PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Suplementação com cromo (Cr^3) para bovinos em condições de estresse

Pedro Leonardo de Paula Rezende[1]; Paulo Cezar Moreira[2]; Roberto de Camargo Wascheck[3]; Marcondes Dias de Freitas Neto[4]; Juliano José de Resende Fernandes[5]; João Restle[6].

[1]Zootecnista, Especialista em Produção de Ruminantes, Mestre em Ciência Animal e Doutorando em Animal - UFG - peleonardo@hotmail.com

[2]Professor Doutor - UFG/ICB

[3]Professor Doutor Depto. Zootecnia - PUC/GO

[4]Med. Veterinário Doutorando em Ciência Animal – UFG

[5]Professor Doutor - UFG/EV

[6]Pesquisador CNPq

Resumo

O cromo é um mineral que só recentemente passou a ser suplementado para ruminantes, havendo ainda uma série de dúvidas quanto aos seus reais efeitos. Na década de 1990, foi reconhecido o potencial do Cr na nutrição de bovinos e suínos. Nos últimos cinco anos, trabalhos científicos têm mostrado a importância do Cr para bovinos, quando há estresse emocional, físico e metabólico, resultante da intensificação das práticas produtivas, que propicia uma maior susceptibilidade às doenças e alterações metabólicas. Assim, objetivou-se com esta revisão de literatura, discutir alguns trabalhos científicos

recentes referentes à suplementação de Cromo para ruminantes como forma de reduzir os impactos das diferentes formas de estresse sobre o desempenho de bovinos.

Palavras-chave: corticóides, sistema imune, transporte, tolerância à glicose.

Supplemental chromium (Cr^3) for cattle under stress conditions

Abstract

Chromium is a mineral that only recently began to be supplemented to ruminants, and there are a lot of doubts about its real effects. In the 1990s, acknowledged the potential of chromium in nutrition of cattle and pigs. In the last five years, scientific studies have shown the importance of Cr to animals when there are emotional stress, physical and metabolic result of the intensification of production practices, which provides a greater susceptibility to diseases and metabolic disorders. Therefore, the aim with this literature review, discuss some recent scientific papers related to Chromium supplementation for ruminants as a means of reducing the impact of different forms of stress on performance of cattle.

Keywords: Corticosteroids, immune system, transport, glucose tolerance.

INTRODUÇÃO

O Cr funciona como componente integral e biologicamente ativo do fator de tolerância à glicose (GTF) que potencializa a ação da insulina na célula. O átomo de Cr, do GTF, facilita a interação entre a insulina e os receptores dos tecidos musculares e gordurosos (MERTZ, 1987).

Assim, o GTF com o Cr^{+3} é um mensageiro químico que se liga a receptores na superfície das células dos tecidos, estimulando sua capacidade de usar a glicose como combustível metabólico, ou armazenar sob a forma de glicogênio (ANDERSON, 1987). O GTF é importante não só para o metabolismo

dos carboidratos, como também para os de proteínas e lipídeos, e os hormônios do crescimento (BURTON, 1995). Ele é requerido para o funcionamento normal das células secretoras de insulina no pâncreas, prevenindo uma super-resposta da secreção de insulina mediante ao estímulo da glicose. A insulina é um hormônio que promove o processo anabólico e inibe o catabólico nos músculos, fígado e tecido adiposo, para tal, é dependente do GTF.

Em condições de estresse (período pré e pós-parto, no transporte, em alta lotação e variação extrema de temperatura) há aumento dos níveis sanguíneos de glicose e, simultaneamente, do hormônio cortisol, provocando mobilização das reservas de Cr nos tecidos.

O cortisol é antagônico à insulina e, nessa situação, o Cr mobilizado, para ação da insulina, é eliminado pela urina (MERTZ, 1992). O cortisol tem também efeito imunossupressor do sistema imunológico (resposta imune humoral, células imunemediadoras).

Quando o Cr é insuficiente, a ação da insulina é prejudicada, e há alteração nos metabolismos dos carboidratos, aminoácidos e lipídeos (BURTON, 1995; MOWAT, 1997), que se soma ao efeito supressor do sistema imunológico (resposta imuno-humoral, células imunemediadoras) mediado pelo cortisol (MERTZ, 1992).

Nas plantas, o cromo encontra-se, naturalmente, na forma orgânica, em concentração aproximada de 30 a 50 porções por bilhão (PPB). Ele pode, também, estar presente como contaminante, nas forragens, rações e suplementos minerais (YANG et al., 1996).

A análise de cromo na dieta é limitada e exige equipamento com alta especificação. MOWAT (1997) relata que altos níveis de ferro (Fe) e zinco (Zn), na dieta, interferem na biodisponibilidade do Cr para bovinos.

Metabolismo absortivo e reações bioquímicas intracelulares

As exigências de Cr não são conhecidas. No entanto, a suplementação de Cr é recomendada em situação de alta produção e para animais sob estresse: dieta com baixo teor de proteína, alto fornecimento de silagem; dietas com teores baixos em fibras (0,5 mg/kg da fonte orgânica de Cr); antes do confinamento e três semanas antes do abate (0,2 a 0,3 mg/kg da fonte orgânica); na desmama precoce; no pré e pós-parto e antes do transporte.

Uma concentração de 4 a 5 mg/cab./dia da fonte orgânica de Cr, durante as três últimas semanas do pré-parto, e 5 a 6 mg/cab/ dia, durante as três semanas do pós-parto (CHANG & MOWAT, 1992; YANG et al., 1996). As fontes de Cr recomendadas para suplementação são a levedura, o picolinato de cromo ou nicotinato de cromo (MOWAT, 1993).

O cromo é considerado essencial para humanos e animais há mais de 40 anos. Ele é encontrado na natureza principalmente na forma trivalente. A concentração máxima tolerável de cromo na dieta dos animais é de 3000 ppm para os óxidos e 1000 ppm para os cloretos.

