe for human and domestic animal consumption and economically viable (Brasil, 1974).

The use of natural and minerals additives in the feed industry for dogs and cats is an alternative that aims to bring benefits to the health of these animals, as it has antioxidant properties and stimulants of the immune and metabolic system in the component ingredients of the feed, which can improve the immune response of the animals and reduce the impacts of free radicals in the animal's body.

The glucose tolerance factor (GTF) is an example of the importance of chromium in the diet of animals, as chromium helps in the formation of this factor that serves as a catalyst for the action of insulin in the cell, since it facilitates its interaction with the tissue cell receptors, improving glucose utilization. Given this, we can say that chromium is recognized as a trace element, essential in the metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins (NRC, 2006).

There are no recommendations regarding the intake limit for canine, and yet, there are few studies on the effect of chromium supplementation in the diet

of dogs (NRC 2006) The dog and cat feed industry shows interest in the search for natural substances with antioxidant potential to replace synthetic products.

2.6 MATERIALS AND METHODS

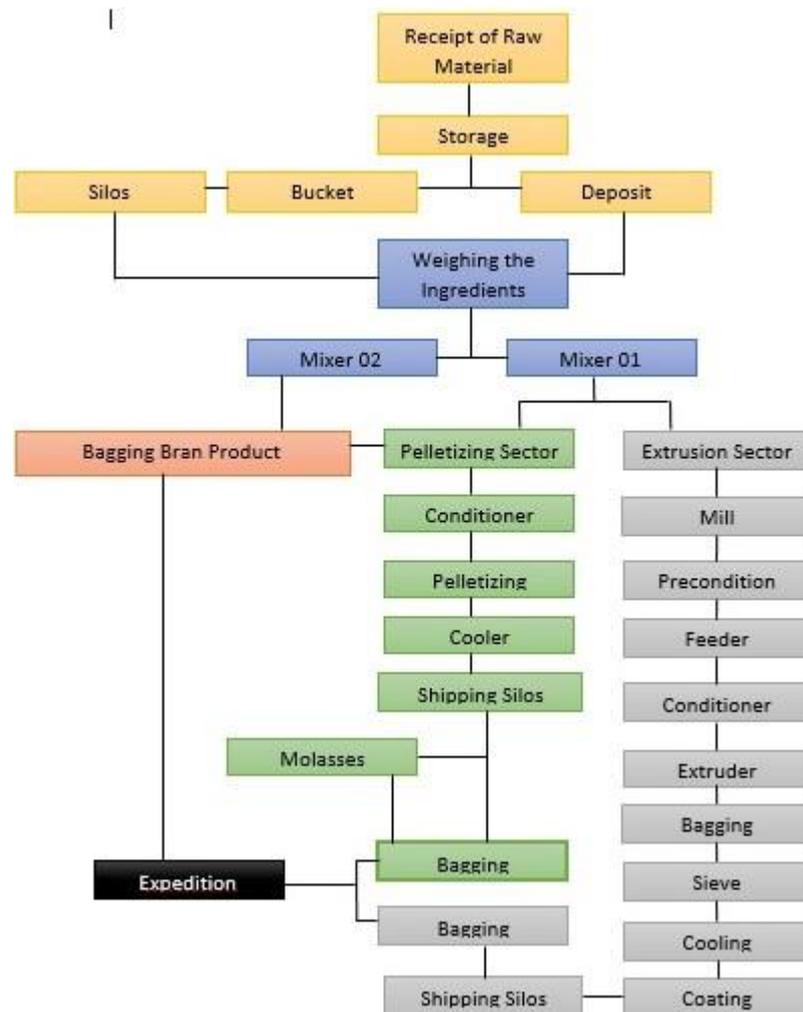
2.6.1 Feed production

The diets were produced by the commercial company NUTRICOL®. Respecting the flowchart of production (figure 1) used by the company to produce this feed, we will highlight some of the crucial steps to prepare the diets, starting where some of the dry ingredients (corn grain, soybean meal, broken rice and wheat bran) were previously ground and sieved at a micronity of 4000 µm (Table 1). Subsequently, they were mixed with the other macro and micro-ingredients, and homogenized in a horizontal paddle mixer for 4 min. In the preparation of the diet with chromium, the ingredient was added to the dough, still in the mixing process. The resulting mixture underwent a second grinding (800 µm) and then was extruded at 105 °C in an extruder (MANZONI®, Campinas, SP, Brazil) with a capacity of 3,000 kg.h⁻¹ to obtain extrudates of 8.5 millimeters in diameter. The commercial classification of the ration will be Premium, considered of high digestibility and better quality in the ingredients, with higher percentage of protein of animal origin. The addition of chromium will be during the processing of the ration in the industry in the oil bath stage, along with the other minerals and vitamins added to the ration. The rations will be stored in commercial bags of 15 kg.

The chromium used in the experiment was KEMTRACETM CHROME (KEMIN®), which is recommended for animal species. Its basic composition consists in chromium propionate, propionic acid, calcium formate, calcium carbonate, propylene glycol, mineral oil; with warranty levels per kg of product: chromium (min.) 4 g/kg (Table 1).

The ration was supplemented with chromium at a dose of 500 g per ton, but both diets were isoprotein and isoenergetic and calculated to meet the nutritional requirements of adult dogs (FEDIAF, 2021).

Figura 4 – NUTRICOL® flowchart of feed production.



2.6.2 Chemical composition of the feed

Feed samples were placed in a drying oven at 96°C for 36 h in order to determine the percentage of dry matter. The analyses of mineral matter, crude fat, and crude protein were carried out following AOC methods.

2.6.3 Animals and experimental design

As experimental models it was used ten adult male beagles. They were housed in an experimental facilities under controlled temperature ($\pm 24^{\circ}\text{C}$.). The

structure also had two collective sites, ten pens for individual feeding and an external shaded area to which the animals had access during the day.

The dogs were divided into two groups, the first one group consumed a basal diet containing chrome (389 µg of chromium/dog/day; T-50) and other group was composed of dogs consuming a basal diet (T-00 – no chromium supplement). As the experiment had two time period of 28 days, it is important to note that all animals (n = 10) consumed both feeds, with an interval of 15 days between them, i.e., the dogs that were in the T-50 group at the first period necessarily were in the T-00 group at the second period following a cross over design. Using this method, they provided us with a large sample size, i.e., ten animals per treatment. The animals were fed twice a day (190 g feed/animal/day – 95 g feed (08:00 h) and 95 g feed (17:00 h)) in individual pens. The feed fed was calculated based on their metabolic requirements according to the energy density of the feed, following the methodology of the NRC Dogs and Cats (2006) – 0.11 g/1,000 kcal ME for adult dogs – and divided in two meals. Dogs consumed the feed completely, leaving no leftovers. Dogs had access to drinking water ad libitum. Dogs were weighed at the beginning and end of the experimental periods (scale mark and scale precision in grams) to determine the change in body mass.

2.6.4 Sampling

Blood samples (5 mL) were collected on days 1, 14 and 28 of the experimental periods always around 09:00 AM. Blood was collected via jugular vein puncture, subsequently fractionated and packed in a tube containing EDTA anticoagulant and in tubes containing activator, and subsequently refrigerated in a transport box for further analysis. The samples were centrifuged to obtain serum for hemodynamic analysis, the samples were frozen for later analysis.