O cromo é importante para a atividade de enzimas, a estabilidade de proteínas, e o metabolismo de carboidratos. No entanto, o principal papel do cromo é potencializar a interação entre a insulina e receptores celulares, através da formação do fator de tolerância à glicose. O fator de tolerância à glicose estimula a ação da insulina e potencializa a entrada de glicose para dentro da célula (Figura 1).

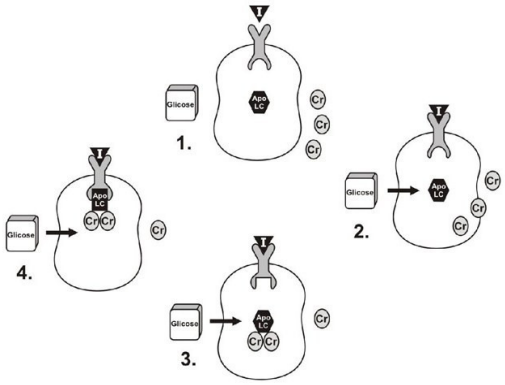

FIGURA 1. Modelo proposto para atuação do cromo na célula (adaptado de VINCENT, 2000)

Na etapa 1 a insulina se liga ao receptor e produz a ativação. Na etapa 2 ocorre a ativação do receptor de insulina que estimula a entrada de cromo para dentro da célula. Na etapa 3 o cromo se liga ao peptídeo Apo-LC conhecido como Substância de Baixo Peso Molecular Ligadora de Cromo. Na etapa 4 a Apo-LC se liga ao receptor de insulina e melhora a atividade do mesmo. Esta energia adicional produzida pela maior quantidade de glicose que entra na célula será utilizada para manutenção celular, síntese de novas proteínas, crescimento muscular, e melhoria na reprodução.

A absorção de cromo ocorre principalmente no intestino delgado, e as formas inorgânicas (cloreto e óxido) têm baixa absorção e sugundo ANDERSON, 1987 estas taxas encontram-se entre 0,4 e 3%. As formas orgânicas de cromo têm maior absorção (OLIN et al., 1994; ANDERSON et al., 1996), e atualmente há 6 formas orgânicas utilizadas na alimentação animal. São elas: cromo-aminoácido, cromo-picolinato, cromo-nicotinato, cromo-quelato, cromo-proteína e cromo-levedura.

Os resultados obtidos em pesquisas recentes têm mostrado que a suplementação com cromo melhora a resposta imunológica de animais confinados, com redução nos níveis de cortisol e aumento na produção de imunoglobulinas (CHANG e MOWAT, 1992; ALMEIDA e BARAJAS, 1999),

melhora a resposta vacinal (BURTON et al., 1994) e diminui a morbidade em bezerros e novilhos (MOWAT et al., 1993). Na Tabela 1 são demonstradas as concentrações de cromo em alguns alimentos utilizados na alimentação de ruminantes.

TABELA 1. Concentrações de cromo em diferentes alimentos

Alimento	Cromo (ppm na MS)
Silagem de milho	2,03
Cevada	0,83
Milho	0,91
Farelo de trigo	0,63
Farinha de peixe	0,63
Farelo de soja	0,15

Diferente dos animais não-ruminantes, a maior parte da glucose sangüínea nos ruminantes é derivada do processo gluconeogênico (dois terços) ao invés da absorção via intestino (um terço), portanto os tecidos dos ruminantes parecem ser mais refratários à insulina do que os tecidos dos não ruminantes (BROCKMAN, 1986).

FONTES DE CROMO E BIODISPONIBILIDADE

O Cr é um elemento de transição encontrado nos estados oxidados 0, 2+, 3+, 6+, sendo o estado trivalente (Cr^{3+}) o mais estável (McDOWELL, 1992). O estado hexavalente (Cr^{6+}) apresenta a melhor taxa de absorção, mas não tem sido estudado por ser altamente tóxico. A forma biologicamente ativa do Cr é o composto organoléptico de fator de tolerância à glicose (GTF). A presença do Cr^{3+} como núcleo do GTF é essencial para a atividade e facilita a interação entre receptores de insulina e suas células alvo (MOORADIAN & MORLEY, 1987 e ANDERSON & MERTZ, 1997).

As forragens e seus subprodutos contêm mais Cr do que os grãos. Cereais e frutas apresentam concentrações variáveis de Cr. Algumas variedades de pimenta preta contêm alto nível de Cr, mas contribuem muito pouco devido a seu baixo consumo (ANDERSON *et al.*, 1992). Na natureza, são encontradas diferentes fontes de Cr, orgânico e inorgânico. As fontes orgânicas incluem cromo-L-metionina, complexo cromo-ácido-nicotínico, cromo picolinato, e levedura de cromo. A fonte inorgânica mais comum é o cloreto de cromo.

A taxa de absorção do Cr inorgânico fornecido para ratos em jejum variou de 0,5 e 3% (MERTZ, 1974; DAVIS *et al.*, 1995). Devido sua baixa taxa de absorção, o Cr inorgânico tem sido utilizado como marcador em estudos de digestibilidade. Na forma de levedura o Cr 5 apresenta melhor biodisponibilidade e absorção, sendo o composto preferencial em estudos que visam suplementar Cr na dieta animal (LYONS, 1997).

FUNÇÃO DO CROMO NA DIETA ANIMAL

O aumento do interesse sobre o emprego do Cr como fonte suplementar na dieta de animais destinados a produção animal justifica-se por um possível efeito estimulatório sobre a taxa de crescimento, resposta imune, e alteração metabólica (CHANG & MOWAT, 1992; MOONSIE–SHAGEER & MOWAT, 1993; DEPEW *et al*., 1998).

De acordo com ANDERSON (1998) a resposta imunológica e o desempenho nutricional de bovinos submetidos a uma situação de estresse é melhorada com uma dieta contendo Cr. SCHWARZ & MERTZ (1959), realizaram estudos laboratoriais com camundongos e constataram que a presença do Cr aumentou a eficiência da absorção da glicose. Assim, a função primária do Cr consiste em manter a homeostase glicêmica, potencializando a ação da insulina.

O Cr é excretado através da urina e sua excreção é aumentada em decorrência do estresse. Segundo ANDERSON *et al.* (1991), a indução de uma deficiência experimental de Cr em animais de laboratório resultou no aparecimento de sintomas como hiperglicemia, glicosúria, elevação nas taxas de colesterol e triglicerídeos, diminuição do número de receptores e uma incapacidade da insulina se ligar às células.

CROMO E O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS

No metabolismo protéico a insulina apresenta um efeito direto, promovendo a captação de aminoácidos pelas células e convertendo-as em proteína. A insulina compartilha com o hormônio do crescimento a capacidade de aumentar a captação de aminoácidos para dentro das células e age diretamente sobre os ribossomos, aumentando a tradução do RNA mensageiro e formando novas proteínas. Na ausência de insulina, os ribossomos simplesmente param de trabalhar, o catabolismo protéico aumenta, a síntese protéica cessa e grandes quantidades de aminoácidos são liberadas para o plasma sanguíneo (GYTON & HALL, 1996).

Nos ruminantes, a relação simbiótica representada pela digestão fermentativa pode ser apreciada considerando o metabolismo dos ácidos graxos voláteis (AGV). O benefício obtido pelo hospedeiro está na energia química contida nos AGV's. Em ruminantes e outros grandes herbívoros, os AGV's são o principal combustível energético, desempenhando em larga escala o papel da glicose nos monogástricos onívoros (CUNNINGHAM, 1993).

Nos ruminantes, apenas uma pequena quantidade de glicose que não foi fermentada chega ao trato intestinal para ser absorvida. A gliconeogênese é um processo especialmente ativo nos ruminantes e se processa em velocidade muito alta. O propionato formado no rúmen pela fermentação bacteriana é absorvido e convertido a glicose, suprindo tecidos importantes como o cérebro e servindo como fonte precursora de carboidratos como a lactose (açúcar do

leite).

Na maioria dos animais, a gliconeogênese ocorre principalmente no fígado, e em grau muito menor, no córtex renal. Segundo BROCKMAN (1986) o organismo dos ruminantes parece ser mais refratário a insulina que os não ruminantes. Após o nascimento, nos ruminantes, a principal fonte de glicose é oriunda da absorção intestinal. O aumento nos níveis da glicose sangüínea estimula a secreção de insulina e conseqüentemente a absorção celular de glicose (FAHEY & BERGER, 1988).

A administração do cromo picolinato na dieta de bezerras diminuiu a concentração da glicose sangüínea e melhorou a taxa de resposta à insulina, indicando uma melhor eficácia da insulina e um aumento na sensibilidade dos tecidos ao absorver mais glicose (BUNTING *et al.*, 1994).

Bezerros suplementados com o complexo cromo-ácido-nicotínico apresentaram melhor resposta a insulina quando submetidos a um desafio com infusão intravenosa de glicose (KEGLEY & SPEARS, 1995). Segundo KEGLEY & SPEARS (1999), bezerros suplementados com cloreto de cromo não apresentaram efeito significativo no metabolismo dos carboidratos. Uma menor concentração de ácidos graxos não esterificados foi observada em bezerras que após o nascimento foram suplementadas com Cr picolinato (DEPEW *et al.*, 1998).

De acordo com KEGLEY *et al.* (1999), bezerras com rúmen funcionalmente ativo quando suplementadas com cromo-L-metionina aumentaram a taxa de absorção da glicose. HAYIRLI *et al.* (2001) concluíram que vacas leiteiras no período pré-parto suplementadas com cromo-metionina apresentaram aumento na concentração basal de insulina quando comparadas ao grupo controle.

ZANETTI *et al.* (2003) não tiveram efeito significativo no teste de tolerância a glicose quando bezerros da raça holandesa foram suplementados com levedura de Cr, embora os autores constataram uma tendência de

desaparecimento mais rápido da glicose sangüínea nos bezerros suplementados com cromo.

CROMO E RESPOSTA IMUNE

Animais submetidos a qualquer tipo de estresse, físico ou neurogênico, aumentam imediatamente a secreção do hormônio adrenocorticotrópico pela glândula hipófise anterior, seguido dentro de alguns minutos por um aumento na secreção de cortisol (adrenal), que influencia fisiologicamente aumentando o metabolismo da glicose (BURTON, 1995). Pelo menos 95% da atividade dos glicocorticóides resultam na secreção de cortisol, também conhecido como hidrocortisona (GYTON & HALL, 1996).

O principal efeito metabólico do cortisol e de outros glicocorticóides sobre o metabolismo celular é estimular a gliconeogênese. O cortisol mobiliza aminoácidos nos tecidos extra-hepáticos, sobretudo nos músculos, aumenta a quantidade de enzimas necessárias para que ocorra conversão dos aminoácidos em glicose, aumenta a absorção de glicose pelas células, reduz as reservas corporais de proteína, diminui a síntese protéica e aumenta o catabolismo protéico intracelular (BURTON, 1995).

Animais quando submetidos a mudanças de manejo como transporte, vacinação e mudança alimentar constituem uma categoria bastante susceptível ao estresse, tornam-se mais vulneráveis a doenças e podem apresentar deficiência de Cr (MOWAT *et al.,* 1993). Segundo JOHNSON (2001), uma maior concentração de glicose sangüínea é suficientemente capaz de mobilizar a reservas de Cr corporal e determinar perdas irreversíveis.

De acordo com MATHINSON & ENGSYTRON (1995), bovinos expostos ao estresse e suplementados com 3,04% de um complexo de Cr quelatado com aminoácidos, não melhoraram a eficiência alimentar e o desempenho animal. MOONSIE-SHAGEER & MOWAT (1993), suplementaram bovinos com Cr na forma de levedura (0,2% de Cr) e observaram um decréscimo linear na

concentração de cortisol plasmático, a temperatura retal diminuiu em 0,5 ^oC e a taxa de morbidade entre os animais que receberam Cr foi menor.