2.6.5 Hemogram

Blood analyzes were performed in the laboratory on the day of collection, that is, analysis of the blood count (erythrocytes, hemoglobin and leukocytes) using a 3-part Equip Vet 3000 automatic hematology analyzer equipment. Hematocrit was performed with capillary microhematocrit. The leukocyte

differential was performed by means of blood smears on slides, which were stained and analyzed under an optical microscope.

2.6.6 Serum biochemistry

Serum levels of protein, albumin, glucose, cholesterol, and urea were analyzed in a semiautomatic equipment (Bio-2000 BioPlus), using commercial kits (Analisa) and following the manufacturer's instructions. The quantification of globulins was determined mathematically (total protein – albumin).

2.6.7 Oxidant/antioxidant status

2.6.7.1 Reactive oxygen species (ROS) in serum

The measurement of serum ROS levels were performed using the method described by Ali et al. (1992). It was used 10 μL of serum incubated with 12 μL of dichlorofluorescein (DFC) per mL at 37 °C for 1 h in the dark. To determine fluorescence it was used 488 nm for excitation and 520 nm for emission. The results were expressed as U DCFA/ μL .

2.6.7.2 Protein thiols (PSH) in serum

In order to measure protein thiols (PSH), the method using DTNB (5,5-dithiobis acid (2-nitrobenzoic; Sigma) was used as described by Sedlak and Lindsay (1968). To determine the PSH content, the precipitated protein was resuspended by homonization buffer. The absorbance readings (405 nm) were performed using a spectrofluorimeter (Biotek, Synergy HT).

2.6.7.3 Glutathione S-transferase (GST) activity in serum

A modified technique described by Mannervik and Guthenberg (1981) was used to measure the GST activity. The activity of GST was measured by the formation rate of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm in a medium containing 50 mM potassium phosphate at pH 6.5, 1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2, 4-

dinitrobenzene (CDNB) as substrate and tissue as supernatants. The results were expressed as $\mu\text{mol CDNB}/\text{min}$.

2.6.7.4 TBARS levels in serum

Lipid peroxidation was estimated in serum by measurement of TBARS according to the method previously described (Jentzsch et al. 1996), using 1 % phosphoric acid and 0.6 % thiobarbituric acid (TBA). The reaction product was measured spectrophotometrically at 532 nm and the results were expressed as nmol of MDA/mL of serum.

2.6.7.5 Catalase and superoxide dismutase activities in blood

The activity of SOD in total blood was determined according to the methodology described by Beutler (1984), which aims at the auto oxidation principle of pyrogallol, inhibited in the presence of SOD. The variation of the optical density was determined kinetically for two minutes at 420 nm at ten second intervals. Activity was expressed as U SOD/mg of protein.

According to Nelson and Kiesov (1972), the CAT activity is measured in total blood. The buffer for the CAT assay was 50 mM potassium phosphate buffer (TFP) at pH 7.5, and CAT activity was determined by the decomposition of H_2O_2 at 240 nm. The enzymatic activity was expressed in $\eta\text{mol CAT}/\text{mg protein}$.

2.6.7.6 C-reactive protein (CRP)

The quantification of serum CRP was performed using commercial kits of ultrasensitive CRP (BioTécnica, Minas Gerais, Brazil), following the manufacturer protocol at semiautomatic analyzer Bio-2000 (Bioplus Ltda, São Paulo, Brazil), methodology standardized by Paim et al (2013).

2.6.7.7 Cytokines levels

The proinflammatory cytokines were quantified by ELISA, using the commercial Quantikine canine immunoassay kits (IFN- γ , TNF- α , and IL-10), according to manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota,

USA), methodology standardized by Paim et al (2013). The intensity of color measured by spectrometry by a micro-ELISA reader was used to determine the presence and concentration of the cytokines.

2.6.8 Statistical analysis

Each animal was considered an experimental unit in all analyzes and data were tested for normality and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. For data analysis, the SAS MIXED procedure was used with the Satterthwaite approximation, in order to determine the degrees of freedom of the denominator for the fixed effects test. Tests of body weight (BW) changes were performed by analyzing fixed effects of treatment and using animal and period as a random variable. The remaining variables (serum biochemistry, serum antioxidant responses, and blood count) were analyzed as repeated measures and tested for fixed effects of treatment and treatment versus day, using animal and period as random variables. Day 1 results were also included as independent covariates in each analysis, but were removed from the model when $P > 0.10$. The Akaike information criterion was used to select the covariance structures through the lowest value. Means were separated using PDIFF and all results were reported as LSMEANS followed by SEM. Significance was defined when $P \leq 0.05$, and trend towards significance when $P > 0.05$ and ≤ 0.10 .

2.7 RESULTS

2.7.1 Chemical composition of feed

The feed (ration) had 94% dry matter, 2.8% mineral matter, 27% crude protein, and 10% crud fat (Table 1).

2.7.2 Body weight

There was no effect of treatment ($P > 0,05$) in body weight change (Table 3), as well as interaction between treatment vs day for body weight and weight gain ($P > 0,05$).

2.7.3 Hematological analysis

There was no treatment effect in blood count results (Table 4), as well as interaction between treatment vs day for red cell (erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin concentration). There was treatment effect ($P < 0,05$) and interaction of treatment vs day ($P < 0,05$) for total leukocyte and lymphocyte counts; the count of these cells being higher in the dogs in T-50 diets (Table 4). For the variable's neutrophils, monocytes and eosinophils did not differ between treatments.

2.7.4 Serum biochemical analysis

There was treatment effect ($P < 0,05$) and interaction of treatment vs day for urea, total protein and globulin concentration (Table 5). Lower levels of urea were observed in the serum of dogs in the treatment group compared to the control ($P < 0,05$). The total protein levels were higher due to the higher concentration of globulins in the dogs in the treatment group. For the variable's cholesterol, glucose and albumin did not differ between groups.

2.7.5 Oxidant and antioxidant status

There was effect ($P < 0,05$) and interaction of treatment vs day at day 28 ($P < 0,5$) for catalase activity and protein thiol levels, higher in the blood of animals in the treated group (table 5). There was no treatment effect or interaction for the glutathione S-transferase and superoxide dismutase ($P > 0,05$). On day 28, there was a trend interaction of lower ROS concentration in the serum of the animals that consumed the diet with chromium ($P < 0,10$). Serum lipid peroxidation

(TBARS) was affected by treatment and interaction between treatment vs day (days 14 and 28); with emphasis on the lower concentration of TBARS for T-50 treatment.

2.7.6 Cytokines and CRP

had treatment effect and interaction between treatment vs day ($P < 0.05$). The concentration of TNF, INF and IL-10 was higher in the serum of the dogs that consumed the diet supplemented with chromium; Similar behavior was observed for C-reactive protein levels when compared to the control.

2.8 DISCUSSION

Chromium acts as an organic complex of low molecular weight called “glucose tolerance factor” (GTF) formed by Cr^{3+} , nicotinic acid, glycine, cysteine and glutamic acid (Mertz, 1969), however, in our study glucose levels were not affected by daily chromium intake. Alteration of the metabolism of glucose by an oligopeptide of low molecular weight known as chromodulin was reported by Sun et al (2000). This oligopeptide is composed of glycine, cysteine, aspartame and glutamate and binds with high affinity to 4 ions of Cr^{3+} (Vincent 2001). The literature suggests that, GTF is simply how the Cr is shown in beer yeast (an organic form), working as a provider of Cr to the body and not as its biologically active form (Vincent 2000; Lamson and Plaza, 2002).