Segundo ANDERSON (1994) os sintomas da deficiência de Cr são observados somente em animais submetidos a fatores estressantes, resultando em uma menor eficiência alimentar e queda na resposta imunológica do animal. Em experimentos realizados por BUNTING *et al.* (1994), não foi observado diferença estatística significativa na concentração sérica de glicose, insulina e colesterol, utilizando 370 mg de picolinato de Cr.

CHANG *et al.* (1995) não recomendam a administração de formas inorgânicas de Cr para bovinos, uma vez que o alto nível destas formas na dieta pode levar a uma intoxicação. Nos experimentos conduzidos pelos autores o desempenho animal e os parâmetros que avaliam o estresse animal permaneceram inalterados.

Segundo CHANG & MOWAT (1992), a taxa de morbidade não diferiu entre bezerras suplementadas ou não com Cr, porém, a concentração plasmática de imunoglobulina aumentou quando os animais receberam Cr na dieta (CHANG & MOWAT, 1992). Novilhos suplementados com levedura de Cr tendenciaram a uma menor morbidade, aumento da imunoglobulina sérica, diminuição do cortisol sangüíneo (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993) e aumento da resposta imunológica celular (KEGLEY *et al.* 1996). BORGS & MALLARD (1998) sugerem que animais suplementados com Cr possuem menor concentração sérica de cortisol e são menos susceptíveis ao estresse.

BURTON *et al.* (1993), suplementaram vacas leiteiras com Cr quelatado por um período de seis semanas no pré-parto e dezesseis semanas no pós-parto e concluíram que a suplementação com Cr melhorou a imunossupressão causada pelo estresse do parto e aumentou a resistência a doenças infecciosas como a mastite.

MOWAT *et al.* (1993), testaram duas fontes de Cr orgânico (levedura e aminoácido quelatado) na dieta de bezerros e verificaram uma menor concentração sérica de glicose e cortisol. A morbidade de bezerros foi

diminuída de 55,6% (controle) para 33,3% naqueles suplementados com levedura de cromo e 15,5% para o grupo que recebeu Cr quelatado com aminoácido.

BURTON *et al.* (1994), concluíram que bezerros recém desmamados suplementados com Cr tiveram uma melhor resposta imunológica humoral quando submetidos a vacina comercial contra IBR, os resultados foram indiferentes para cepas do Vírus da Parainfluenza Bovina Tipo 3.

CHANG *et al.* (1996), após vacinarem bezerros contra Rinotraqueíte Infecciosa bovina (IBR), Parainfluenza, Vírus Sincicial Respiratório Bovino, Diarréia Viral Bovina (BVD) e Pasteurela Hemolítica, suplementaram bezerros com Cr e observaram uma melhor resposta imunológica humoral. O tratamento com Cr não afetou a secreção de ACTH e cortisol. Segundo ARTHINGTON *et al.* (1997), bezerros suplementados com levedura de Cr e submetidos experimentalmente à inoculação com Herpes vírus Bovino Tipo I não alteraram
a resposta imunológica humoral.

ALMEIDA & BARAJAS (1999) avaliaram o efeito da vitamina E e Cr-L-metionina sobre a produção de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) e da enzima aspartato aminotransferase em novilhos durante os primeiros 30 dias de confinamento. A suplementação com Cr-L-metionina aumentou a concentração sérica de IgM e diminuiu a atividade da enzima aspartato aminotransferase, enquanto que, a adição na dieta de vitamina E aumentou o nível sérico de IgG.

Segundo ARAGÓN *et al.* (2001) a administração da levedura de Cr na alimentação de fêmeas zebuínas no período pós-parto (12,4 mg de Cr/vaca/dia) reduziu a concentração do cortisol plasmático e tornou os animais tratados aptos a produzir em situações adversas. A suplementação de búfalas recém desmamadas com levedura de Cr determinou um aumento na resposta imunológica celular e diminuiu a agressividade dos animais (GRASSO *et al.* 2001).

DESEMPENHO E RESPOSTA IMUNE

Vários autores não têm verificado efeito da suplementação de cromo no desempenho de bezerros em condições de conforto (KEGLEY & SPEARS, 1995; DEPEW et al., 1998; DANIELSSON & PEHRSON, 1998). Entretanto, MOONSIE-SHAGEER & MOWAT (1993), encontraram aumento no ganho de peso diário, bem como na ingestão de alimentos por bezerros submetidos a estresse, mas não em situações normais. KEGLEY et al. (1996) também obtiveram aumento no ganho de peso com a suplementação com cromo, só que também com animais que foram submetidos a situações de estresse.

No estudo de CHANG & MOWAT (1992), os bezerros que sofreram o estresse do leilão e do transporte, nos 28 dias seguintes quando suplementados com 0,4 ppm de cromo ganharam mais peso que os não suplementados (0,79 versus 0,610 kg/animal/dia). É interessante registrar que neste experimento, a suplementação com oxitetraciclina não teve efeito (0,79 e 0,80 kg/animal/dia).

Após o estresse, durante 70 dias, o cromo não teve efeito no desempenho animal, Uma das explicações para o melhor desempenho somente dos animais sob estresse é que nessas condições eles podem apresentar uma queda na resistência imune, como já comprovado em vários experimentos (MOONSIE-SHAGEER & MOWAT, 1993; BURTON et al., 1993), queda essa que comprometeria o desempenho e que a suplementação visando elevar os níveis de cromo evitaria.

Alguns fatores que interferem na absorção de cromo foram citados por MOWAT (1997):

- baixa ingestão de matéria seca,
- baixa ingestão de alimentos com baixa disponibilidade de cromo,
- ingestão de alimentos oriundos de solos pobres em cromo,
- altos níveis de minerais interferentes (ferro, e zinco),
- baixo nível de aminoácidos e baixa concentração de ácido Ascórbico.

O mesmo autor cita alguns fatores que aumentam a eliminação de cromo pelo organismo, como:

- estresse calórico;
- estresse por transporte, gestação, lactação, exercícios físicos, trauma fisiológico;
- infecções;
- obesidade;
- teor elevado de açúcares;
- alta ingestão de nitrogênio não protéico.

O cromo é um micronutriente de transição encontrado em seis estados de oxidação: 0, 2+, 3+, 4+, 5+ e 6+, sendo o estado trivalente o mais estável. A forma orgânica apresenta uma absorção de 10 a 15% do total ingerido contra 1 a 3% da forma inorgânica (CHANG te al.,1992). A razão disso pode estar relacionada com a formação de óxidos de cromo insolúveis, interferência de outros elementos (zinco, ferro e vanádio) e baixa ou nenhuma conversão da forma inorgânica para orgânica pela falta do ácido nicotínico.

Durante o estresse, o metabolismo da glicose diminui devido ao aumento do cortisol no sangue. O cortisol preveni a entrada da glicose nos tecidos periféricos, resultando na elevação da glicose sangüínea e conseqüente mobilização de cromo, sendo este eliminado via urina. O NRC (1988) recomenda ingestão máxima na dieta de 3000 mg/Kg para óxido de cromo e de 1000mg/Kg para cloreto de cromo.

Segundo ARTHINGTON et al. (1997), a suplementação com 3 mg de cromo/animal/dia não influenciou as taxas de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), cortisol e resposta imune de 12 bezerros inoculados com Herpesvirus Bovino tipo I.

KEGLEY et al., (1997), não observaram efeitos positivos com a suplementação de cromo na influência da resposta imune nos animais

inoculados com IBR, e não foram observadas diminuições do estresse nos animais que foram transportados a distância de 343 Km.

Em outro trabalho, KEGLEY et al., (1997) avaliaram o desempenho animal e o metabolismo da glicose na alimentação de bezerros com Cr Nicotínico e Cloreto de cromo em bezerros holandeses com menos de 1 semana de idade. Foram observados diminuição da concentração de glicose sangüínea e um maior ganho de peso na suplementação com Cr Nicotínico em alguns períodos do experimento, mas não tiveram efeito no experimento todo.

Para MOWAT et al. (1993) a adição de cromo quelatado na suplementação de bezerros mostrou-se benéfica, diminuindo o estresse dos animais, em conseqüência da diminuição da glicose e cortisol sangüíneo.

KELGEY & SPEARS (1995) não encontraram diferença significativa no desaparecimento da glicose sangüínea, mas apenas tendência. CLAEYS et al. (1994) e DEPEW et al. (1998) também não encontraram diferença significativa no desaparecimento da glicose sangüínea.

A tendência de desaparecimento mais rápido da glicose sangüínea é possivelmente devido a um aumento na atividade da insulina, como foi encontrado por HAYIRLI et al. (2001), suplementando vacas leiteiras no período do pré-parto com cromo-metionina e também por KEGLEY & SPEARS (1995), que, suplementando bezerros mestiços Angus com Cr orgânico, por período de 56 dias, encontraram aumento no nível de insulina sérica, entre 15 e 30 minutos após a infusão de glicose.

SUBIYTNO et al. (1996), também observaram diminuição de glicose e insulina no período pré-parto com suplementação de cromo. Assim como, DEPEW et al., (1998) avaliaram que a suplementação com tripicolinato de cromo diminuíram os níveis de glicose em novilhos e novilhas.

No estudo de MOOSIE-SHAGEER & MOWAT (1993), a suplementação com o cromo diminuiu as morbidades, assim como as temperaturas retais. A suplementação com o Cr propiciou maior concentração de imunoglobulina G1. Estes autores também notaram um aumento de 27% no ganho de peso e um

aumento na ingestão de alimentos. KEGLEY et al. (1997), também verificaram aumento no ganho de peso de novilhos em crescimento, mas não notaram diferença na resposta imune, mesmo sob condições de estresse.

No estudo de BURTON et al. (1993), foi avaliado o efeito da suplementação com 0,5 mg/kg de Cr em dietas de vacas leiteiras, nas 6 semanas antecedentes ao parto e nas 16 semanas pós-parto. Os autores concluíram que a suplementação com cromo proporcionou efeito significativo na resposta imune, tanto humoral quanto na mediada por célula, no período estudado que é considerado de estresse.

DANIELSSON & PEHERSON (1998) realizaram experimento de suplementação com cromo-levedura (0,2 ppm) em ração de novilhos durante 170 dias, sendo que a dieta basal possuía nível de cromo de 0,72 mg/kg. Não foram observadas diferenças entre os grupos, considerando o ganho de peso e os parâmetros de qualidade de carcaça, levando os autores a concluírem que na Suécia não há razão para suplementar Cr para bovinos em crescimento, alimentados intensivamente.

A suplementação de Cr parece melhorar o perfil imunológico em ruminantes quando submetidos a condições de estresse, principalmente para bezerros (CHANG e MOWAT, 1992; MOONSIE-SHAGGER e MOWAT, 1993). Esse efeito no perfil imunológico apresenta resultado apenas durante poucas semanas a partir do início do estado de estresse dos animais (CHANG e MOWAT, 1992).

Quando os bezerros apresentam-se psicologicamente adaptados, os efeitos da suplementação de Cr não são observados (CHANG e MOWAT, 1992; CHANG et al., 1992). BUNTING et al. (1994) mostraram que a suplementação de Cr para bezerros Holstein não afetou o ganho de peso, a ingestão, a conversão alimentar e a concentração de glucose sangüínea, embora tenha sido observada uma redução no colesterol plasmático.

BURTON (1995) obteve os mesmos resultados com a suplementação de Cr orgânico. Os níveis de insulina, somatotropina e IGF não foram afetados

com a suplementação, entretanto os níveis de corticóides apresentaram-se reduzidos para os animais suplementados. O autor sugeriu que a suplementação com Cr deve ser efetuada apenas para os bezerros durante a desmama, transporte e início de confinamento, ou seja, períodos de estresse.

Alguns trabalhos com animais sem problemas de estresse têm mostrado resultados variados tanto para os parâmetros de crescimento como nos processos metabólicos (CHANG e MOWAT, 1992; CHANG et al., 1992).

MOWAT et al. (1993) mostraram que o uso de Cr quelatado, junto ou separado de outros microminerais, também apresentou os mesmos efeitos de diminuição de morbidade, diminuindo também os níveis de corticóides e o de glucose do sangue.