As an essential element, whose effect on the immune regulation has been confirmed, chromium mechanisms of action over the immune system are related with the effects of chromium on the insulin and cortisol (Pechova, 2002; Frauwirth, 2004; Sun, 2000). The proliferation rate and the number of T and B lymphocytes significantly increased after the immune system is activated by chromium other study (Shrivastava, 2002), similar to what happened in the current study. Furthermore, chromium can improve the immune function by regulating the activity of some immune related enzymes and content of immunoglobulin (Li, 2008; Wang, 2014). Chromium as well has the effect of enhance immune function by improving the immune effect of the vaccine or by

lowering cortisol level or other immune intermediates (Sedegah, 2000; Lee, 1997; Yan, 2005). In addition of these, chromium can affect the biosynthesis of proteins (Vermes, 2000; Vajpayee, 2000) and RNA in the nucleus (Okada, 1983; Sahin, 2013), and it also participate in the maintain of DNA integrity (Bray, 2005). For Wu (2017), this may be the molecular mechanisms of the chromium on immunity.

The total protein levels were higher due to the elevated concentration of globulins in serum the dogs in the treatment group. For some authors the higher levels of globulins may be involved involvement in the carrier of metals. For Lien et al. (2005), chromium propionate supplementation could enhance total globulin, IgG, and the γ -globulin concentration. On this last study, it increased sheep red blood cells (SRBC) antibody titer, phytohaemagglutinin (PHA) skin swelling, neutrophil activity and hite blood cells following lipopolysaccharide (LPS) challenge were as well noted. Also the globulins can be differed in α , β and γ identified by 40ccording40resis; as done in our study. The last two have a special role in the immunity system, that can be explained by the increased of total leukocyte and lymphocyte counts. What may suggest a role been played by chromium in the immunity system (González, 2006).

The Cr can be a potentiator of immunity in animals subjected to stress, as it decreases the level of cortisol and increases the percentage of immunoglobulin in the blood (Ott and Kivipelto, 1999). Dworzanski (2021) showed that chromium added to rat diet in the form of chromium (III)-methionine or nano-sized chromium can increased the immune response, increased the concentrations of immunoglobulins A and E (IgA and IgE), interleukin-6 (IL-6), interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor a (TNF-a) and activity of ceruloplasmin (Cp). All these shows how important chromium is to the immune system.

Burton et al. (1993) showed that supplemental chromium on the diet of calves elevates anti-ovalbumin-antibody responses and mitogen-stimulated blastogenic responses of peripheral blood mononuclear cells. In other hand Chang (1996) shows that supplemental chromium had no influence on mastitis-related parameters, health status or neutrophil phagocytic activity of dairy cows. Van de Ligt et al. (2002) showed an effect of chromium tripicolinate supplementation of diet during the postweaning period on porcine immune response, nevertheless found no effect on the performance and immune status.

Beneficial effects on redox status were described by increasing the level of reduced glutathione (Sundaram, 2012), an important endogenous antioxidant, as well as on the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase (Sundaram, 2012; Sushko, 2019). Researchers reported that patients and animals with experimentally induced diabetes, chromium supplementation has been shown to reduce the level of oxidative stress markers and pro-inflammatory cytokines (Sushko 2019; Lai 2008; Jain 2012).

According to Cheng et al. (2004), there is a relationship between health status and the antioxidant activity of the chromium. The author suggests that in healthy it acts as a pro-oxidant, and in glucose intolerant people, it has an antioxidant effect. Cheng et al. (2010) also demonstrated in mice on a high-fat diet the antioxidant and anti-inflammatory effects of chromium. The use of chromium was shown to minimize the negative effects of this type of diet and inhibit the progression of diet-induced fatty liver. Other benefits in the form of reduced inflammation and oxidative stress in rats on a high-fat diet have also been shown in studies using additives of various chromium compounds, e.g. picolinate, nicotinate and histidinate (Preuss, 1997; Tuzcu, 2011).

Through chromium effects on various immune system components, e.g. B cells, T cells, and macrophages, as well as on cytokine production, is possible to say that it can act as an immune modulator (stimulatory or suppressive) (Shrivastava, 2002; Pechova, 2007; Terpiłowska, 2011; Gültepe EE, 2017). A deficiency of this metal in the body results in impaired humoral immunity (Lukaski, 1999). Chromium has the ability to reduce the cortisol levels, this may be partly responsible for its immunostimulatory effect. The antibody production and the lymphocytes actions are suppressed by the action of this hormone, as well as other leukocyte populations (Gültepe, 2017).

There was an increase in cytokines and acute phase protein in the blood of dogs that consumed chromium. Shumilla et al. (1999) reported that pretreatment of A549 human lung carcinoma cells with non-toxic levels of Cr(VI) inhibits TNF-K-stimulated expression of the endogenous gene for IL-8 and of an NF-kappaB-driven luciferase gene construct. Chromium does not inhibit TNF-K-stimulated IkappaBalpha degradation or translocation of NF-kappaB-binding proteins to the nucleus. Also according to Shumilla (1999), a non-toxic levels of

Cr(VI) selectively inhibit NF-kappaB transcriptional competence by inhibiting interactions with coactivators of transcription rather than DNA binding.

As stated by Kafilzadeh et al. (2012) Gültepe et al. (2017) and , the precise role of Cr on immune system functions has not been fully elucidated yet. Although, it clearly reveals that the supplemental dietary Cr reduces cortisol levels. It is widely discussed that cortisol, an important glucocorticoid has a negative impact on the generation of antibodies and their impact and on the function of lymphocytes as well as the leukocyte population, therefore impacting the immune system (Munck et al. 1984, Roth and Kaeberle 1982). According to Pechova et al. (2002) and Sun et al. (2000_) the mechanisms of action of chromium over the immune system are related with the effects of chromium on insulin and cortisol regulation. Other studies showed that after the immune system is activated by chromium, there is an increase on the proliferation rate and the number of T and B lymphocytes (Shrivastava, 2002). Wang (2014) suggests that chromium can improve the immune function by acting on the regulation of enzymes and content of immunoglobulin related to the immunity. Over this, chromium affects the biosynthesis of proteins and RNA and it also acts in the maintain of DNA integrity, being this the probably may role of chromium on the molecular mechanisms on immunity (Sahin, 2013).

Mallard et al. (1994) revealed an increase in the cortisol levels of dairy cows which didn't received Cr supplementation, nonetheless Mallard (1994) also noticed a decrease in the plasma cortisol level of the group which received dietary Cr supplements from the 2nd week before calving until the first week of lactation.

Chromium affects various components of the immune system and may result in immunostimulation or immunosuppression (Shrivastava, 2002). Reactive intermediates are results of a formation from the reduction of Cr (VI) to Cr (III), which together with oxidative tissue damage, oxidative stress and a cascade of cellular events such as modulation of apoptosis regulatory gene p53 contribute to the cytotoxicity, genotoxicity and carcinogenicity of Cr (VI)-containing compounds (Shrivastava, 2002).

Higher catalase activity and protein thiol levels in the blood of animals in the chromium group. Chromium is currently recognized as an essential trace element in carbohydrate and lipid metabolism, and its function is related to the

mechanism of insulin action (Vicent and Stallings, 2007). It also has antioxidant properties, works as an enzyme activator and helps to maintain the stability of proteins and nucleic acids. The lower ROS concentration in the serum of the animals that consumed the chromium-50 treatment, as well as lower lipid peroxidation are direct consequences of the stimulation of the antioxidant system by the consumption of chromium by the dogs. This could be explained as the levels of cortisol were lower by the action of chromium over the antioxidant factors.