DANIELSSON & PEHERSON (1998) avaliaram o efeito da suplementação de 1 mg de cromo orgânico/animal/dia via oral durante 132 dias, em 24 bezerros, divididos em 4 períodos submetidos ao estresse de insolação (sob exposição direta ao sol) e/ou estresse por transporte (100 km a cada 14 dias) conforme demonstrado na Tabela 2. Os autores obtiveram resultados satisfatórios de ganho de peso e diminuição de estresse no terceiro período do experimento. No quarto período os resultados foram dependentes das fontes de estresse as quais eram submetidos os animais.

TABELA 2. Ganho de peso médio diário em Kg dos animais durante todo o experimento

TRATAMENTOS	COM CROMO	SEM CROMO
Animais expostos ao sol	0,49	0,47
Animais c/ acesso à sombra	0,64	0,55
Animais c/ acesso à sombra e transportados	0,62	0,56
Animais expostos ao sol e transportados	0,50	0,52

Fonte: DANIELSSON & PEHERSON (1998)

SUBIYATANO *et al.* (1996) verificaram uma maior produtividade ao adicionar Cr na dieta de vacas leiteiras. ARAGÓN et al. (2001) obtiveram maior ganho de peso em vacas da raça Nelore suplementadas com Cr.

A adição do Cr orgânico já é usual em dietas de gado de corte e leite. Em rebanhos destinados a produção de carne, muitos trabalhos demonstraram que a suplementação com Cr beneficia os animais através de melhorias na taxa de crescimento e ganho de peso. Em rebanhos leiteiros, a suplementação com algumas fontes comerciais de Cr na forma de levedura (*Sacharomices cerevisae*) diminui o estresse decorrente da alta produção e indiretamente beneficiou o sistema imunológico dos animais (LYONS, 1997).

Em relação ao desempenho animal, a literatura se mostra bastante variável. CHANG & MOWAT (1992) observaram que o ganho de peso de bezerros no período inicial de confinamento foi maior quando os animais receberam 0,4 mg de levedura de Cr por kilograma (kg) de matéria seca ingerida (MSI), no entanto, o peso final dos animais não foi afetado.

Segundo MOWAT *et al.* 1993, o ganho de peso de bezerros suplementados com 0,5 mg de levedura de Cr por kg MSI não foi estatisticamente superior quando avaliado por um período de 35 dias. Da mesma forma, a suplementação diária por animal com levedura de Cr na quantidade de 4,0 mg (LINDELL *et al.*, 1994), 0,75 mg (CHANG *et al.*, 1994), e 3,0 mg de Cr quelatado com aminoácidos (MATHISON & ENGSTROM, 1995) não afetou significativamente o desempenho de bezerros nos primeiros 28 dias do experimento.

CLAEYS *et al.* (1994) avaliaram o efeito de diversas fontes de Cr como o cloreto de Cr, o picolinato de Cr e o complexo de Cr com ácido nicotínico, adicionando 4 e 8 mg na dieta de novilhos em fase de crescimento e terminação e constataram que o ganho de peso e a ingestão de MS não foram afetados pelo tipo da fonte nem pela quantidade de Cr utilizado, quer na fase de crescimento ou terminação dos animais.

POLLARD & RICHARDSON (1999) ao realizarem experimentos com bezerros constataram que a suplementação com 0,2 mg de levedura de Cr por kg de matéria seca ingerida (MSI) não melhorou o ganho de peso, a ingestão de matéria seca e a conversão alimentar, enquanto que, no mesmo experimento o emprego de 0,4 mg de levedura de Cr reduziu a MSI, o ganho de peso e a conversão alimentar aumentou. Alguns trabalhos realizados em período próximo há 28 dias não observaram qualquer efeito do Cr sobre o desempenho produtivo de bovinos (MOWAT *et al.*, 1993; CHANG *et al.*, 1994; LINDELL *et al.*, 1994; MATHISON & ENGSTROM, 1995).

De acordo com MOONSIE-SHAGEER & MOWAT (1993), novilhos que receberam 0,2 e 1,0 mg de levedura de Cr por kg de MSI durante um período inicial de 33 dias, responderam com aumento da ingestão de MS e apresentaram maior ganho de peso vivo diário, superior em 27% quando comparado ao grupo não suplementado. Segundo WRIGHT *et al.* (1994), nos primeiros vinte e oito dias de confinamento a suplementação com 0,14 mg de levedura de Cr por Kg de MSI na forma orgânica aumentou o desempenho e o ganho de peso vivo animal em 10%. Para condições semelhantes, MOWAT (1997) constatou um aumento médio de 21% no ganho de peso vivo.

SUBIYATNO *et al.* (1996) e YANG *et al.* (1996) demonstraram que a adição de Cr na dieta de vacas leiteiras aumentou a produção leiteira sem comprometer a eficiência reprodutiva. Em período superior a vinte e oito dias, o fornecimento do Cr na dieta de bovinos de corte não proporcionou melhor desempenho (CHANG & MOWAT, 1992; CHANG *et al.*, 1994; CLAEYS *et al.*, 1994; LINDELL *et al.*, 1994; KEGLEY & SPEARS, 1995; MATHISON & ENGSTROM, 1995; POLLARD & RICHARDSON, 1999 e SOARES FILHO & CAETANO, 2002).

Alguns experimentos demonstram efeito positivo no ganho de peso por um curto período, principalmente quando os animais foram submetidos a mudanças de origem ambiental e alimentar como o confinamento e que podem resultar em situações estressantes (CHANG & MOWAT, 1992; MOONSIE-

SHAGEER & MOWAT, 1993; WRIGHT *et al.*, 1994 e MOWAT, 1997). O fato da ação suplementar do Cr atuar em animais estressados explica a resposta positiva no período inicial de confinamento, observado por CHANG & MOWAT (1992), MOONSIE-SHAGEER & MOWAT (1993), WRIGHT *et al.* (1994) e MOWAT (1997).