Besides the lower levels for ROS and TBARS could be explained by the increase of glutamine to produce glutathione (Rogero et al., 2002) interfering on the oxidative modification of the cellular macromolecules, cellular death by apoptosis and structural damage of the tissue (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). According to the literature, the chromium supplementation may improve oxidative stress parameters, because in nine studies enrolling 550 participants (people) it was verified that chromium supplementation significantly increased total antioxidant capacity (TAC), and significantly decreased malondialdehyde (MDA) levels (Morvaridzadeh et al., 2022).

The effect of chromium on gene expression and non-coding RNAs is probably due to the effect of chromium on controlling of the oxidative (Jia et al., 2020). Zhang et al. (2018) shown that Cr has a potential to interact with several inflammatory and oxidative stress factors related miRNAs.

Lower levels of urea were observed in the serum of dogs in the chromium group. Chromium has an important role in the anabolism and catabolism of protein and, as said before, improves insulin-stimulated amino acid uptake and protein synthesis (Pollard, 2001). Some of the previous studies demonstrated that chromium supplementation intensified the incorporation of amino acids into tissues in rats (Roginski, 1969), and treatment using CrPic increased amino acid uptake by skeletal muscles in rats (Evans 1992). Bernao (2004) showed that high doses of CrPic might increase muscle mass. In a study conduct by Peng (2009), showed CrSP enhanced not only insulin-stimulated but also basal protein deposition. Peng (2009) also bring that the relevance of the data showed on the article is to support the hypothesis of chromium acting as a cofactor of insulin and potentiating the action of it.

On this stud the use of CrSP was a better choice over Cr supplement, since it had better efficacy on protein metabolism. IGF-1 has an important role in both the regulation of protein synthesis in skeletal muscle and the maintenance of whole-body protein synthesis (Peng, 2009). IGF-1 increased amino acid transport (Fant, 1986) and protein synthesis (Harper, 1987) in the cultured cells in vitro IGF-I can also stimulate amino acid uptake and protein synthesis in muscles and can greatly reduce the rate of protein breakdown within muscle fibers (Liu, 2008). Also according to Liu (2008) with the best use of protein for muscle deposition, there will be less need for amino acid degradation, as there are no amino acid reserves, and consequently the dog, being a ureotelic animal, will have less urea excreted via urine and as all urea previously passes through the blood, there is lower blood urea. This is just not fully confirmed because no analysis of the body fat and protein content of the dogs was done. More glucose available, less need for protein catabolization.

2.9 CONCLUSION

The diets with organic chromium has effects on the cellular response (lymphocytes), which is probably related to the increase in serum globulins and cytokines and the ingestion of chromium by dogs was able to minimize systemic oxidative stress, stimulate antioxidant enzyme, which is beneficial for the health of animals.

2.10 ETHICS COMMITTEE

The project was approved by ethics committee on the use of animals the UDESC, protocol number 8967040321.

Table 1 – Ingredient and nutritional composition of the diet used

Ingredients, g/kg		
	T-00 Control	T-50 Chromium
Ground rice	300	300
Corn grain	170	170
Poultry viscera meal	150	150
Wheat bran	100	100
Beef meat and bone meal	100	100
Soybean meal	54.5	54.5
Rice bran	50.0	50.0
Poultry viscera oil	35.0	35.0
Hydrolyzed	20.0	20.0
Flaxseed grain	7.00	7.00
Regular salt	3.00	3.00
Mineral vitamin supplement ¹	4.00	4.00
Sodium hexametaphosphate	3.00	3.00
Antifungal ²	1.00	1.00
adsorbent ³	1.00	1.00
Advantage pet bio balance ⁴	0.80	0.80
Antioxidant ⁵	0.50	0.50
Bioplex zinc ⁶	0.15	0.15
KemTRACE 0,4% ⁷	0.00	0.50
Caulim	0.50	0.00
<i>Chemistry composition</i>		
Dry matter (g/kg)	941	940
Ash (g/kg of DM)	28.5	29.6
Crude protein (g/kg of DM)	271	268
Crude fat (g/kg of DM)	104	106

¹Supplementation of vitamins and minerals that each Kg of the product contains: Vitamin A (min.) 2,200,000 IU; Vitamin D3 (min.) 375,000 IU; Vitamin E (min.) 4,000 IU; Vitamin K3 (min.) 505 mg; Vitamin B1 (min.) 495 mg; Vitamin B2 (min.) 1120 mg; Vitamin B6 (min.) 4000 mg; Vitamin B12 (min.) 5,000 mg; Niacin (min.) 6965 mg; Pantothenic Acid (min.) 2744 mg; Folic Acid (min.) 400 mg; Biotin (min.) 37.6 mg; Choline (min.) 72 g; Copper (min.) 3000 mg; Iron (min.) 21 g; Manganese (min.) 12 g; Iodine (min.) 480 mg; Zinc (min.) 19 g; Selenium (min.) 39.96 mg. ² Propionic Acid;. ³Bentonite, Sepiolite, Calcium Propionate, Sodium Chloride and other ingredients; ⁴Yucca Extract, Dehydrated Hydrolyzed Yeast and Yeast Cell Wall; ⁵B.H.T. (Butylhydroxytoluene), Propyl Galate; ⁶Zinc Proteinate; ⁷- 0.4% Chromium from Chromium Propionate; ⁸- colocar as metodologias utilizadas para fazer as analyses.

Tabela 2 - Body weight of beagle dogs receiving experimental diets.

Variable	Treatments		SD	P-Value	
	Control	Chromium		Treat	Treat x day
Body weight (kg)				0.99	0.97
Day 1	11.1	11.0	0.15	-	
Day 14	11.8	11.4	0.16	-	
Day 28	11.5	11.5			
Mean	11.6	11.4	0.17	-	
Weight gain (g)	0.4	0.5	0.14	0.91	-

Note: No difference between treatment and interaction day x treatment.

Tabela 3 - Complete blood counts of beagle dogs receiving experimental diets

	Treatments		SD	P-value	
	T-00	T-50		Treat	Tr x day
Hematocrit (%)				0.92	0.90
day 1	47.9	48.5	0.47		
day 14	51.7	51.2	0.45		
day 28	54.4	56.6	0.46		
Mean ¹	53.0	53.9	0.44		
Hemoglobin (g/dL)				0.95	0.93
day 1	14.4	15.2	0.18		
day 14	13.6	14.6	0.20		
day 28	16.6	17.0	0.19		
Mean ¹	15.1	15.8	0.16		
Erythrocytes (x 10 ⁶ µL)				0.87	0.92
day 1	6.89	7.00	0.05		
day 14	7.00	7.03	0.05		
day 28	6.81	7.15	0.06		
Mean ¹	6.90	7.09	0.05		
Leukocytes (x10 ³ µL)				0.01	0.03
day 1	9.68	9.32	0.49		
day 14	7.62 ^b	8.85 ^a	0.47		
day 28	7.73	8.13	0.47		
Mean ¹	7.66 ^B	8.49 ^A	0.44		
Neutrophils (/µL)				0.28	0.19
day 1	5.92	4.29	0.72		
day 14	4.51	3.92	0.43		
day 28	4.63	4.32	0.30		
Mean ¹	4.57	4.12	0.32		
Lymphocytes (/µL)				0.04	0.01
day 1	2.68	3.23	0.28		
day 14	2.52	2.15	0.25		
day 28	3.18 ^b	4.78 ^a	0.25		
Mean ¹	2.85 ^B	3.46 ^A	0.23		
Monocytes (/µL)				0.11	0.15
day 1	0.63	0.73	0.36		
day 14	0.43	0.66	0.25		
day 28	0.18	0.34	0.26		
Mean ¹	0.30	0.50	0.31		
Eosinophils (/µL)				0.32	0.49
day 1	0.42	0.13	0.29		
day 14	0.14	0.11	0.14		
day 28	0.10	0.27	0.17		
Mean ¹	0.12	0.19	0.18		

^{a-b} Within a treatment, underwriting differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

^{A-B} In a line, without the common subscript, it differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

¹ Note: To analyze the treatment effect, the results of the variables on days 14 and 28, which correspond to the experimental period, were used; and the results presented in an average.

Tabela 4 - Serum biochemistry of Beagle dogs receiving experimental diets

Items	Treatments ²		SD	P – values	
	T-00	T-95		Treat	Treat x Day
Urea (mg/dL)				0.05	0.04
d 1	42.6	42.9	1.25		
d 14	64.9 ^a	53.8 ^b	1.41		
d 28	63.4 ^a	56.7 ^b	1.25		
Mean	64.1 ^A	55.2 ^B	1.23		
Colesterol (mg/dL)				0.58	0.62
d 1	153	152	4.74		
d 14	161	154	4.65		
d 28	140	134	4.28		
Mean	150	144	4.09		
Glucose (mg/dL)				0.81	0.79
d 1	115	104	3.04		
d 14	127	133	2.74		
d 28	118	119	2.45		
Mean	122	126	2.45		
Total protein (g/dL)				0.01	0.01
d 1	8.80	8.62	0.21		
d 14	8.63 ^b	9.21 ^a	0.19		
d 28	8.43 ^b	9.96 ^a	0.18		
Mean	8.53 ^B	9.58 ^A	0.14		
Albumin (g/dL)				0.82	0.88
d 1	3.53	3.39	0.04		
d 14	3.55	3.62	0.06		
d 28	3.30	3.40	0.07		
Mean	3.42	3.51	0.05		
Globulin (g/dL)				0.01	0.01
d 1	5.27	5.23	0.04		
d 14	5.08 ^b	5.59 ^a	0.04		
d 28	5.13 ^b	6.56 ^a	0.05		
Mean	5.11 ^B	6.07 ^B	0.03		

^{a-b} Within a treatment, underwriting differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

^{A-B} In a line, without the common subscript, it differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

¹Note: To analyze the treatment effect, the results of the variables on days 14 and 28, which correspond to the experimental period.

Tabela 5 - Antioxidant/oxidant responses of beagle dogs receiving experimental diets

Variable ¹	Treatments			P-value	
	T-00	T-95	SD	Treat	Treat x day
GST (µmol CDNB/min)				0.96	0.92
day 1	82.6	72.0	2.41		
day 14	86.5	88.8	2.40		
day 28	99.4	97.7	2.25		
Mean ²	92.9	93.2	2.19		
CAT (ηmol CAT/mg protein)				0.01	0.01
day 1	0.86	0.91	0.02		
day 14	0.83	0.88	0.02		
day 28	0.80 ^b	1.10 ^a	0.02		
Mean ²	0.81 ^B	0.99 ^A	0.03		
SOD (U SOD/mg protein)				0.98	0.85
day 1	3.72	3.23	0.09		
day 14	4.63	4.42	0.08		
day 28	3.32	3.53	0.09		
Mean ²	3.97	3.97	0.07		
PSH (mMol NPSH/mL)				0.02	0.01
day 1	81.0	76.4	2.74		
day 14	68.9	66.9	2.87		
day 28	74.4 ^b	88.7 ^a	2.85		
Mean ²	71.6 ^B	77.8 ^A	2.89		
ROS (U DCFA/µL)				0.68	0.10
day 1	39.4	36.1	3.41		
day 14	35.5	38.1	2.78		
day 28	40.1 ^a	34.7 ^b	2.47		
Mean ²	37.8	36.6	2.18		
TBARS (nmol MDA/mL)				0.01	0.01
day 1	34.3	46.2	1.74		
day 14	60.1 ^a	41.5 ^b	1.85		
day 28	41.3 ^a	33.2 ^b	1.49		
Mean ²	50.7 ^A	37.3 ^B	1.52		

Note: GST (glutathione S-transferase activity); GPx (glutathione peroxidase activity); non-protein thiols (NPSH); reactive oxygen species (ROS).

^{a-b} Within a treatment, underwriting differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

^{A-B} In a line, without the common subscript, it differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

¹ Note: To analyze the treatment effect, the results of the variables on days 14 and 28, which correspond to the experimental period, were used; and the results presented in an average.

Tabela 6 - Cytokines levels and C-reactive protein (CRP) of beagles dogs receiving experimental diets

Variable ¹	Treatments			P-value	
	T-00	T-95	SD	Treat	Treat x day
TNF- α (pg/mL)				0.01	0.01
Tumoral Necrosis Factor Alfa					
day 1	36.5	35.9	0.32		
day 14	37.7 ^b	45.1 ^a	0.34		
day 28	35.8 ^b	46.2 ^a	0.34		
Mean ²	36.7 ^B	45.6 ^A	0.33		
IFN (μ g/mL) interferons				0.05	0.01
day 1	27.7	27.9	0.17		
day 14	28.3	30.0	0.18		
day 28	27.4 ^b	32.7 ^a	0.17		
Mean ²	27.8 ^B	31.3 ^A	0.16		
IL-10 (pg/mL)				0.01	0.01
Interlecinas 10					
day 1	87.9	88.0	0.16		
day 14	81.7 ^b	90.2 ^a	0.15		
day 28	85.3 ^b	94.7 ^a	0.16		
Mean ²	83.5 ^B	92.4 ^A	0.16		
CRP (mg/L) proteine C-reactive				0.01	0.01
day 1	1.09	1.14	0.06		
day 14	1.05	1.87	0.05		
day 28	1.00	1.96	0.05		
Mean ²	1.02	1.91	0.05		

^{a-b} Within a treatment, underwriting differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

^{A-B} In a line, without the common subscript, it differs ($P \leq 0.05$) or tends to differ ($P \leq 0.10$).

¹ Note: To analyze the treatment effect, the results of the variables on days 14 and 28, which correspond to the experimental period, were used; and the results presented in an average.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento conduzido para esta dissertação de mestrado permitiu-nos concluir que o consumo de cromo orgânico com a ração tem efeitos na resposta celular (linfócitos) de cães, o que provavelmente está relacionado ao aumento das globulinas e citocinas séricas, o que mostra as vantagens da utilização do cromo orgânico na alimentação destes animais. Outro resultado que podemos observar foi que a ingestão de cromo orgânico pelos cães foi capaz de minimizar o estresse oxidativo sistêmico, estimular a enzima antioxidante, o que é benéfico para a saúde dos animais.