Outro fator importante a ser considerado é o nível nutricional dos animais, podendo influenciar diretamente o resultado dos experimentos. WARD *et al.* (1995), ao utilizarem cordeiros da raça Suffolk, observaram que o fornecimento de 0,4 mg de Cr por kg de MSI melhorou a resposta imunológica dos animais apenas quando 100% do requerimento de proteína bruta foi satisfeito.

Segundo MOWAT (1997) em situações de estresse a campo ou em confinamento o Cr previne uma redução no ganho de peso vivo. Seu principal efeito observado consiste na redução da taxa de morbidade entre bezerros. A adição de Cr na dieta deve ser de 2 a 3 mg/dia/ para animais com aproximadamente 250 kg de peso vivo.

DANIELSSON & PEHERSON (1998) na Suécia, ao adicionarem levedura de Cr na dieta de novilhos em confinamento não observaram diferenças entre os grupos em relação ao ganho de peso e qualidade da carcaça. Os autores concluíram que na Suécia o Cr não é indicado como suplemento para bovinos em estágio de crescimento.

ARAGÓN *et al.* (2001) suplementaram vacas zebus primíparas mantidas a pasto e verificaram que o número de animais gestantes na primeira, segunda e terceira inseminação não diferiram estatisticamente do grupo controle, embora ao final do experimento o ganho de peso vivo dos animais que receberam Cr tenha sido estatisticamente superior.

ZANETTI *et al*. (2003) avaliaram bezerros da raça holandesa suplementados com 0,4 mg por Kg de MS de cromo orgânico e verificaram que não houve diferença na ingestão diária de matéria seca, ganho diário, eficiência e conversão alimentar para os grupos controle e tratados. De acordo

com ZANETTI *et al.* (2003) a suplementação da dieta de bezerros não submetidos à estresse, não influenciou o desempenho e a resposta metabólica ao teste de tolerância à glicose.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da necessidade de mais pesquisas na área, os recentes estudos demonstram que, naqueles períodos em que os animais são expostos à maior estresse, como transporte, a suplementação com cromo pode melhorar as condições orgânicas do animal e com isso melhorar seu desempenho, refletindo em eficiência técnica e econômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.; BARAJAS, R. Effect of vitamin E and chromium-L-methionine supplementation on serum levels of immunoglobulins G and M, and aspartate aminotransferase enzyme of calves recently arrived to feedlot. **Journal of Animal Science**, v. 77 (S.1), p. 218, 1999.

ANDERSON, R.A. Chromium in tissues and fluids. In: MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. San Diego: Academic Press, 1987. p. 225-40.

ANDERSON, R.A. *et al.* Supplemental chromium effects on glucose, insulin, glucagons, and urinary chromium losses in subjects consuming controlled lowchromium diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 909-916, 1991.

ANDERSON, R.A.; BRYDEN, N.A.; POLANSKY, M.M. Dietary chromium intake. Freely chosen diets, institutional diets, and individual foods. **Biological Trace of Elements Research**, v.32, p.117-121, 1992.

ANDERSON, R.A. Chromium nutrition in the elderly. In: WATSON, R.R. **Handbook of nutrition in the aged**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 385-392.

ANDERSON, R.A., MERTZ, W. Glucose tolerance factor: an essential dietary agent.**Trends Biochemical Science**, v. 2, n. 12, p. 277-79, 1996.

ANDERSON, R.A. Recent advances in the clinical and biochemical manifestation of chromium deficiency in human and animal nutrition. **Journal of Trace Elements Experimental Medicine**, v. 11, n. 2-3, p. 241-250, 1998.

ARAGÓN, V.E.F. *et al.* Suplementação com cromo e desempenho reprodutivo de vacas zebu primíparas mantidas a pasto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 624-628, 2001.

REZENDE, P.L.P. et al. Suplementação com cromo (Cr^3) para bovinos em condições de estresse. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 857, 2010.

ARTHINGTON, J.D. *et al.* Supplemental dietary chromium does not influence ACTH, cortisol, or immune responses in young calves inoculated with bovine herpesvirus-1. **Journal of Animal Science**, v. 75, n.1, p.217-223, 1997.

BORGS, P.; MALLARD, B.A. Immune-endocrine interactions in agricultural species: chromium and its effect on health and performance. **Domestical Animal Endocrinology**, v.15, n. 5, p. 431-438, 1998.

BROCKMAN, R.P. Pancreatic and adrenal hormone regulation of metabolism. In: MILLIGAN, L.P., GROVUM, W.L, DOBSON, A. **Control of digestion and metabolism in ruminants**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1986, p.405-419.

BUNTING, L.D. *et al.* Influence of chromium picolinate on glucose usage and metabolic criteria in growing Holstein calves. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 6, p. 1591-1599, 1994.

BURTON, J.L.; MALLARD, B.A.; MOWAT, D.N. Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 6, p. 1532-1539, 1993.

BURTON, J.L.; MALLARD, B.A.; MOWAT, D.N. Effects of supplemental chromium on antibody responses of newly weaned feedlot calves to immunization with infections bovine rhinotracheitis and parainfluenza 3 virus. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 2, p. 148-151, 1994.

BURTON, J.L. Supplemental chromium: its benefits to the bovine immune system. **Animal Feeding Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 117-133, 1995.

CHANG, X.; MOWAT, D.N. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 2, p. 559-565, 1992.

CHANG, X.; MOWAT, D.N.; MALLARD, B.A. Supplemental organic and inorganic chromium with niacin for stressed feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 72 (S.1), p. 132, 1994.

CHANG, X.; MOWAT, D.N.; MALLARD, B.A. Supplemental chromium and niacin for stressed feeder calves. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 351- 358, 1995.

CHANG, X. *et al.* Effect of supplemental chromium on antibody responses of newly arrived feeder calves to vaccines and ovalbumin. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 2, p. 140-144, 1996.

CLAYES, M.C.; SPEARS, J.W.; KEGLEY, E.B. Performance, blood metabolites and carcass characteristics of steers fed supplemental organic or inorganic chromium. **Journal of Animal Science**, v. 2, (S. 1), p. 132, 1994.