Em resumos chamamos a atenção, um fator importante observado foi a contagem aumentada de linfócitos e leucócitos nos animais que consumiram a dieta com cromo. Os índices de proteínas totais e globulinas também foram maiores no grupo que recebeu suplementação com cromo na dieta. Níveis menores de ureia foram observados nos animais do grupo tratamento. Outro fator que chamou à atenção durante a avaliação, foi um maior índice de atividade catalase e tióis proteicos no sangue dos animais do grupo tratamento. Em contrapartida, níveis menores de TBARS e concentração de EROs foram observados no grupo controle com uma relação com o tempo de consumo. Um último dado observado no grupo tratamento, foi o aumento nas concentrações de TNF, INF e IL-10, assim como da proteína reativa-C. Como os cães receberam ração controlada e individualmente sabe-se que consumo de cromo foi 389 $\mu\text{g}/\text{cão}/\text{dia}$. Este índice de cromo ingerido, foi o suficiente para observarmos alterações fisiológicas nos animais como ação antioxidante e anti-inflamatória, bem como uma melhora na resposta imunológica destes animais. Como estes animais estavam em desafio natural constante, também constatamos que o metabolismo lipídico, proteico e de carboidratos responde positivamente com consumo de ração contendo cromo.

REFERÊNCIAS

- ABINPET, Perfil Pet Food. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**. 2019 [online]. Disponível em: <http://www.abinpet.or.com.br>.
- ANDERSON, RA.; BRYDEN, NA.; POLANSKY, MM. Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. **Journal of the American College of Nutrition**, v.16, n.3, p.273-279. 1997.
- ANDERSON, RA.; KOLOZLOVSKY, AS. Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.41, p.1177-1183. 1985.
- ANDERSON, RA. Chromium, glucose tolerance and diabetes. **Biological Trace Element Research**, v.32, n.1, p.19-24. 1992.
- ARUNKUMAR RI, RAJASEKARAN P, MICHAEL RD. Differential effect of chromium compounds on the immune response of the African mouth breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Fish Shellfish Immunol**. 10, 667-676. 2000.
- BALDAN, AN. Suplementação de cromo na dieta, utilização de carboidrato e desempenho produtivo do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), UNESP, Jaboticabal-SP, **Dissertação**. 47p. 2004.
- BANGYUAN W. Relationship between the Chromium or Chromium Compounds on Immune Functions in Animals, **Journal of Veterinary Medicine and Health**. 2017.
- BARAN, EJ. Suplementação de elementos-traços. **Cadernos Temáticos De Química Nova Na Escola**, n.6. 2005.
- BARCELOUX, DG. Chromium. **Clinical Toxicology**, v.37, p.57-64. 1999.
- BARNHART, J. Occurrences, uses and properties of chromium. **Regulatory Toxicology Tharmacology**, v.26, p.S3–S7. 1997.
- BERNAO A, MESEGUER I, AGUILAR MV, PARA MC, MUNOZ MJ. Effect of different doses of chromium picolinate on protein metabolism in infant rats. **J Trace Elem Mid Bio** 18:33–39. 2004.
- BERNHARD, BC.; BURDICK, NC.; RATHMANN, RJ.; CARROLL, JA.; FINCK, DN.; JENNINGS, MA.; YOUNG, TR.; JOHNSON, J. Chromium supplementation alters both glucose and lipid metabolism in feedlot cattle during the receiving period. **Journal of Animal Science**; 90, 4857–865. 2012.
- BRASIL. Lei nº 6198, de 26 de dezembro de 1974. Dispõe sobre a Inspeção e a Fiscalização Obrigatórias dos Produtos à Alimentação Animal, e dá outras Providências. In: BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e**

- Abastecimento MAPA.** Brasília, 26 de dezembro de 1974; 153º da Independência e 86º da República.
- BRAY CM, WEST CE. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. **New Phytology**. 168: 511-528. 2005.
- BUFFINGTON, CA., HOLLOWAY, C., ABOOD, SK., Diet and feeding factors. **The manual of veterinary dietetics**. 43-48. 2004.
- BURTON JL, MALLARD BA, MOWAT DN. Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Animal Science**. 71, 1532-1539. 1993.
- CAMPIGOTTO G, ALBA DV, SULZBACH MM, SANTOS D, SOUZA CF, BALDISSERA MD, GUNDEL S, OURIQUE AF, ZIMMER F, PETROLLI TG, PAIANO D, DA SILVA AS. Dog feed production using curcumin as antioxidant: effects of intake on animal growth, health and feed conservation. **Archives of Animal Nutrition**. 74, 397-413. 2020.
- CARCIOFI AC, VASCONCELLOS RS, OLIVEIRA LD. et al. Chromic oxide as a digestibility marker for dogs – A comparison of methods of analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v.134, p.273-282. 2007.
- CARVALHO LAR, PORSANI MYH, COELHO MR, ZITZ AG, BRUHN FRP, LEITE CAL, BORGES JC. Relação entre renda familiar e valor da ração oferecida ao cão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.35-41. 2014.
- CASE LP, CAREY DP, HIDREAKEWA DA. History and regulation of pet foods. **Canine and feline nutrition: A resource for companion animal professionals**. 2. 143-151. 2000.
- CHANG X, MALLARD BA, MOWAT DN. Effects of chromium on health status, blood neutrophil phagocytosis and in vitro lymphocyte blastogenesis of dairy cows. **Vet. Immunol. Immunopathol**. 52, 37-52. 1996.
- CHANG X, MOWAT DN. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. **Journal Animal Science**, v.70, n.3, p.559-565, 1992.
- CHEN WY, CHEN CJ, LIU CH, MAO FC. Chromium attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in KK/HIJ mice. **Biochem Biophys Res Commun**. 397(3):459–64. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.129. 2010.
- CHENG HH, LAI MH, HOU WC, HUANG CL. 2004. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. **J Agric Food Chem**. 5:1385–9. doi: 10.1021/jf035074j.
- COWELL CS, STOUT NP, BRINKERMAN MF, HANDS MS, THATCHERCD, REMILLARD RL, ROUDEHUSH P. Making comercial pet foods. **Small animal clinical nutrition**. 4. 129. 2000.

DUCROS V. Chromium metabolism. **Biological Trace Element Research**, v.32, p.65-77. 1992.

EVANS GW, BOWMAN TD. Chromium picolinate increased membrane fluidity and rate of insulin internalization. **J Inorg Biochem** 46:243–250. 1992.

FANT M, MUNRO H, MOSES AC. An autocrine/paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of the human placental growth. **J Clin Endocr Metab** 63:499–505. 1986.

FEDIAF - European Pet Food Industry Federation. **Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs**. Belgica. 85 p. 2014.

FENG C, WUREN Q, ZHANG X, SUN X, NA Q. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on broiler growth performance: A meta-analysis. **PLoS ONE** 16(4): e0249527. [https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0249527](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249527). 2021.

FRANÇA J, SAAD FMOB, SAAD CEP, SILVA RC, REIS JS. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40, 222-231. 2011.

FRAUWIRTH KA, THOMPSON CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. **J Immunol** 172: 4661-4665. 2004.

GOMES MR, ROGERO MM, TIRAPEGUI J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.11, n.5, p. 262-266. 2005.

GRANDJEAN D, VAISSAIRE J. **Enciclopédia do Cão Royal Canin**. Paris: Aniwa Publishing, 635. 2006.

GÜLTEPE EE, UYARLAR C, BAYRAM J. Effects of dietary chromium on immune system. *Kocatepe Vet J* 10(2):99–105. doi: 10.5578/kvj.53888. 2017.

GYTON AC, HALL JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1996.

HARPER JMM, SOAR JB, BUTTERY PJ. Changes in protein metabolism of ovine primary muscle cultures on treatment with growth hormone, insulin, insulin-like factor I or epidermal growth factor. **J Endocr** 112:87–96. 1987.

HEGOCCKI J, SUHAJDA A, JANZSO B.. Preparation of chromium enriched yeasts. **Acta Alimentaria**, v.26, n.4, p.345-358. 1997.

JAIN SK, KAHLON G, MOREHEAD L, DHAWAN R, LIEBLONG B, STAPLETON T,. Effect of chromium dinicocysteinatate supplementation on circulating levels of insulin, TNF- α , oxidative stress, and insulin resistance in type 2 diabetic subjects: Randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Mol Nutr Food Res**. 56(8):1333–41. doi: 10.1002/mnfr.201100719). 2012.

JENTZSCH AM, BACHMANN H, FÜRST P, BIESALSKI H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Rad Biol Med** 20:251–256. 1996.

JIA J, LI, YAO J CHEN L, FENG Z, JIANG L, SHI J, LIU J, CHEN J,. Circulating differential miRNAs profiling and expression in hexavalent chromium exposed electroplating workers **Chemosphere**, 260, Article 127546. 2020.

KAFILZADEH F, SHABANKAREH HK, TARGHIBI MR. Effect of Chromium Supplementation on Productive and Reproductive Performances and Some Metabolic Parameters in Late Gestation and Early Lactation of Dairy Cows. **Biol. Trace Elem. Res.** 149(1): 42–9. 2012.

KemTRACE- KemTRACE® brand Chromium 0.4% Dry Mineral Supplement (0.4% Chromium from Chromium Propionate). Disponível em: [https://www.kemin.com/content/dam/pdf/KemTRACE%20Chromium%200.4%20Dry%20\(U.S.\)%20-%20English_12.pdf](https://www.kemin.com/content/dam/pdf/KemTRACE%20Chromium%200.4%20Dry%20(U.S.)%20-%20English_12.pdf)

KHANGAROT BS, RATHORE RS, TRIPATHI DM. Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater catfish, *Saccobranhus fossilis* (Bloch). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 43, 11-20. 1999.

KORNEGAY ET. 1996. Organic vs inorganic trace minerals for swine: copper, zinc, and chromium. **Proceedings of the Canadian Feed Industry Association Eastern Nutrition Conference**. Halifax, Nova Scotia, Canada, p.65-83.

KREIDER RB. 1999. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. **Sports Medic**; 27, 97-110,

KUMAR M, KAUR H, TYAGI AK, KEWALRAMANI NJ, MANI V, DEKA RS, SHARMA VK, CHANDRA G; DANG AK. Effect of feeding inorganic chromium on growth performance, endocrine variables, and energy metabolites in winter-exposed buffalo calves (*Bubalus bubalis*). **Biological Trace Element Research**. 155(3):352-360. 2013.

KUMPULAINEN JT. Chromium content of foods and diets. **Biological Trace Element Research**, v.32, p.9-18, 1992.

LAI MH. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and E supplementation for type-2 diabetes melitus. **J Clin Biochem Nutr.** 43(3):191–8. doi: 10.3164/jcbrn.2008064. 2008.

LAMSON DS, PLAZA SM. The safety and efficacy of high-dose chromium. **Alternative Medic Review.** 7 (3), 218-235. 2002.

LEE DN, YEN HT, SHEN TF, CHEN BJ. The effects of chromium picolinate supplementation on growth performance and immunity response of weanling pigs. **J-Chinese Society of Animal Sci** 26: 373-386. 1997.

- LI XJ, BAO J. The relationship between nutrition and immunity in piglet. **Chinese J Animal Sci** 44: 56-58. 2008.
- LINDEMANN MD, CROMWELL GL, MONEGUE HJ. Effect of chromium source on tissue concentration of chromium in pigs. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2971–2978. 2008.
- LINDEMANN MD. Use of chromium as an animal feed supplement. In: VICENT JB (Ed.). **The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)**. Elsevier B.V., p.85-118. 2007.
- LINDEMANN MD, LU N. Chapter 3 - Use of chromium as an animal feed supplement. **The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)**, p.79-125. 2019.
- LIU G, WEI Y, WANG Z, WU D, ZHOU A. Effects of dietary supplementation with cysteamine on growth hormone receptor and insulin-like growth factor system in finishing pigs. **J Agric Food Chem** 56:5422–5427. 2008.
- LUKASKI HC. 1999. Chromium as a supplement. **Annu Rev Nutr.** 19:279–302. doi: 10.1146/annurev.nutr.19.1.279.
- LYKKESFELDT J, SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animal. **The Veterinary Journal.** 173. 2007.
- McDOWELL LR. Minerals in animal and human nutrition. **Academic Press**, 524p., 1992.
- MERTZ W. Chromium as a dietary essential for man, **Trace Element Metabolism in Animals, 2nd ed.**, University Park Press, MD, p.185-98, 1974.
- MERTZ W. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiol Rev**; 49, 163-239. 1969.
- MILLER DD. Minerals. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3ed. New York: Marcel Dekker 1996.
- MORVARIDZADEH M, DULCE ESTÊVÃO M, QORBANI M, HEYDARI H, HOSSEINI AS, FAZELIAN S, BELANČIĆ A, PERSAD E, REZAMAND G, HESHMATI J. The effect of chromium intake on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 69: 126879. 2022.
- MOURA RA, WADA CS, PURCHIO A, ALMEIDA TV. 1998. **Laboratory techniques**. 3rd ed. São Paulo: Atheneu. p.23-33.
- MUTUMA S, AMUNA P, SHUKLA H. Chromium in food, nutrition and health an introduction. **Nutrition & Food Science**, v.99, n.2, p.81-88. 1999.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dogs and Cats. Washington, DC: The National Academies Press, 2006.

- OFFENBACHER EG, PI-SUNYER FX. Chromium in human nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v.8, p.543-563, 1988.
- OFFENBACHER EG, PI-SUNYER FX, STOECKER BJ. Chromium. In: O'DELL BL, SUNDE RA. (Eds) **Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements**. New York: Marcel Dekker, p.389–411, 1997.
- OKADA S, SUZUKI M, OHBA H. 1983. Enhancement of ribonucleic acid synthesis by chromium (III) in mouse liver. **J Inorg Biochem** 19: 95-103.
- OONSIE-SHAGEER S, MOWAT DN. Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. **Journal Animal Science**, v.71, n.1, p.232-238. 1993.
- OTT EA, KIVIPELTO J. Influence of chromium tripicolinate on growth and glucose metabolism in yearling horses. **Journal of Animal Science**, v.77, p.3022-3030. 1999.
- PAIM FC, DUARTE M, WOLKMER P, DA SILVA AS, MONTEIRO SG, MAZZANTTI CM, LOPES STA. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Exp Parasitol** 128: 365-370. 2011.
- PAIM FC, DA SILVA AS, PAIM CB, FRANÇA RT, COSTA MM, DUARTE MM, DA SILVA CB, MAZZANTI CM, MONTEIRO SG, LOPES ST. Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Vet Parasitol**. Feb 18;192(1-3):137-42. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.036. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23116898. 2013.
- PECHOVA A, PAVLATA L. Chromium as an essential nutrient: a review. **Vet Med Czech** 52(1):1–18. doi: 10.17221/2010-VETMED. 2007.
- PECHOVA A, PODHORSKÝ A, LOKAJOVA E, PAVLATA L, ILLEK J. Metabolic effects of chromium supplementation in dairy cows in the periparturient period. **Acta Veterinaria Brno** 71: 9-18. 2002.
- PEREIRA AM, MAIA RG, FONSECA AJM, CABRITA ARJ. Zinc in Dog Nutrition, Health and Disease: A Review, **Animals (Basel)**. Apr; 11(4): 978. 2021.
- POLLARD GV, MONTGOMERY JL, BRAMBLE TC, MORROW JR, RICHARDSON CR, JACKSON SP, BLANTON JR. Effects of organic chromium on protein synthesis and glucose uptake in ruminants. **Prof Anim Sci** 17:261–266. 2001.
- PREUSS HG, GROJEC PL, Lieberman S, Anderson RA. Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats. **Clin Nephrol**. 47:325–30. 1997.
- ROCHA MA. Biotecnologia na nutrição de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, suplemento especial p.42-48. 2008.