CUNNHINGAM, J.G. Digestão: Os processos fermentativos. In:___.**Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, 454p.

DANIELSON, D.A., PEHRSON, B. Effects of chromium supplementation on the growth and carcass quality of bull fed a grain-based diet during the finishing period. **Journal of Veterinary Medicine**, Series A: Physiology, Pathology and Clinical Medicine, v. 45, n. 4, p. 219-224, 1998.

REZENDE, P.L.P. et al. Suplementação com cromo (Cr^3) para bovinos em condições de estresse. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 857, 2010.

DAVIS, M.L. SEABORN, C.D.; STOECKER, B.J. Effects of over-the-counter drugs on 51chromium retention and urinary excretion in rats. **Nutrition Research**, v. 15, n. 2, p. 202-210, 1995.

DEPEW, C.L. *et al.* Performance and metabolic responses of young dairy calves fed diets supplemented with chromium tripicolinate. **Journal Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 2916-2923, 1998.

FAHEY, G.C.; BERGER, L.L. Los carboidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, D.C. **El ruminate: Fisiología digestive y nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1988, p.305-338.

GRASSO, F. *et al*.; Effect of space allowance and chromium supplementation on buffalo. **Zootécnica e Nutrizione Animale**, v. 27, n. 2, p. 55-63, 2001.

GYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

HAYIRLI, A. *et al.* Effect of chormium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p.1228-1230, 2001.

JOHNSON, B. Cromo: função na imunidade animal. In: **SEMINÁRIO INTERNACIONAL NUTRON SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS**, 3, 2001. *Seminário da Nutron*... Goiânia: entidade, 2001. p. 1-8.

KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W. Immune response, glicose metabolism, and performance of stressed feeder calves fed inorganic or organic chromium. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2721-2726, 1995.

KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W.; BROWN, T.T. Immune response and disease resistance of calves fed chromium nicotinic acid complex or chromium chloride. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 2, p. 1278-1283, 1996.

KEGLEY, E.B.; SPEARS, J.W. Chromium and cattle nutrition. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 12, n. 2, p. 141-147, 1999.

LINDELL, S.A.; BRANDT, R.T.; MINTON, J.E. *et al*. Supplemental Cr and revaccination effects on performance and health of newly weaned calves. **Journal of Animal Science**, v. 72, (S. 1), p. 133, 1994.

LYONS, P. A new era in animal production: the arrival of the scientifically proven natural alternatives. In: **SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY**, 13, 1997. *Proceedings of Alltech*... Nottinghan: Univ. Press, 1997. p. 1-13.

MATHISON, G.W.; ENGSTROM, D.F. Chromium and protein supplements for growing-finishing beef steers fed barley-based diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 4, p. 549-558, 1995.

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

MERTZ, W. Chromium as dietary essential for man. In: HOESKTRA, W. G. **Trace elements metabolism in animals**. Baltimore: University Park Press, 1974. p. 185-198.

REZENDE, P.L.P. et al. Suplementação com cromo (Cr^3) para bovinos em condições de estresse. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 857, 2010.

MERTZ, W. (Ed.) **Trace Elements in Human and Animal Nutrition** (5th Ed.), 1987.

MERTZ, W. Chromium in human nutrition: a review. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 4, p. 626-633, 1992.

MOONSIE-SHAGEER, S.; MOWAT, D.N. Effect of level suplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 232-238, 1993.

MOORADIAN, A.D., MORLEY, J.E. Micronutrient status in diabetes mellitus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, n.5, p. 877-895, 1987.

MOWAT, D.N., CHANG, X., YANGA, W.Z. Chelated chromium for stressed feeder calves. **Canadian Journal of Animal Science**., v. 73, n. 1, p. 49-55, 1993.

MOWAT, D.N. **Supplemental organic chromium reviewed for cattle**. Feedstuffs, v. 6, n. 43, p. 12-19, 1997.

NRC. National Research Council. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington-USA: National Academic Press, 1988. 90p.

OLIN KL et al. Comparative retention/absorption of 51chromium (51Cr) from 51Cr chloride, 51Cr nicotinate and 51Cr picolinate in a rat model. **Trace Elem Electrolytes** 1994;11:182-186.

POLLARD, G.V.; RICHARDSON, C.R. **Effects of organic chromium (Bio-Chrome) on growth, efficiency and carcass characteristics of feedlot steers** In: SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 15, 1999. *Proceedings of Alltech...* Nottinghan: Univ. Press, 1999. p.103-109.

SCHWARZ, K.; MERTZ, W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 85, p. 292-295, 1959.

MOONSIE-SHAGEER, S.; MOWAT, D.N. Effect of level suplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 232-238, 1993.

SOARES FILHO, C.V.; CAETANO, H. Desempenho de bovinos de corte suplementados com Cr-levedura e produto homeopático. **Boletim da Indústria Animal,** v. 59, n. 2, p. 177-184, 2002.

SUBIYATNO, A.; MOWAT, D.N.; YAN, W.Z. Metabolite and hormonal responses to glucose or propionate infusions in preparturient dairy cows supplemented with chromium. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1436-1445, 1996.

VINCENT, J.B. Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. **Nutrition Review**, 58:67, 2000.

WARD, T.L. *et al.* Dietary protein and chromium tripicolinate in Suffolk lambs: II. Hematological and immunological measurements, and metabolic responses to feeding, glicose, and epinephrine. **Journal of Animal Science**, v. 73, (S. 1), p. 265, 1995.

WRIGHT, A.J. *et al.* Chromium supplementation plus vaccines for stressed feeder calves. **Journal of Animal Science**, v. 72, (S.1), p. 132, 1994.

REZENDE, P.L.P. et al. Suplementação com cromo (Cr^3) para bovinos em condições de estresse. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 21, Ed. 126, Art. 857, 2010.

YANG, W.Z. *et al.* Effects of chromium supplementation on early lactation performance of holstein cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 76, p.221-230, 1996.

ZANETTI, M.A. *et al.* Desempenho e resposta metabólica de bezerros recebendo dietas suplementadas com cromo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1532-1535, 2003.