ROGERO MM, TIRAPEGUI J, PEDROSA RG, CASTRO IA, PIRES ISSO, OLIVEIRA AAM, SALGADO MM, PINTO AR, UEDA M. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 38, n. 4. 2002.

ROGINSKI EE, MERTZ W. Effects of chromium(III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet. **J Nutr** 97:525–530. 1969.

SAHIN K, TUZCU M, ORHA C. Chromium modulates expressions of neuronal plasticity markers and glial fibrillary acidic proteins in hypoglycemia-induced brain injury. **Life Sciences** 93: 1039-1048. 2013.

SEDEGAH M, WEISS W, SACCI JB JR, CHAROENVIT Y, HEDSTROM R. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. **J Immunol** 164: 5905-5912. 2000.

SEDLAK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochemistry** 25, 192–205. 1968.

SHIAU SY, LIN SF. Effects of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrate in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**, v.110, p.321-330. 1993.

SHRIVASTAVA R, UPRETI RK, SETH PK, CHATURVEDI UC. Effects of chromium on the immune system. **Pathogens and Disease** 34: 1-7. 2002.

SHUMILLA JA, BRODERICK RJ, WANG Y, BARCHOWSKY A. Chromium(VI) inhibits the transcriptional activity of nuclear factor-kappaB by decreasing the interaction of p65 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein. **J. Biol. Chem.** 274, 207-212. 1999.

STOECKER, BJ. Chromium. **Present Knowledge in Nutrition. International Life Sciences Institute Nutrition Foundation**, Washington, DC, p.287-93. 1990.

SHILS ME, OLSON JA, SHIKE M, ROSS AC. **Modern nutrition in health and disease**. 9a ed. Philadelphia 1999, Lippincott Williams & Williams, 277-282. 1999.

SUN W, LU DX. Neuroendocrine - immunoregulatory network and diseases. **Chinese J Pathophysiology** 16: 761-763. 2000.

SUN YJ, RAMIREZ J, WOSKI AS, VINCENT JB. The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. **J Biol Inorg Chem**; 5, 129–136. 2000.

- SUNDARAM B, SINGHAL K, SANDHIR R. Ameliorating effect of chromium administration on hepatic glucose metabolism in streptozotocin-induced experimental diabetes. **Biofactors** 38(1):59–68. doi: 10.1002/biof.194. 2012.
- SUSHKO OO, ISKRA RJ, PONKALO LI. Influence of chromium citrate on oxidative stress in the tissues of muscle and kidney of rats with experimentally induced diabetes. **Regul Mech Biosyst** 10(2):209–14. doi: 10.15421/021931. 2019.
- TERPIŁOWSKA S, SIWICKI AK. The role of selected microelements: selenium, zinc, chromium and iron in immune system. **Cent Eur J Immunol** 36:303–7. 2011.
- TUZCU M, SAHIN N, ORHAN C, AGCA CA, AKDEMIR F, TUZCU Z. Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. **Nutr Metab (Lond)** 8:28. doi: 10.1186/1743-7075-8-28. 2011.
- UNTEA AE, VARZARUHTTIPS J, TURCU RP, PANAITE TD, Saracila M. The use of dietary chromium associated with vitamins and minerals (synthetic and natural source) to improve some quality aspects of broiler thigh meat reared under heat stress condition. **Italian Journal Of Animal Science**, VOL. 20, NO. 1, 1491-1499. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1978335>. 2021.
- VAJPAYEE P, TRIPATHI RD, RAI UN, ALI MB, SINGH SN. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. **Chemosphere** 41: 1075-1082. 2000.
- VAN DE LIGT JL, LINDEMANN MD, HARMON RJ, MONEGUE HJ, CROMWELL GL. Effect of chromium tripicolinate supplementation on porcine immune response during the postweaning period. **J. Anim. Sci.** 80, 449-455. 2002.
- VERMES C, ROEBUCK KA, CHANDRASEKARAN R, DOBAI JG, JACOBS JJ. Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor kb, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts. **J Bone Miner Res** 15: 1756-1765. 2000.
- VICENT JB, STALLINGS D. Introduction: A history of chromium studies (1955-1995). In: VICENT, J.B. (Ed.). **The Nutritional Biochemistry of Chromium(III)**. Elsevier B.V., p.1-39. 2007.
- VINCENT JB. The biochemistry of chromium. **J Nutr.** 130, 715–718. 2000.
- VINCENT JB. The bioinorganic chemistry of chromium (III). **Polyhedron.** 20, 1–26. 2001.
- WANG J, SUN P, BU DP, DU H, NAN XM. Occurrence reasons of immunosuppression in dairy cows during periparturient period and its attenuate nutritional countermeasures. **Chinese J Animal Nutrition** 26: 3579-3586. 2014.

WORTINGER A. **Nutrição para Cães e Gatos**. São Paulo: Roca. 232. 2009.

YAN XZ, ZHANG ZH. Influence of organic chromium on performance and immune function of weanling piglets. **J Henan Agricultural Sci** 34: 90-94. 2005.

YANCHEV I, MONEVA P, GUDEV D, POPOVA-RALCHEVA S, PEEVA T, PENCHEV P, ILIEVA I. Effect of weaning on some plasma metabolites in black-and-white calves fed diets with or without supplemental chromium picolinate. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. 14(3):329-334. 2008.

ZAFRA-STONE S, BAGCHI M, PREUSS HG. Benefits of chromium (III) complexes in animal and human health. In: VICENT, J.B. (Ed.) **The Nutrition Biochemistry of Chromium (III)**. Elsevier B.V., p.183-206, 2007.

ZHANG Q, SUN X, XIAO X, ZHENG J, LI M, YU M, PING F, WANG Z, QI C, WANG T. Maternal chromium restriction induces insulin resistance in adult mice offspring through miRNA **Int. J. Mol. Med.**, 41 (3), pp. 1547-1559.2018.

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Inclusão de cromo orgânico na ração de cães e impactos dessa alimentação na saúde dos caninos", protocolada sob o CEUA nº 8967040321 (00 00000), 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 de 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 12/03/2021.

We certify that the proposal "Inclusion of organic chromium in dog food and impacts of this food on canine health", utilizing 10 Dogs (10 males), protocol number CEUA 8967040321 (00 00000), 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 6899 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 03/12/2021.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 04/2021 a 08/2021 Área: *Zootecnia*

Origem: *Animais provenientes de outros projetos*

Espécie: <i>Cães</i>	sexo: <i>Machos</i>	Idade: <i>3 a 4 anos</i>	N: <i>10</i>
Linagem: <i>Beagle</i>		Peso: <i>10 a 12 kg</i>	

Local do experimento: Os animais serão alojados no cani experimental da UDESC, localizado em Guatambu SC. O cani possui 10 baias para alimentação individual e dois canis coletivos, possui temperatura controlada de 24 °C e área externa com gramado e sombra, onde os animais terão acesso durante o dia.

Lages, 30 de março de 2022

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina